

Tesis Doctoral

Efecto del hiperandrogenismo sobre la fisiología uterina. Acción de la Metformina como tratamiento

Elia, Evelin Mariel

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Elia, Evelin Mariel. (2011). Efecto del hiperandrogenismo sobre la fisiología uterina. Acción de la Metformina como tratamiento. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Elia, Evelin Mariel. "Efecto del hiperandrogenismo sobre la fisiología uterina. Acción de la Metformina como tratamiento". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

"Efecto del hiperandrogenismo sobre la fisiología uterina. Acción de la Metformina como tratamiento."

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

Lic. Elia Evelin Mariel

Director: Dra. Alicia Beatriz Motta.

Consejero de Estudios: Dr. Enrique Rodríguez.

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Fisiopatología Ovárica. Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO-CONICET-UBA).

Lugar y fecha: Buenos Aires, Agosto de 2011.

"Efecto del hiperandrogenismo sobre la fisiología uterina. Acción de la Metformina como tratamiento."

El Síndrome del Ovario Poliquístico (SOP) es una de las endocrinopatías más frecuentes en mujeres en edad reproductiva. Su característica principal es el hiperandrogenismo, condición que tiene efectos perjudiciales sobre la función endometrial, contribuyendo a las altas tasas de aborto, de hiperplasia y cáncer endometrial.

La administración de Metformina en pacientes SOP presenta numerosos beneficios aunque existe controversia sobre su efectividad para mejorar las tasas de embarazo. Además, muchas pacientes no responden a este tratamiento y en esos casos se obtienen mejores resultados al administrarla junto con Rosiglitazona.

En el presente trabajo estudiamos los mecanismos por los cuales el hiperandrogenismo altera la funcionalidad uterina y la capacidad del tratamiento con Rosiglitazona y/o Metformina de prevenir dichas alteraciones.

El hiperandrogenismo, a nivel uterino, alteró su histología, el balance apoptosis/proliferación celular, el metabolismo del ácido araquidónico, la activación de los factores de transcripción PPAR γ e incrementó el estrés oxidativo.

La administración de Metformina evitó muchas de dichas alteraciones excepto el estrés oxidativo uterino. □

La combinación Metformina+Rosiglitazona, mejoró las defensas antioxidantes.

Concluimos que esta sería una de las causas por las cuales la terapia combinada daría mejores resultados en el tratamiento de mujeres SOP, especialmente en aquellas que no responden óptimamente a Metformina.

Palabras clave: SOP, hiperandrogenismo, DHEA, Metformina, Rosiglitazona, útero, endometrio.

“Effect of hyperandrogenism on the uterine physiology. Action of Metformin therapy”

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is one of the most frequent endocrine diseases that affect women in their childbearing age. This syndrome is characterized by hyperandrogenism that shows detrimental effects on the endometrial function, contributing to the high rates of pregnancy loss, hyperplasia and endometrial cancer.

Metformin in the treatment of PCOS shows numerous benefits although there is controversy about its effectiveness to improve pregnancy rates. In addition, many patients do not respond to Metformin-treatment and in those patients better results are obtained when Metformin is administered together with Rosiglitazone.

In the present work, we studied the mechanisms by which hyperandrogenism alters uterine function and the capacity of Rosiglitazone and/or Metformin treatment/s to prevent such alterations.

Hyperandrogenism altered the uterine histology, the balance between apoptosis/cell proliferation, the arachidonic acid metabolism, the activation of the transcription factors PPAR γ and increase the oxidative stress.

The administration of Metformin avoided many of these alterations except the oxidative stress.

The combination Metformin+Rosiglitazone improved the antioxidant defenses.

We conclude that this would be one of the reasons because of the fact that the combined therapy would give better results in the treatment of PCOS women, especially in those who do not respond optimally to Metformin.

Key words: *PCOS, hiperandrogenism, DHEA, Metformin, Rosiglitazone, uterus, endometrium.*

Agradecimientos

A Alicia, por abrirme las puertas de la investigación. Por el tiempo que me ha dedicado y por lo que me ha enseñado.

A Vale por todo lo que me enseñó y por todo lo que aprendimos juntas tanto a nivel científico como personal, sin la que este trabajo no podría haber sido completado.

A Moni por ser una excelente amiga y compañera de trabajo.

A Pauli, Guille, María Gracia y Petit por TODO! Por la ayuda, la contención, el afecto, la amistad y los mates que me brindaron todos estos años.

A Denise, Caro, Emi, Romi, Kari, Sabri, Meli, María, Nora, la otra Romi, Vero y Eva por llenar de buenos momentos el día a día y por demostrarme que es posible trabajar sin que exista “competencia entre pares”.

A Carlos, por estar allí, siempre dispuesto ayudar y escuchar de manera honesta y desinteresada.

Al CEFYBO y su gente por darme el lugar para poder desarrollar la tesis y la oportunidad de conocer gente maravillosa. A Daniel del bioterio por tantas veces tanta ayuda.

A mis profesores por su dedicación, por transmitirme sus conocimientos, sus valores y el amor por esta profesión.

A la Universidad de Buenos Aires por la formación que me brindó.

Al CONICET y a laANPCyT por su apoyo económico ya sea mediante subsidios o mediante becas.

Al Dr. Luigi Devoto por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme, de ese modo, conocer a “la Pauli”, “el Alexinho” y “la Claudinha”, a quienes agradezco

profundamente por su ayuda desinteresada y por hacerme sentir que Chile era mi casa.

A Caro Pustovrh por ser una persona excepcional y de principios, una amiga con quien compartimos largas charlas personales y científicas.

A mi hermano por su inteligencia emocional, porque intento aprender de él aunque nunca se lo haya dicho.

A mis abuelos y mi madrina por ser tan generosos. Por quererme a pesar de conocer tanto lo mejor como lo peor de mí.

A Jime por haberse vuelto “Licenciada” de tanto que me escuchó SIEMPRE.

A Pato por haber estado cuando más lo necesité. Por haber hecho de un momento feo, el comienzo de una linda amistad.

A Julieta, Brenda y a Cristian por habernos elegido como parte fundamental de la familia cuando la genealogía no lo indica así.

A Mauro por sus infinitas ayudas en temas informáticos y existenciales, por el oído que siempre estuvo, a cualquier hora.

Y, finalmente, a mis padres por su apoyo eterno e incondicional. Por ser los mejores padres que pude haber tenido.

A mis padres

"Si el hombre alcanzara la mitad de los deseos que tiene, redoblaría sus inquietudes".

Benjamin Franklin

El contenido de esta tesis ha sido parcialmente publicado en:

1. Elia EM, Pustovrh C, Amalfi S, Devoto L, Motta AB. *Link between metformin and the peroxisome proliferator-activated receptor γ pathway in the uterine tissue of hyperandrogenized prepubertal mice.* Fertil Steril. 2011 Jun 30;95(8):2534-2537.e1. Epub 2011 Mar 5. PubMed PMID: 21382619.

2. Elia EM, Belgorosky D, Faut M, Vighi S, Pustovrh C, Luigi D, Motta AB. *The effects of metformin on uterine tissue of hyperandrogenized BALB/c mice.* Mol Hum Reprod. 2009 Jul; 15(7):421-32. Epub 2009 May 29. PubMed PMID: 19482906.

3. Elia E, Vighi S, Lombardi E, Motta AB. *Detrimental effects of hyperandrogenism on uterine functions.* Int Immunopharmacol. 2008 Dec 20; 8(13-14):1827-34. Epub 2008 Sep 24. PubMed PMID: 18817896.

ABREVIATURAS

15d-PGJ₂: 15-deoxy- Δ 12,14PGJ₂.

A: antro.

AA: ácido araquidónico.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ADN copia.

AMPc: adenosín monofosfato cíclico.

AMPK: proteína quinasa activada 5' monofosfato, también conocida como PRKA.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

ATP: adenosín trifosfato.

BSA: albúmina bovina sérica.

CC: citrato de clomifeno.

CG: capa de células de la granulosa.

COX: ciclooxigenasa.

cPLA₂: fosfolipasa A₂ citosólica.

CR: corona radiata.

DAB: diaminobencinida.

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole.

DHA: ácido docosahexaenoico.

DHEA: dehidroepiandrosterona.

DNAsa: endonucleasa que degrada ADN.

dNTPs: deoxi-nucleótidos tri-fosfato.

DP: receptor de prostaglandina D₂.

DTNB: 5,5'-ditio-bis-2-ácido nitrobenzoico.

d-UTP: desoxiuridina trifosfato.

E: estrógenos.

E₂: estradiol.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

EET: ácido epoxieicosatrienoico.

EP: receptor de prostaglandina E₂.

ER: receptor de estrógeno.

ESHRE-ASRM: European Society of Human Reproduction and Embryology /
American Society for Reproductive Medicine.

FA: folículo antral.

FP: receptor de prostaglandina F_{2α}.

FSH: hormona folículo estimulante.

FT: folículo terciario.

GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas.

GPX: glutatión peroxidasa.

GR: glutatión reductasa.

GSH: glutatión reducido.

GSSG: glutatión oxidado.

hCG: gonadotrofina coriónica humana.

HDL: lipoproteína de alta densidad.

HEPES: ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2'-etanesulfónico.

HETE: ácido hidroxieicosatetranoico.

HODE: ácido hidroxioctadecanoico.

HPETE: ácido hidroxiperoxieicosatetranoico.

IGF-1: Factor de crecimiento insulínico de tipo 1.

IgG: Inmunoglobulina G.

IP: receptor de prostaciclina.

IVF: fertilización *in Vitro*.

LDL: lipoproteína de baja densidad.

LH: hormona luteinizante.

LOX: lipoxigenasa.

LT: leucotrieno.

M: médula.

MMLV: virus Moloney de leucemia murino.

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

NIH/NICHD: National Institutes of Health/ National Institute of Child Health and Human Development.

NO: óxido nítrico.

NOS: óxido nítrico sintasa.

O: oocito.

P: progesterona.

PBS: buffer fosfato salino.

PCNA: antígeno nuclear de células en proliferación.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PF: folículo primario.

PG: prostaglandina.

PGI₂: prostaciclina.

PGS: prostaglandina sintasa.

PLA₂: fosfolipasa A₂.

PPAR: receptor nuclear activado por proliferadores peroxisomales.

PPRE: elemento de respuesta a proliferadores peroxisomales (PPAR)

PUFA: ácido graso poli-insaturado.

RIA: radioinmunoensayo.

ROS: especies reactivas del oxígeno.

RP: receptor de progesterona.

RPL: pérdida recurrente de la preñez.

RT: transcripción reversa.

RXR: ácido 9-cis retinoico.

s.c.: subcutánea.

SDS: dodecilsulfato de sodio

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

SF: folículo secundario.

SHBG: proteínas ligadoras de hormonas esteroides

SOD: superóxido dismutasa.

SOP: Síndrome del ovario poliquístico.

TBA: ácido tiobarbitúrico.

TCA: ácido tricloro acético.

TdT: enzima trasferasa terminal.

TNB: 5-tio-2-nitrobenzoato.

TNF- α : factor de necrosis tumoral de tipo α .

TP: receptor de tromboxano.

TUNEL: terminal deoxinucleotidyl transferase mediate deoxyuridine triphosphate
(d-UTP) end labelling

TX: tromboxano.

UI: Unidades Interenacionales.

VLDL: lipoproteína de muy baja densidad

ZP: zona pelúcida.

ÍNDICE

<i>Introducción</i>	15
1. El Síndrome del Ovario Poliquístico	16
1.1. Criterio diagnóstico.	17
1.2. Etiología.	18
1.3. Desórdenes asociados	19
1.4. Hiperandrogenismo	20
1.5. Modelos de hiperandrogenismo y SOP	20
2. El tracto reproductor femenino	22
2.1. El ovario	23
2.1.1. El ciclo ovárico	24
2.1.2. Alteraciones del ciclo ovárico en SOP	27
2.2. El útero	28
2.2.1. El ciclo endometrial	29
2.2.2. Funcionalidad uterina	30
2.2.3. Alteraciones en la funcionalidad uterina	31
2.2.4. Factores reguladores de la funcionalidad uterina	32
2.2.5. Alteraciones uterinas en SOP	41
2.3. Ciclos reproductivos	42
2.3.1. Ciclo estral	42
2.3.2. Ciclo menstrual	44
3. Tratamientos del SOP	45
3.1. Terapias farmacológicas para el tratamiento de SOP	46
3.1.1. La Metformina	47
3.1.2. Las Glitazonas	48
3.1.3. Terapias combinadas	49
<i>Hipótesis y objetivos.</i>	51
<i>Materiales y métodos</i>	53
1. Modelo Experimental	54
1.1. Animales	54
1.2. Tratamientos	54
2. Obtención de tejidos	55
3. Determinaciones experimentales	56
3.1. Cuantificación de los niveles séricos de progesterona y estradiol	56
3.2. Procesamiento del tejido uterino para la realización de técnicas histológicas	57
3.3. Actividad de la Óxido Nítrico Sintasa uterina.	59
3.4. Evaluación del balance oxidativo	60
3.5. Cuantificación de la producción de prostaglandinas E y F _{2α} uterina	63
3.6. Obtención de ARN para la realización de retro-transcripción y amplificación	64
3.7. Obtención de proteínas y realización de Western Blots	66
3.8. Marcación in situ del ADN fragmentado	69
3.9. Cuantificación de la proliferación celular	70
<i>Resultados</i>	71
Capítulo I: Efectos de la hiperandrogenización y de la Metformina	72
Ciclo estral post tratamientos	72
Efecto de los tratamientos sobre el peso corporal	72
Evaluación del peso uterino post tratamientos	73
Niveles de progesterona séricos	75
Análisis de la histología uterina	75
Evaluación del balance oxidante/antioxidante del tejido uterino	79
1. Actividad de la Superóxido Dismutasa	79

2.	<i>Concentración de Catalasa</i>	80
3.	<i>Contenido de Glutation total</i>	80
	<i>Secreción de Prostaglandinas y su modulación</i>	83
1.	<i>Niveles de PGE producida y liberada por los úteros</i>	83
2.	<i>Niveles de PGF_{2α} producida y liberada por los úteros</i>	83
3.	<i>Expresión proteica de las enzimas COX-1 y COX-2 uterinas</i>	85
4.	<i>Expresión génica de la enzima 9-Cetorreductasa en el útero</i>	85
	<i>Análisis de la expresión génica y proteica de los receptores PPARγ en el útero</i>	88
1.	<i>Expresión de la enzima 15-Lipoxigenasa en el útero</i>	90
2.	<i>Análisis de la abundancia de la enzima 12- Lipoxigenasa uterina</i>	90
3.	<i>Expresión de la Prostaglandina D Sintasa en el útero</i>	91
<u>Capítulo II: Efectos de la hiperandrogenización y del tratamiento conjunto</u>		
<u>Metformina+Rosiglitazona</u>		100
	<i>Efecto de los tratamientos sobre el peso corporal</i>	100
	<i>Evaluación del peso uterino post tratamientos</i>	100
1.	<i>Actividad de la Superóxido Dismutasa</i>	102
2.	<i>Concentración de Catalasa</i>	102
3.	<i>Contenido de Glutation total</i>	103
	<i>Discusión</i>	105
	<i>Conclusiones</i>	121
	<i>Bibliografía</i>	126

Introducción

La concepción de un hijo es uno de los deseos más comunes que experimentan las personas al llegar a la adultez. Este anhelo se ve alimentado por expectativas personales, religiosas y sociales; y el hecho de no poder alcanzarlo genera importantes consecuencias psicológicas tales como sentimientos de fracaso y exclusión debido a que en una sociedad patriarcal la reproducción es una obligación, una misión, una especie de mandato cultural. Las mujeres se visibilizan y obtienen respeto a partir de la maternidad.

La infertilidad, según la Organización Mundial de la Salud, es un desorden del sistema reproductivo definido por la incapacidad de lograr un embarazo clínico luego de 12 meses o más de mantener relaciones sexuales regularmente sin protección [1] y es considerado un tema de interés para la Salud Pública. Aunque en nuestro país no existen datos oficiales acerca del alcance de este trastorno, se estima que de manera semejante a lo que pasa en el mundo, alrededor del 9% de las parejas en edad reproductiva es infértil [2].

Existen numerosos factores, tanto femeninos como masculinos, que pueden producir infertilidad [3]; sin embargo la patología más importante asociada a la esterilidad femenina la constituye el Síndrome del Ovario Poliquístico [4].

1. El Síndrome del Ovario Poliquístico

El Síndrome del Ovario Poliquístico (SOP) es una de las endocrinopatías más frecuentes entre las mujeres en edad reproductiva, representando al 4-18% de esta población, según sea el criterio utilizado para su diagnóstico (revisado en Teede, 2010 [5]). Al analizar la población de mujeres subfértiles, estos porcentajes aumentan abruptamente, ya que el 50% de las mujeres que sufren abortos recurrentes y el 87% de las que poseen ciclos menstruales irregulares padecen SOP [6].

Los síntomas más comunes del SOP son hiperandrogenismo clínico o bioquímico, oligomenorrea o amenorrea y anovulación [7, 8].

La primera descripción del síndrome fue realizada en 1935 por Stein y Leventhal [9] quienes asociaron un cuadro clínico caracterizado por amenorrea u oligomenorrea, hirsutismo y obesidad a los ovarios poliquísticos. Desde ese momento, los estudios morfológicos e histológicos de los ovarios de estas pacientes demostraron numerosas alteraciones. En 1964, Stein demostró que la resección en cuña bilateral de los ovarios de mujeres adultas con la enfermedad provocaba la

reanudación de ciclos menstruales y en algunos casos la concepción [10]. Sobre la base de estos resultados se pensó en un defecto primario del ovario y se le asignó el nombre de enfermedad del ovario poliquístico. El reconocimiento de la heterogeneidad tanto de la histología ovárica como de los hallazgos clínicos y bioquímicos en las mujeres afectadas promovió el uso del término de Síndrome de Poliquistosis Ovárica.

1.1. Criterio diagnóstico.

Dada la alta heterogeneidad de esta patología, resultó necesario establecer los criterios que se utilizarían para diagnosticarla. Con este fin, a lo largo de los años, se realizaron diversas reuniones mundiales entre especialistas, a fines de acordar cuál es el criterio diagnóstico más adecuado a utilizarse.

A continuación se describen las conclusiones a las que se llegaron en dos las reuniones más importantes realizadas al respecto hasta la actualidad.

La primera proviene de la publicación de una conferencia de expertos del Instituto Nacional de la Salud de los EE.UU. sobre SOP en abril de 1990 (Criterios del NIH, 1990)¹ que propone tres criterios mayores (en orden de importancia) [11]: (1) hiperandrogenismo y/o hiperandrogenemia; (2) oligo- o anovulación y (3) exclusión de otras enfermedades que cursan con exceso de andrógenos: hiperplasia suprarrenal congénita, hiperprolactinemia, síndrome de Cushing, disfunción tiroidea. La presencia de ovarios poliquísticos por ecografía se consideró un criterio de gran controversia. En esencia, los resultados de esta conferencia de expertos identificaron al SOP como un desorden de exceso de andrógenos.

La segunda definición proviene de otra conferencia de expertos organizada por ESHRE/ASRM en Rotterdam en mayo de 2003 (Criterios de Rotterdam, 2003)². Este consenso determinó que el síndrome debe ser diagnosticado, después de la exclusión de otras enfermedades relacionadas y frente a dos de los siguientes tres criterios: (1) oligo o anovulación, (2) signos clínicos y/o bioquímicos de hiperandrogenismo y (3) ovarios poliquísticos por ecografía.

¹ NIH/NICHD: National Institutes of Health/ National Institute of Child Health and Human Development

² Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). Hum Reprod 19: 41-47, 2004.

La definición de SOP de Rotterdam 2003, expande la definición del NIH 1990 a dos nuevos fenotipos de SOP incluyendo a mujeres con: (1) ovarios poliquísticos y signos clínicos y/o bioquímicos de exceso de andrógenos pero sin la presencia de anovulación y (2) ovarios poliquísticos y anovulación pero sin hiperandrogenemia y/o hirsutismo (es decir sin signos de exceso de andrógenos).

La inclusión de los ovarios poliquísticos como criterio ha originado un importante debate y recientemente se han publicado posiciones en contra [12] y a favor [13] de la definición de Rotterdam.

Para conciliar estas posiciones y determinar los criterios que definen al síndrome, la Sociedad de Exceso de Andrógenos (AES) encomendó a un grupo internacional de expertos la revisión sistemática de trabajos de investigación sobre los aspectos epidemiológicos y fenotípicos del síndrome con el fin de guiar el diagnóstico clínico y las futuras investigaciones sobre SOP. Así, se publicó la última definición de SOP [14] que determina que los criterios son los siguientes: (1) hiperandrogenismo: hirsutismo y/o hiperandrogenemia, (2) disfunción ovárica: oligo-anovulación y/o ovarios poliquísticos por ecografía y (3) exclusión de otros desórdenes de andrógenos o enfermedades relacionadas. La aplicación de esta última definición identifica 9 posibles fenotipos, siendo el exceso de andrógenos una característica principal y excluye el fenotipo de ovarios poliquísticos y anovulación sin hiperandrogenemia y/o hirsutismo.

1.2. Etiología.

El SOP puede ser visto como un desorden heterogéneo asociado a diferentes grados de anormalidades metabólicas y reproductivas, determinado por la interacción de múltiples factores genéticos y ambientales.

Son numerosas las hipótesis acerca de su etiología, aunque por la diversidad de fenotipos de SOP existentes, resulta muy difícil poder establecerla con certeza. Entre los factores genéticos que han sido relacionados con el origen de esta patología encontramos: genes involucrados en la esteroidogénesis ovárica y adrenal, los efectos de las hormonas esteroideas, la secreción de gonadotrofinas, la secreción y acción de la insulina, la homeostasis y la inflamación crónica.

La alta variabilidad en los fenotipos de SOP sugiere que además de los genes, otros factores contribuirían al desarrollo de la enfermedad. Entre ellos pueden

incluirse el consumo de grasas y carbohidratos, el estrés peripuberal y la sobreexposición a hormonas. Estos factores ambientales podrían actuar en distintas etapas de la vida de la mujer, promoviendo el desarrollo de SOP [15].

Una de las teorías más aceptadas acerca del origen de esta enfermedad señala que el SOP podría tener la siguiente secuencia de origen: durante la gestación, la gonadotropina coriónica placentaria (hCG), la hormona luteinizante (LH) producida por la pituitaria fetal y los genes que regulan la foliculogénesis y la esteroidogénesis, individualmente o en conjunto, provocarían hiperandrogenismo, conduciendo así a una exposición a andrógenos en exceso durante la etapa prenatal y potencialmente prepuberal de la hembra en desarrollo. Luego, en la etapa postpuberal, la exposición temprana a un exceso de andrógenos produciría: (1) inhibición de la retroalimentación negativa para LH, provocando su anormal acumulación y (2) aumento de la adiposidad abdominal (central) que genera resistencia a insulina (incrementada por genes que regulan la diferenciación de adipocitos, la secreción y la acción de insulina). La hiperinsulinemia resultante actuaría de forma sinérgica con la hipersecreción de LH, aumentando la esteroidogénesis, e induciendo el arresto prematuro de folículos en desarrollo y la anovulación [6].

1.3. Desórdenes asociados

El SOP se halla asociado a severos desórdenes que incluyen: (1) *trastornos reproductivos*: hiperandrogenismo [6, 16], disfuncionalidad ovárica [17], fallas de la fase lútea [18, 19], fallas implantatorias, abortos recurrentes, complicaciones en el embarazo e infertilidad [20, 21]; (2) *trastornos metabólicos*: insulino resistencia [22], intolerancia a la glucosa [23], diabetes mellitus tipo 2 [24], hirsutismo [25], síndrome metabólico, riesgo cardiovascular aumentado e inflamación crónica [26] y (3) *trastornos psicológicos*: ansiedad incrementada, depresión y disminuida calidad de vida [27, 28].

Los fenotipos que se presentan entre las mujeres con SOP varían ampliamente dependiendo de sus genotipos y los factores ambientales a los que están expuestas, e incluso entre las diferentes etapas de la vida.

1.4. Hiperandrogenismo

El SOP es una patología que involucra numerosos desórdenes y que, por lo tanto, no puede ser diagnosticada mediante un único test. Sin embargo, el hiperandrogenismo es el defecto central en esta afección, a tal punto que durante una de las últimas reuniones de expertos en el tema se acordó que “el SOP, ante todo, es un desorden de hiperandrogenismo” [12]. Esta afirmación se ve sostenida por el hecho de que el 75% de la población diagnosticada con SOP es hiperandrogénica [29]. Del mismo modo, en un estudio realizado en mujeres hiperandrogénicas, se reportó que el 80% de ellas sufría SOP [30], demostrándose así la amplia relación existente entre ambas alteraciones.

El hiperandrogenismo promueve el desarrollo de afecciones como ser el hirsutismo, la alopecia androgénica, y en los casos más severos, virilización y masculinización [31]. Por otro lado, esta patología ha sido relacionada con hiperinsulinemia [32, 33], síndrome metabólico, incrementada secreción de citoquinas [34] e inflamación [35]. En lo que concierne a los desórdenes reproductivos, el exceso de andrógenos está involucrado en la alteración de los ciclos reproductivos, la oligo-anovulación, defectos de la fase lútea, pérdida de la preñez e infertilidad [19, 21, 36-40].

1.5. Modelos de hiperandrogenismo y SOP

El SOP, tal como se ha mencionado previamente, es una afección muy heterogénea, por lo que durante las últimas décadas se han utilizado numerosos modelos animales que permitieron investigar diferentes aspectos de su etiología y fisiopatología. Dado que el hiperandrogenismo es su característica central, se investigaron qué esteroides se hallaban incrementados en las mujeres con SOP, encontrándose que la dehidroepiandrosterona (DHEA) era uno de los andrógenos circulantes más abundantes en estas pacientes [41, 42]. En la figura 1 se esquematiza la cascada esteroidea, y por ende, el camino biosintético de DHEA. Este descubrimiento permitió el desarrollo de un modelo murino de SOP, mediante la administración de DHEA [43], que reprodujo tanto la sintomatología diagnóstica como muchas de las alteraciones asociadas a la patología, como lo son: la formación de quistes, el incremento en los niveles de DHEA, de testosterona y de LH [37].

Subsecuentes estudios avalaron este modelo [37-39, 44] y lo confirmaron como óptimo para el estudio de la patología quística.

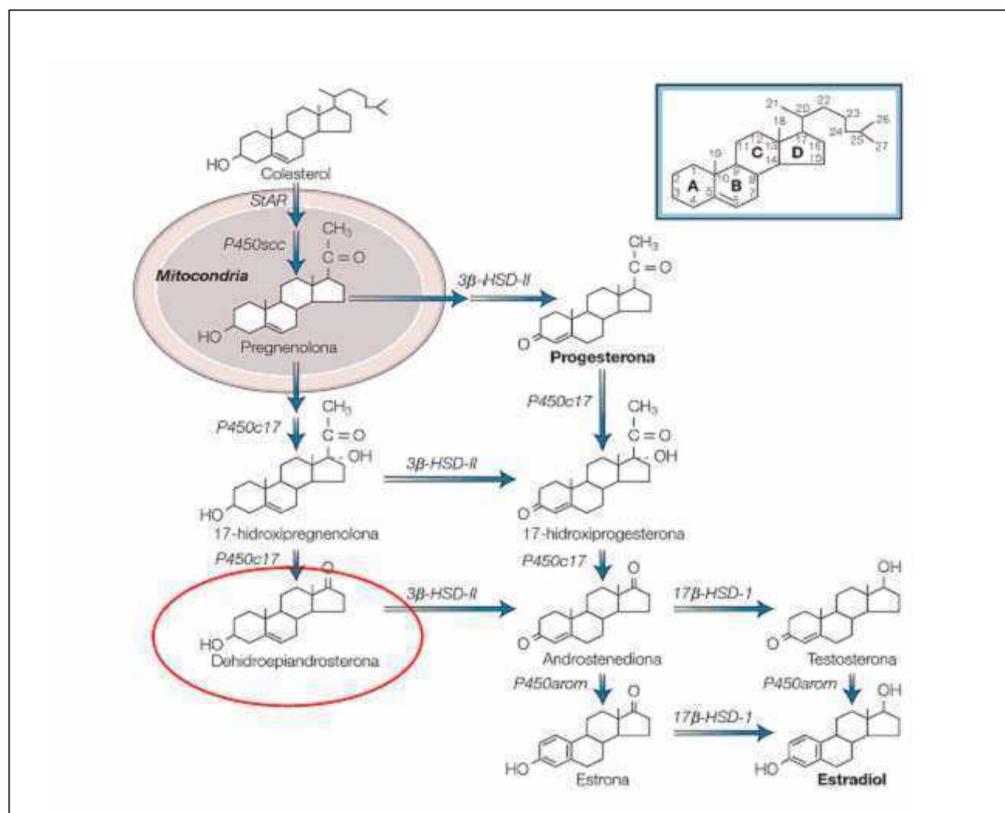


Figura 1: Vía de la esteroidogénesis en el ovario, marcando la posición de la dehidroepiandrosterona. Los cuatro anillos de las moléculas de colesterol se identifican con las 4 primeras letras del alfabeto y los carbonos se enumeran en la secuencia que se muestra en la representación. Clave de la figura, 3 β -HSD-II: 3 β - hidroxioesteroide deshidrogenasa $\Delta^{5,4}$ isomerasa tipo II, 17 β -HSD-I: 17 β - hidroxioesteroide deshidrogenasa tipo I, P450arom: citocromo P450 aromatasa, P450c17: 17 α -hidroxilasa/17,20- liasa, P450scc: citocromo P450 de corte de cadena lateral, StAR: proteína reguladora de la esteoidogénesis aguda. Adaptado de Kronenberg, 2009 [45].

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio, se encontró que la administración de DHEA en ratones prepúberes hembras de la cepa BALB/c induce la formación de quistes de ovario, aumenta la producción de esteroides e insulina, modifica el balance oxidante-antioxidante, el sistema óxido nítrico (NO)/NO sintetasa (NOS), la secreción ovárica de prostaglandinas, el contenido sérico del factor de crecimiento tumoral (TNF- α) y regula la expresión fenotípica de linfocitos T, tanto en el ovario como en los ganglios retroperitoneales [46-48].

Asimismo, con el objetivo de investigar los efectos del exceso de andrógenos durante el embarazo, se desarrolló un modelo de hiperandrogenización aguda con DHEA durante la preñez temprana en ratones de esta misma cepa, evaluando sus efectos en la etapa peri y post-implantatoria.

La administración de DHEA promovió la disminución de los niveles circulantes de progesterona en ambas etapas, impidiendo la implantación embrionaria en la primera y aumentando el índice de reabsorción embrionaria en la segunda [49]. Los mecanismos por los cuales induce estos efectos estarían asociados a un aumento del estrés oxidativo, hiperinsulinemia, disminución de la NOS, alteración del perfil de citoquinas Th1/Th2 y modulación de las prostaglandinas, entre otros [50, 51]. Estos resultados sugieren que el exceso de andrógenos generaría numerosas alteraciones en la funcionalidad del cuerpo lúteo y/o del útero que no sólo podrían afectar el normal desarrollo de la preñez, sino que también estarían implicadas en la pérdida de la ciclicidad ovárica y podría ser el origen de las alteraciones uterinas descritas en las pacientes SOP.

A pesar de la relevancia de esta hipótesis en lo que respecta a la fisiopatología del hiperandrogenismo, son muy pocas las investigaciones llevadas a cabo acerca de la funcionalidad uterina en SOP.

2. El tracto reproductor femenino

Los órganos que conforman el aparato reproductor femenino son comunes a todos los mamíferos, a pesar de que existen algunas diferencias entre taxones. En ratones, el sistema reproductor comprende los ovarios, los oviductos, el útero bicorne y la vagina (figura 2).

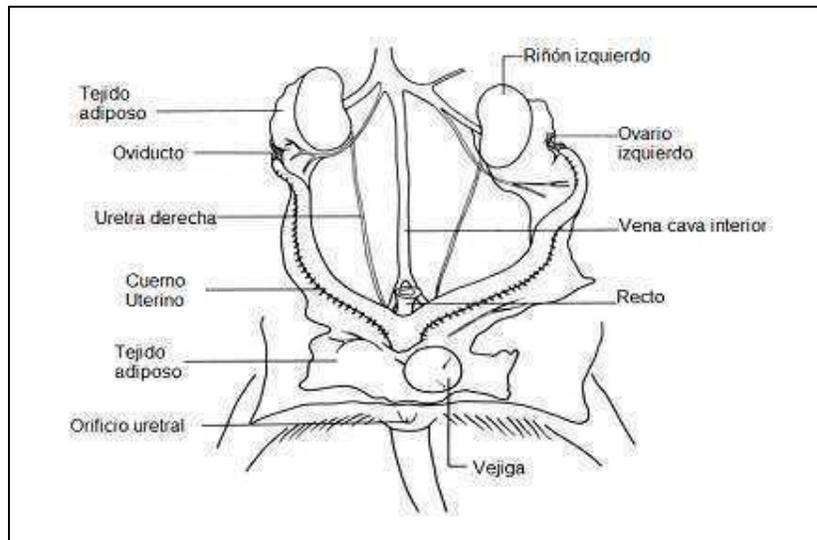


Figura 2: Sistema urogenital femenino en el ratón. Fuente: Cook, 1965 [52].

2.1. El ovario

El ovario (lat. *ovum*, huevo; gr. *ooforon*) o gónada femenina posee dos funciones principales; la primera de ellas es la producción de células germinales (oocitos) que permite la continuidad de la especie, y la segunda radica en la generación de moléculas bioactivas, principalmente esteroides (estrógenos y progestágenos) y factores de crecimiento, que resultan cruciales para la funcionalidad ovárica, la regulación del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal y el desarrollo de características sexuales secundarias [53].

En los ratones hembras, el ovario se divide en dos secciones bien diferenciadas: la corteza periférica y la médula central (figura 3). En ratonas sexualmente maduras, la corteza contiene numerosos folículos en distintos estadios de desarrollo y cuerpos lúteos. La médula, en cambio, ubicada en la zona central del ovario, se encuentra muy innervada y posee una importante vasculatura.

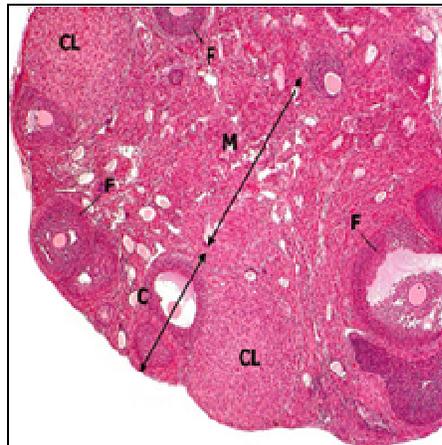


Figura 3: Sección de ovario de ratón donde se diferencian la médula (M), la corteza (C), folículos (F) y cuerpos lúteos (CL), tinción con hematoxilina- eosina, A: 40X.

2.1.1. El ciclo ovárico

La formación de gametas femeninas (oogénesis) es un proceso que ocurre en el ovario y que en la mayoría de las hembras de mamíferos se inicia en la vida intrauterina.

En el humano, los folículos comienzan a formarse en el cuarto mes de vida fetal y si bien algunos de ellos inician su crecimiento de inmediato, la mayoría permanecerá en un estado de reposo hasta el momento en que degeneren, o sea reclutado y comience a crecer. Esta población es denominada población de “folículos arrestados”. Se definieron tres tipos de folículos arrestados: primordiales (oocito rodeado por una capa de células de la granulosa aplanadas), intermedios (oocito rodeado por una capa mixta de células de la granulosa aplanadas y cúbicas) y primarios pequeños (oocito rodeado por una capa de células cúbicas).

En la pubertad, comienza la foliculogénesis cuando los folículos dejan esta población e ingresan en la fase de crecimiento (reclutamiento). De allí en adelante, el folículo atraviesa un proceso de desarrollo que incluye la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa y el incremento en tamaño del oocito. Durante el crecimiento, se forma la zona pelúcida alrededor del oocito y progresivamente los folículos se convierten en folículos secundarios. En esta etapa

del desarrollo las células del estroma ovárico que rodean la lámina basal se alinean formando la capa de células de la teca [54].

Los dos primeros estadios de desarrollo, folículos primarios y secundarios (figura 4A), son de crecimiento autónomo, es decir, poco influenciados por las hormonas plasmáticas. Esto sucede, en primer término, porque se encuentran en una zona poco vascularizada y, en segundo término, por la baja expresión de receptores para dichas hormonas.

La continuidad de su desarrollo está relacionada con la migración del folículo a una zona vascularizada, la diferenciación de dos zonas en la capa de la teca-la teca interna y la externa- y la aparición de receptores para la hormona folículo estimulante, el estradiol (E_2) y la testosterona en las células de la granulosa. Así, éstas últimas expresan receptores para FSH y las células de la teca, receptores para LH.

El folículo terciario o antral (figura 4B) contiene varias capas de células de la granulosa, debido a la acción proliferativa de FSH, y ambas capas de células de la teca. Finalmente se forma el antro, una cavidad que posee fluido folicular. El oocito queda ubicado de manera excéntrica, rodeado por un conjunto de células de la granulosa, el cúmulo oóforo, que protruye dentro del antro. Las células de la granulosa que rodean inmediatamente al oocito forman una estructura denominada corona radiata. Como resultado del efecto estimulador de las gonadotropinas que llegan por los capilares al folículo en desarrollo, un pequeño número de folículos terciarios ingresan en el estadio preovulatorio, aumentan enormemente de tamaño y se transforman en folículos de De Graaf (figura 4C).

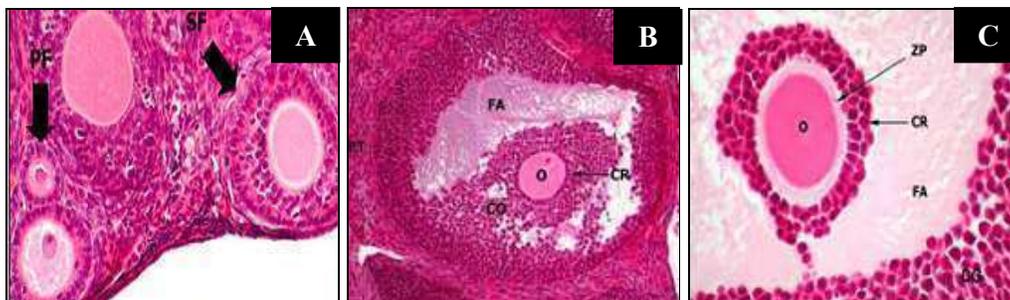


Figura 4: Etapas del desarrollo folicular, tinción con hematoxilina-eosina. **(A)** Folículos primarios (PF) y secundarios (SF), A: 200X. **(B)** Folículo terciario (FT), A: 200X. **(C)** Folículo de Graaf, A: 400X. Clave de la figura: FA: antro folicular, CO: cúmulo oóforo, CR: corona radiata, O: oocito, ZP: zona pelúcida, CG: capa de células de la granulosa.

Durante la etapa de maduración folicular y bajo la influencia de LH y FSH, los folículos producen y liberan estrógenos, predominantemente estradiol. Esta síntesis ocurre gracias a la acción coordinada de las células de la teca y de la granulosa. En este proceso coordinado, los andrógenos sintetizados por las células tecales, son aromatizados a estrógenos en las células de la granulosa. Mientras que la LH estimula a las células tecales para producir andrógenos, la FSH aumenta los niveles de aromatasa promoviendo su conversión a estradiol [55]. La compartimentalización de la producción esteroidea en el folículo ovárico se halla esquematizada en la figura 5.

Los niveles circulantes de estradiol aumentan progresivamente, acompañando el crecimiento de los folículos, llegando hasta un nivel crítico que activa el centro cíclico hipotalámico. Esto resulta en la liberación de un pulso de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), seguido de uno de LH, el cual desencadena la ovulación y la posterior formación del cuerpo lúteo.

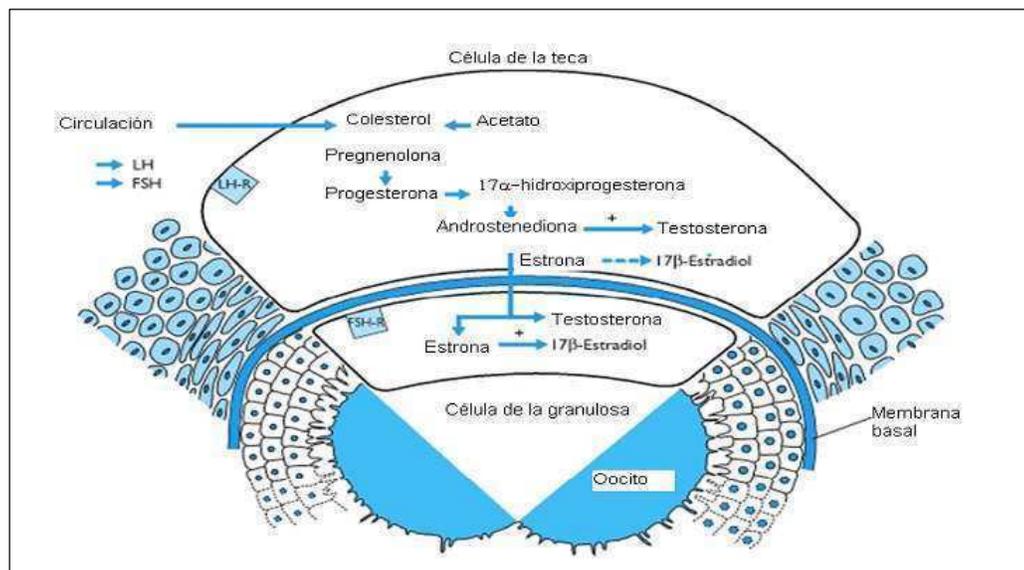


Figura 5: Principal ruta esteroidogénica en el folículo ovárico. La androstenediona, formada en las células de la teca bajo la acción estimuladora de la LH, difunde a través de la membrana basal hacia las células de la granulosa, donde bajo la acción de la FSH, es convertida a estradiol. En los folículos en desarrollo los receptores de LH se expresan sólo en las células de la teca, mientras que los de FSH sólo lo hacen en las células de la granulosa. El folículo preovulatorio desarrolla receptores de LH en las células de la granulosa de manera previa al pico de LH. Las células de la teca adquieren la capacidad de sintetizar estradiol (líneas punteadas), la cual persistirá cuando estas células se incorporen al CL (Figura adaptada de Nussey, 2001 [56]).

2.1.2. Alteraciones del ciclo ovárico en SOP

La anovulación o la oligo-ovulación son síntomas muy frecuentes entre las mujeres con SOP y la oligomenorrea o amenorrea se presentan muy tempranamente en la adolescencia [57]. Aunque son múltiples los factores que intervienen en la disfuncionalidad ovulatoria en SOP, existe consenso entre los investigadores al señalar al hiperandrogenismo como la causa subyacente de dichas irregularidades.

Los efectos del hiperandrogenismo sobre la foliculogénesis son complejos e involucran la modulación de factores tanto ováricos como sistémicos que han sido ampliamente revisados en los trabajos [17, 57, 58]. Brevemente, se ha demostrado que el hiperandrogenismo acelera la progresión de folículos primordiales y primarios a preantrales y antrales, a la vez que reduce el índice de atresia en los folículos tempranos [59-61].

En los casos en los cuales las mujeres con SOP no logran ovular, se cree que en el comienzo de la selección folicular, poseen un mayor número de folículos de alta sensibilidad a FSH o “maduros”, por lo que se produce el arresto folicular y la anovulación. Esto sucede debido a que adquirieron muy rápidamente la capacidad de secretar estradiol, suprimiendo la maduración de los folículos vecinos (arresto folicular) e impidiendo la selección del folículo dominante. Sin un folículo dominante, capaz de liberar al oocito en respuesta al incremento de LH, no se produce la ovulación ni el normal proceso de retroalimentación negativa necesario para inhibir la secreción de ésta gonadotropina. Bajo el estímulo trófico de las gonadotropinas, los folículos arrestados continúan secretando hormonas, que se acumulan en el antro y devienen en la formación de quistes.

Sin embargo, no todas las mujeres con SOP presentan ciclos anovulatorios. En estos casos, se cree que al inicio del ciclo la mayor parte de los folículos son de baja sensibilidad, de manera que aquel que logre superar el umbral de secreción de estradiol más velozmente, será seleccionado para la ovulación suprimiendo al resto de los folículos que regresarán por atresia.

El hecho de que existan distintos fenotipos ovulatorios en SOP, permite plantear la hipótesis de que en el ovario poliquístico coexisten poblaciones foliculares de alta y baja sensibilidad a gonadotropinas, que podrían estar moduladas por factores extra e intra-ováricos, y cuyo balance determinará periodos alternados de arresto folicular y ovulación [17].

2.2. El útero

El útero (lat *utērus*, vientre) es el mayor de los órganos del aparato reproductor femenino de la mayoría de los mamíferos y representa el órgano de la gestación. También se lo conoce como matriz o seno materno. Es el órgano encargado de acoger al óvulo fecundado y albergar al feto durante el embarazo hasta que es expulsado durante el parto.

Ontológicamente, el útero proviene de los conductos paramesonéfricos. El grado en el que se fusionan dichos ductos difiere entre los diferentes taxones (Figura 6). Como en el caso de los humanos, pueden fusionarse casi por completo, donde la porción no fusionada originará a las trompas uterinas y la fusionada dará lugar a un útero simple (Figura 6, panel inferior izquierdo). En el caso de los roedores, los conductos se fusionan muy caudalmente poco antes de conectar con la vagina, originándose un útero bicorne con la peculiaridad que poseen 2 cuellos uterinos, uno para cada cuerno, comunicados entre si por una sola vagina (Figura 6, panel superior derecho).

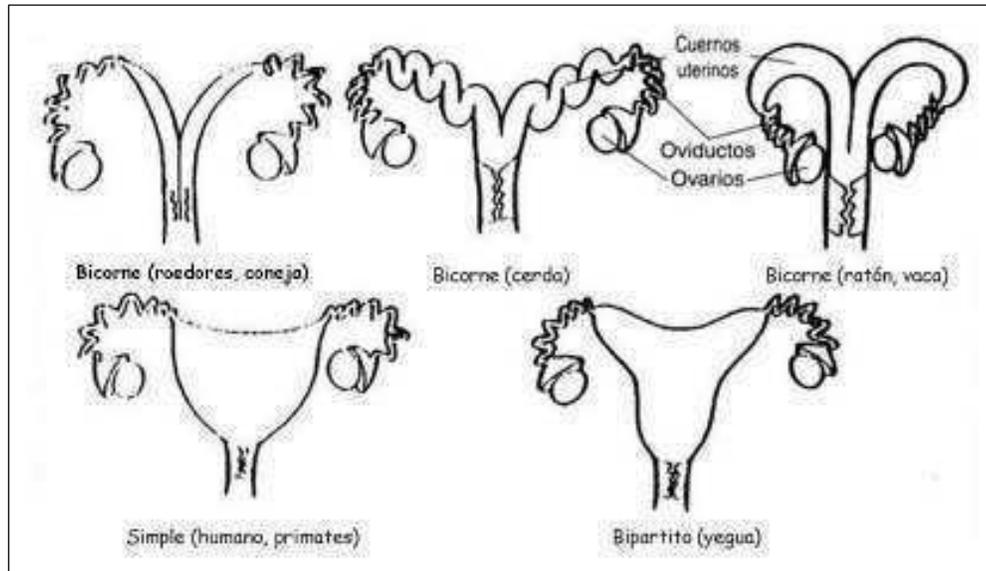


Figura 6: Morfología uterina en los diferentes animales. Notese la morfología del útero humano (panel inferior izquierdo) y la del ratón (panel superior derecho). Fuente: <http://nongae.gsnu.ac.kr/~cspark/teaching/chap2.html> [62]

Desde el punto de vista histológico, el útero está constituido por endometrio, miometrio, y perimetrio (Figura 7). El endometrio es una mucosa que rodea la cavidad uterina; como toda mucosa está constituido por un epitelio y un estroma. Está, a su vez, se ve cubierto por una capa de musculatura lisa, el miometrio, que representa la mayor parte del espesor de la pared uterina. Por último, se encuentra la serosa, el peritoneo, que en el útero se denomina perimetrio [63].

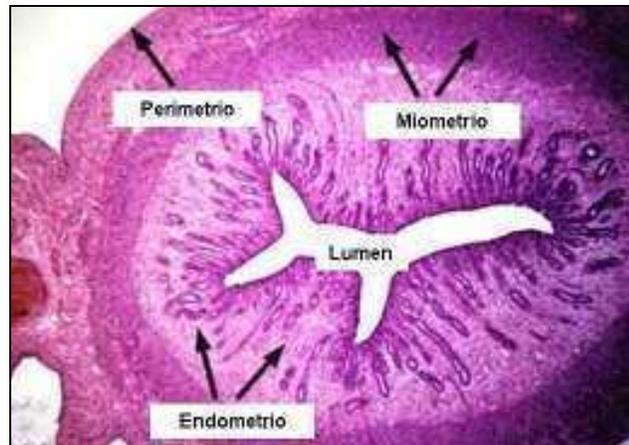


Figura 7: Sección del útero de ratón donde se diferencian el lumen, rodeado del endometrio, que se ve cubierto por el miometrio y éste, a su vez por el perimetrio; tinción con hematoxilina- eosina, A: 40X.

2.2.1. El ciclo endometrial

El útero es un órgano blanco fundamental de las hormonas ováricas. Bajo la acción de los estrógenos (E) y la progesterona (P_4) el endometrio experimenta modificaciones estructurales cíclicas. El ciclo se divide en dos fases principales: la fase proliferativa y la secretora.

Al comienzo de la fase proliferativa la mucosa endometrial se encuentra adelgazada y con escasa cantidad de glándulas. La fase proliferativa es paralela a la fase folicular ovárica, que será descrita con más detalles en lo sucesivo, y bajo la influencia de los E el grosor del endometrio aumenta y comienzan a formarse glándulas endometriales.

La fase secretora está influenciada por la producción de P_4 llevada a cabo por el cuerpo lúteo. En esta etapa, el grosor endometrial no aumenta, las glándulas

adquieren un aspecto tortuoso y comienzan a producir secreciones ricas en nutrientes, preparándose de este modo para la implantación embrionaria.

Si no se produce fecundación, el cuerpo lúteo involuciona, disminuyendo los niveles hormonales. Esto produce la regresión de los elementos que habían sufrido un desarrollo dependiente de las hormonas.

2.2.2. Funcionalidad uterina

El útero cumple numerosas funciones en el proceso reproductivo, aún en ciclos no conceptuales. Sin embargo, su función primordial es la de acoger al embrión y permitir su implantación. Para lograrlo, el endometrio debe transformarse durante la mitad de la fase secretora en receptivo, lo cual depende de una fina coordinación de todas las modificaciones y eventos que tienen lugar a lo largo del ciclo.

La receptividad endometrial consiste tanto en la adquisición de ligandos adhesivos, la pérdida de componentes inhibitorios que pudieran actuar como barrera para la adhesión del embrión [64], así como también la expresión coordinada de diversas moléculas proteicas que son producidas en respuesta a estímulos endocrinos (especialmente esteroides ováricos), paracrinos y / o autocrinos desde el inicio de la fase proliferativa del ciclo.

Debido a la complejidad del proceso, cualquier alteración en alguno de estos mecanismos puede conducir a la asincronía entre el ciclo ovárico y el uterino, complicando de este modo la posible implantación embrionaria y/o la prosecución de esa gestación. Si, por el contrario, el endometrio se encuentra receptivo y, además, se produce fecundación, se procede a la implantación de ese embrión en el endometrio materno.

La implantación embrionaria representa uno de los pasos más críticos en el proceso reproductivo para muchas especies. Es un fenómeno biológico único por el cual el blastocisto se conecta íntimamente con la superficie endometrial de la madre para formar la placenta que será una interfase entre el feto en crecimiento y la circulación materna [64, 65]. Para que la implantación sea exitosa se requiere un endometrio receptivo, un embrión normal y funcional en etapa de blastocisto y un diálogo sincronizado entre los tejidos maternos y los embrionarios [66].

2.2.3. Alteraciones en la funcionalidad uterina

Las fallas en el proceso de implantación son un problema sin resolver en la medicina reproductiva y son consideradas la mayor causa de infertilidad en mujeres sanas. De hecho, aproximadamente el 30% de los embriones concebidos espontáneamente no logran implantarse, mientras que en el caso de los embriones obtenidos por fertilización *in vitro* (IVF), este número asciende a más del 50% [67].

Se ha visto que las dos terceras partes de las fallas de implantación se deben a una inadecuada receptividad uterina, mientras que los problemas embrionarios sólo son responsables de un tercio de las fallas [68, 69]. Esto puede deberse, en parte, a que en los más de 30 años de historia de las técnicas de fertilización asistida se ha progresado mucho en el mejoramiento de la calidad embrionaria y muy poco en los marcadores de receptividad endometrial. Los mecanismos exactos que regulan y controlan la implantación siguen siendo desconocidos, pero existen evidencias que permiten concluir que el endometrio juega un papel más que activo en éste proceso [70, 71].

Una de las razones por las que no se conoce el papel del endometrio en la implantación es por la dificultad para estudiarlo. Aún cuando las evaluaciones histológica y molecular serían el estándar de oro, el hecho de tener que tomar una biopsia endometrial en el ciclo de tratamiento, lo hace poco práctico y cuestionable desde el punto de vista ético.

Un mayor entendimiento de los mecanismos que regulan la implantación embrionaria permitiría desarrollar mejoras en el tratamiento de la infertilidad así como prevenir la pérdida temprana de la preñez.

Por otro lado, existen alteraciones de la funcionalidad uterina que no involucran alteraciones en el proceso de implantación embrionaria. Por ejemplo, entre el 1 y el 2% de las parejas experimentan pérdidas recurrentes de la preñez (RPL), definido en Europa como la ocurrencia de 3 ó más abortos consecutivos [72, 73]. En la clínica, el aborto, ya sea esporádico o recurrente, es considerado un desorden dicotómico atribuido ya sea a anomalías cromosómicas, del desarrollo del embrión o a factores uterinos.

Aunque numerosos factores (como anatómicos, endócrinos, inmunológicos, trombofílicos, genéticos, etc.) han sido evocados para explicar los abortos no

cromosómicos, ninguno de ellos es específico ni prevalente hasta la actualidad [72, 73].

2.2.4. Factores reguladores de la funcionalidad uterina

El endometrio es un tejido sumamente dinámico, que a lo largo del ciclo reproductor sufre cambios muy marcados que le permiten generar una ventana temporal de receptividad para que pueda ocurrir la implantación del blastocisto [74].

Durante décadas, numerosos grupos de trabajo investigaron los mecanismos involucrados en la receptividad endometrial, ya sea en modelos animales y/o en humanos. Particularmente, desde el descubrimiento de las técnicas de *microarray* fueron muchos los estudios que se focalizaron en evaluar la expresión génica endometrial humana en condiciones fisiológicas y patológicas. Estos estudios generaron una gran cantidad de información acerca de la regulación o desregulación de los genes presentes en la ventana de implantación tanto en condiciones refractarias, fértiles como en infértiles. Sin embargo, las moléculas y los mecanismos claves para que el endometrio se encuentre receptivo continúan sin conocerse. Entre los numerosos factores involucrados en la funcionalidad uterina, describiremos a continuación algunos de los más importantes descritos hasta la actualidad.

2.2.4.1. Esteroides ováricos

Como se ha mencionado en la sección “el ciclo endometrial”, la receptividad endometrial se encuentra regulada, entre otros factores, por las hormonas P₄ y E [75]. Aunque P₄ y E son los principales moduladores de la maduración endometrial, su actuación en este proceso es compleja [76].

Los receptores de dichos esteroides se activan por unión al ligando y funcionan como factores de transcripción, regulando la expresión de numerosos factores [77]. El desarrollo del endometrio, sus componentes: estroma, epitelio, y sus vasos, sufren importantes cambios en respuesta a las hormonas esteroideas provenientes del ovario.

En ausencia de estímulo esteroideo el endometrio tiene un grosor mínimo, formado por un estroma denso, entre el que existen pequeñas invasiones epiteliales glandulares, con unas células cúbicas.

Los E inducen el crecimiento progresivo en grosor de esta mucosa, mediante el estímulo de la mitosis tanto de las células del estroma como del epitelio. Los efectos del E sobre la proliferación celular pueden ser directos (activando la transcripción de genes específicos) o el resultado de interacciones paracrinas entre células epiteliales y estromales. A medida que aumenta el estímulo estrogénico las glándulas se desarrollan más y comienzan a curvarse [78, 79]. Los E, además, regulan la vascularización endometrial [80]. Estos son los fenómenos que ocurren en la fase proliferativa endometrial, que coincide con la fase folicular del ovario.

El inicio de la secreción de P₄ produce cambios en las células del estroma y del epitelio, marcados por la disminución progresiva de la mitosis, y la aparición de la secreción glandular. La progresión de este estímulo provoca la decidualización del estroma y la aparición peri-vascular de linfocitos granulares, células natural killers (NK). Se forman también proteínas que promueven la hemostasia y la fibrinólisis.

Los progestágenos contrarrestan los efectos proliferativos de los estrógenos por medio de la reducción de sus receptores, el aumento en la tasa de metabolismo del E₂ a compuestos inactivos (estrona y metabolitos sulfatados) y la interferencia con las acciones transcripcionales de los estrógenos [81]. Estos cambios forman la fase secretora del endometrio que coincide con la fase peri-ovulatoria y lútea del ciclo ovárico. Debido a todo lo mencionado, el defecto o exceso de ambas hormonas induce una alteración en la receptividad endometrial y, por lo tanto, del proceso de implantación, si ocurriera fecundación.

Si se produce gestación, el cuerpo lúteo se mantiene funcional y, consecuentemente los niveles hormonales continúan siendo elevados.

Por el contrario, si no se produce gestación, el cuerpo lúteo involuciona y los niveles de hormonas esteroideas caen, lo que llevará a la degradación del endometrio. En este proceso se encuentran involucrados numerosos factores, entre los que cabe destacar a la actividad de los lisosomas. Éstos, en respuesta a la caída de las hormonas esteroideas, vierten su contenido enzimático e hidrolizan la sustancia fundamental del endometrio, promoviendo la degradación del colágeno. Uno de los factores consecutivos de la rotura lisosómica es la liberación de fosfolipasa A2 (PLA2), lo que permitirá un suministro constante de ácido araquidónico (AA) a la vía biosintética de la cicloxigenasa y lipoxigenasa [82], como se detallará en lo sucesivo en el presente trabajo.

2.2.4.2. Cascada del ácido araquidónico

Como acaba de describirse, la expresión de diferentes moléculas involucradas en el metabolismo del AA, se ve influenciada por los esteroides ováricos; es por ello, que describiremos esta vía con más detalles.

La mayoría de las células de mamífero tienen cantidades importantes de AA esterificado en la posición sn-2 de los glicerofosfolípidos de las membranas. Este compuesto es ingerido con la dieta u obtenido a partir de la metabolización de dos ácidos grasos esenciales, el ácido linoleico y el ácido α -linolénico. En ausencia de estímulos, la concentración celular de AA libre es muy baja. Sin embargo, en respuesta a estímulos físicos, químicos o mecánicos, que pueden variar de un tipo celular a otro, lipasas específicas pueden liberar al AA, que posteriormente será oxidado por los enzimas de la cascada del AA.

Las características moleculares del AA y en particular la presencia de cuatro dobles enlaces en posición *cis* lo hacen susceptible de reaccionar con la molécula de oxígeno. Esto puede ocurrir de manera no enzimática, contribuyendo al estrés oxidativo mediante la formación de isoprostanos, o a través de la acción de tres tipos de oxigenasas: las ciclooxigenasas (COXs) que dan lugar a compuestos como las prostaglandinas (PGs) y los tromboxanos (TXs), las lipoxigenasas (LOX) que dan lugar a los ácidos hidroxieicosatetraenóicos (HETEs) y a los leucotrienos (LTs), y las epoxigenasas o citocromos P450 que originan ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs) e isómeros de los HETEs (Figura 8). Estas diferentes vías de señalización celular se encuentran distribuidas de forma variable entre los diferentes tipos celulares y se activan en respuesta a estímulos de naturaleza variada, transformando el AA a eicosanoides, metabolitos que ejercen potentes acciones biológicas muy localizadas y de amplio espectro.

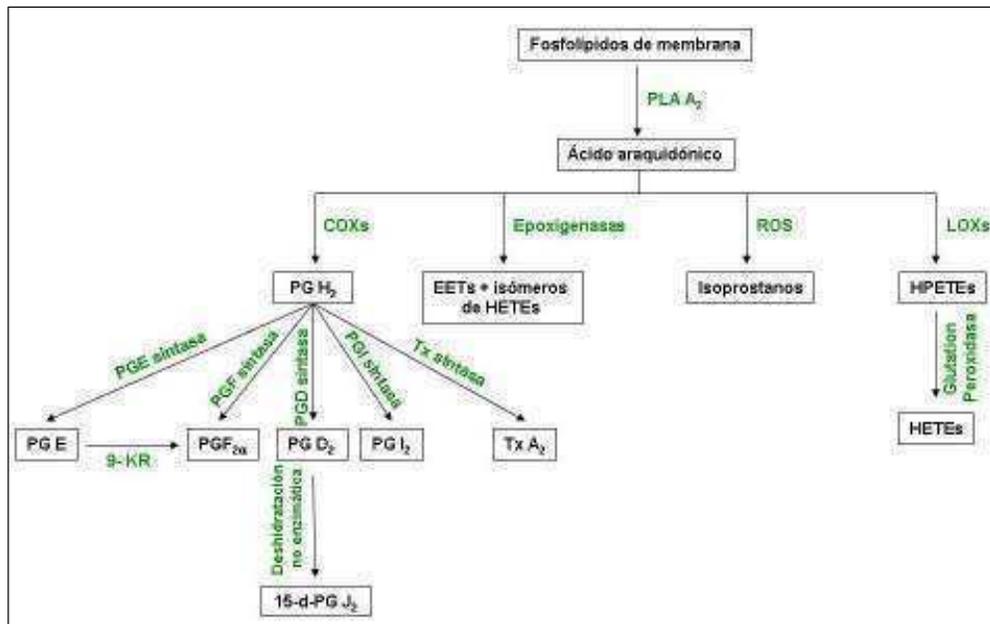


Figura 8: Principales metabolitos formados a partir del AA. PLA₂: fosfolipasa A₂; COX: ciclooxigenasa; ROS: especies reactivas del oxígeno; LOX: lipoxigenasa; PG: prostaglandina; Tx: tromboxano; 9-KR: 9-cetorreductasa; EET: ácido epoxieicosatrienoico; HPETE: hidroperóxidos lipídicos; HETE: ácidos hidroxeicosatetraenicos.

➤ Vía de las ciclooxigenasas

Frente a diversos estímulos tales como citoquinas, factores de crecimiento o trauma mecánico, la forma citosólica de la PLA₂ (cPLA₂) libera AA de los fosfolípidos de membrana, que será luego oxidado y reducido por las COXs.

Se conocen dos isoformas de la COX: COX-1 y COX-2 [83, 84] aunque se ha descrito una tercer isoforma, conocida como COX-3, pero se ha descrito que ésta es solo una variante de la COX-1 [85]. Mientras que la expresión de COX-1 es constitutiva y media funciones fisiológicas, la COX-2 es inducible por factores de crecimiento, citoquinas, oncogenes y estímulos inflamatorios [83, 86].

Las COXs catalizan la conversión de AA en prostaglandina H₂ (PGH₂). Ésta servirá subsecuentemente como sustrato para las PG sintasas (PGS) para la generación de las cuatro PGs: PGD₂, PGE₂, PGF_{2α} y PGI₂.

Las enzimas PGS son denominadas en función de la PG que producen; la prostaglandina D sintasa (PGDS) genera PGD₂ [87], la prostaglandina E sintasa

(PGES) genera PGE_2 [88], la prostaglandina F sintasa (PGFS) genera $PGF_{2\alpha}$ [89] y la prostaglandina I sintasa (PGIS) genera PGI_2 [90] (Figura 8).

Las PGs pueden ejercer efectos autocrinos o paracrinos, al unirse a receptores específicos que están acoplados a proteínas G que tienen siete dominios transmembrana. Se han descrito cuatro receptores para la PGE_2 (EP_1 - EP_4), dos en el caso de la PGD_2 (DP_1 y DP_2), y un receptor al que se une la $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 , y tromboxano A_2 (FP, IP, y TP, respectivamente) [91]. Las PGs también pueden unirse a receptores nucleares como los receptores nucleares activados por proliferadores peroxisomales (PPAR)- γ y regular, por ejemplo, procesos inflamatorios [92].

En el endometrio secretor humano con ciclo normal, la PG que más se sintetiza es la $F_{2\alpha}$ seguida de la E_2 y D_2 . La PG I_2 se sintetiza más en el miometrio pero bajo el estímulo endometrial.

Estos eicosanoides modulan diversas respuestas fisiológicas y patológicas en el tracto reproductor. Al ser factores vasoactivos, las PGs juegan un papel importante en los procesos de ovulación, fertilización, hemostasis uterina y en la etapa final de la preñez, generando el comienzo del trabajo de parto [93-101]. Más recientemente, se ha demostrado que las PGs son cruciales regulando a proliferación endometrial [102] y la implantación embrionaria.

Comenzó pensándose que las PGs podrían estar involucradas en la implantación embrionaria debido a que este proceso puede ser considerado una reacción inflamatoria [103, 104] dado que la adhesión y la invasión al endometrio requiere la conexión al sistema vascular materno. Con el transcurso de los años, la importancia de las PGs regulando el proceso implantatorio fue rectificado por otros grupos de trabajo [105, 106] dado que se vieron involucradas en diversos eventos reproductivos que afectarían, finalmente, al éxito reproductivo. Por ejemplo, se ha descrito que la producción y liberación de PGs cambia a lo largo del ciclo estral. Se sabe que la $PGF_{2\alpha}$ uterina induce la regresión del cuerpo lúteo durante la etapa luteal del ciclo estral en muchas especies [107]. En cerdos, se detectan concentraciones elevadas de $PGF_{2\alpha}$ en la vena útero-ovárica en los días 12-13 post-ovulatorio [108]. La PGE_2 exhibe una acción opuesta a la $PGF_{2\alpha}$ dado que mantiene la función lútea durante la preñez temprana [109, 110].

En numerosas especies, el tratamiento con inhibidores de la síntesis de PGs evita o retrasa la implantación [111]. Más aún, ratones hembra carentes de las

enzimas cPLA₂ o de COX-2, y por ende de PGs, presentaron numerosos defectos de implantación. En estudios llevados a cabo por el grupo de Lim [112] no se produjo la implantación embrionaria de blastocistos sanos en ratones carentes de COX-2. Más aún, dichos animales mostraron ser infértiles [113].

Por otro lado, ratones knock out para la enzima cPLA₂ presentaron fallas en la preñez y crías con bajo peso al nacer, luego de haberse producido retraso en la implantación embrionaria. Mientras que la administración exógena de PGs restauró la implantación al tiempo correcto [105, 106]. Se vio que esos efectos dependen de la inhibición en la producción uterina de PGs y no de un efecto sobre las PGs ováricas o embrionarias [111, 114]. En este sentido, se ha descrito que en humanos la implantación embrionaria retrasada resulta en un incremento en la pérdida de la preñez temprana [115], lo que nos lleva a pensar que alteraciones en la cPLA₂ o en su cascada de señalización podrían ser las responsables del retraso en la implantación embrionaria y, consecuentemente, de la pérdida de la preñez, en estos casos.

➤ Vía de las lipoxigenasas

Las LOXs son una familia de enzimas citosólicas que incorporan una molécula de oxígeno en la estructura molecular del AA. La actividad LOX fue descrita inicialmente en plantas como la soja (*Glycine max*) de la cual se han llegado a caracterizar hasta 8 LOXs diferentes [116].

En mamíferos existen, mayoritariamente, tres LOXs que oxidan el AA a la altura del carbono 5 (5-LOX), 12 (12-LOX) o 15 (15-LOX).

Los principales productos de la 5-LOX son los LTs mientras que la 12- y la 15-LOX producen hidroperóxidos lipídicos (HPETEs): 5-HPETE, 12-HPETE y 15-HPETE [117]. Los hidroperóxidos son altamente inestables y reactivos. Son transformados por la glutatión peroxidasa a los correspondientes ácidos hidroxieicosatetraenóicos (HETE) que son los primeros compuestos derivados de las LOXs con actividad biológica [118, 119]. Se sabe que ejercen sus efectos al unirse a los receptores nucleares activados por los proliferadores peroxisomales, PPAR γ .

Se ha descrito que los LTs estimulan la contractibilidad miometrial [120]. Además, se produce un incremento en la expresión de LOX al inicio del trabajo de

parto y las fallas en la inducción del trabajo de parto están asociadas a expresiones disminuidas de LOX [121].

Por otro lado, se ha demostrado que si se inhiben las enzimas 12- y 15-LOX, se produce la disminución de la tasa de implantación, mientras que la administración de rosiglitazona (ligando sintético de los receptores PPAR γ) restaura la tasa de implantación [122]. La expresión de las LOXs, además, se ha visto alterada cuando se estudió cuales eran los genes afectados luego del tratamiento con el antiprogéstágeno RU486. Éste se une al receptor de P₄, imposibilitando que dicha hormona lo haga normalmente y por ende impidiendo la regulación génica que ejercida por la P₄ y la consecuente preparación del endometrio para la unión del blastocisto. Se observó que dicho tratamiento inhibe la implantación y se detectó que dos de los genes que se ven alterados son los de la 12/15-LOX epidérmicas y leucocitarias, señalando su importancia en el endometrio al momento de volverse receptivo [122].

12-Lipooxigenasa

Existen 3 isoformas de la 12-LOX, denominadas según el tipo celular en el que fueron inicialmente caracterizadas: plaquetaria, leucocitaria y epidérmica [123].

La forma leucocitaria de la 12-LOX en mamíferos se encuentra ampliamente distribuida entre diferentes tipos celulares aunque la distribución tisular varía entre especies. Mientras que las formas plaquetaria y epidérmica sólo se expresan en un número limitado de tipos celulares, así en humanos del mismo modo que en ratón, la forma plaquetaria se expresa tanto en plaquetas como en la epidermis [123].

Los principales mediadores lipídicos de la actividad 12-LOX, son sus productos finales: el 12-HPETE, que es muy inestable, y el 12-HETE para el cual se han caracterizado posibles receptores específicos en células de Langerhans humanas así como en una línea de carcinoma pulmonar [123].

Además de sus receptores específicos, se ha descrito que sus productos (por ejemplo el 12-HETE) pueden unirse, también, a receptores PPAR γ [124] y modular, de ese modo, diversos mecanismos.

A nivel fisiopatológico, la 12-LOX se ha visto asociada a diferentes patologías como enfermedades mieloproliferativas [125], arterioesclerosis [126, 127] y en diferentes tipos de cáncer a nivel de la regulación del crecimiento celular y la

apoptosis [128, 129]. Además, la actividad 12-LOX se asocia a anomalías en el territorio vascular ya que tanto los niveles de 12-HETE como los de la 12-LOX plaquetaria se encuentran elevados en pacientes con hipertensión esencial [130].

15-Lipooxigenasa

En humanos se han caracterizado dos isoformas de la 15-LOX cuya expresión se encuentra diferenciada entre tejidos.

La 15-LOX1 fue descrita originariamente en reticulocitos de conejo, pero también se expresa en otros tipos celulares sanguíneos como neutrófilos, eosinófilos y macrófagos así como en células del epitelio pulmonar [131, 132].

Se ha descrito que cataliza la síntesis de 15-HETE, quien parece estar implicado en el proceso de maduración del reticulocito a eritrocito, así como en la reacción acrosómica en los espermatozoides y la liberación de prolactina por las células de la pituitaria. También se le atribuye un papel fisiopatológico al igual que la 12-LOX en la oxidación de las LDL [133].

2.2.4.3. Receptores nucleares activados por los proliferadores peroxisomales

Los peroxisomas son vesículas citoplasmáticas especializadas en funciones oxidativas, que regulan el metabolismo de los lípidos.

Los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs) son una familia de receptores nucleares que se activan por unión de sus ligandos y funcionan como factores de transcripción.

Como miembros de la familia de receptores nucleares, posee un mecanismo que es común a los miembros de la superfamilia a la que pertenecen. Al unirse al ligando, el receptor dimeriza, formando un heterodímero con el receptor del ácido 9-cis retinoico (RXR). El receptor activado se une a secuencias de ADN específicas (PPRE: PPAR response element o elemento de respuesta a proliferadores peroxisomales), presentes en los genes bajo control. La unión del ligando induce un cambio conformacional en el receptor nuclear, que permite el reclutamiento de los co-activadores o co-represores de la transcripción. Así, la unión del ligando a PPAR resulta en la activación de éste como factor transcripcional.

Se ha descrito que controlan, por ejemplo, la expresión génica de diversos genes blanco, como son las hormonas esteroideas, los glucocorticoides, la tiroxina, el ácido retinoico y la vitamina D.

Además, el sistema PPAR cumple un papel importante en la regulación de vías metabólicas relacionadas con el balance energético (metabolismo lipídico, gluconeogénesis y termogénesis), participa en la producción de citoquinas involucradas en el proceso inflamatorio, en el control del crecimiento-diferenciación celular normal (adipogénesis, desarrollo de macrófagos) y también, en la proliferación celular [134, 135].

Se conocen 3 isoformas de PPAR, denominadas: α , β (o δ) y γ , que son codificadas por genes individuales con alto grado de similitud. Además, existen tres variantes transcripcionales derivadas del gen PPAR γ , denominadas: γ 1, γ 2 y γ 3.

La función específica de las isoformas de PPAR se fundamenta en su expresión tisular diferencial y en la selectividad por los ligandos. PPAR α y PPAR γ proporcionan un nexo molecular entre nutrición y la expresión génica. Ambos receptores juegan un papel clave en la homeostasis lipídica regulando tanto el catabolismo (PPAR α) como el anabolismo (PPAR γ) de lípidos. También cumplen una función en el control de la proliferación y diferenciación celular así como en el control del proceso inflamatorio.

La identificación de los ligandos endógenos de PPAR ha sido compleja. La activación de PPAR, evaluada a través de ensayos de activación transcripcional de un gen reportero, no constituye una prueba irrefutable de una interacción ligando-receptor, ya que no permite descartar que el verdadero ligando sea un metabolito del presunto activador. Mediante ensayos de unión, se ha demostrado la unión a PPAR de ácidos grasos marcados radioactivamente. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), los eicosanoides derivados de PUFAs esenciales, los fibratos y las drogas hipoglicemiantes del tipo glitazonas son activadores de PPAR [136]. Así, PPAR α es activado preferentemente por proliferadores peroxisomales como clofibrato. Entre los ácidos grasos, el ácido linoleico y el ácido docosahexaenoico (DHA) son los mejores activadores de PPAR α , aunque el AA y eicosanoides como el LT B4 y el 8-HETE también son activadores de dicho receptor.

PPAR β es activado por ácido linoleico y por DHA. Mientras que PPAR γ es activado por DHA, así como también por algunos compuestos derivados de la oxidación de

las lipoproteínas de baja densidad (LDL), como el ácido 13-hidroxióctadecanoico (13-HODE); éste receptor no es activado por el ácido linoleico. El 12- y el 15-HETE, también son activadores de PPAR γ . Además, las prostaglandinas pertenecientes a las series A, D y J activan PPAR γ . La prostaglandina J2 y, particularmente los metabolitos de ésta: la Δ^{12} -PGJ2 y la 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ PGJ2 (15d-PGJ2), presentan la mayor potencia en la activación de PPAR γ .

Los ligandos sintéticos que se unen a PPAR γ son las glitazonas. Éstas fueron en principio utilizadas en el tratamiento de diabetes tipo 2. Debido a que el SOP y la diabetes comparten muchas alteraciones metabólicas, muchas de las drogas (entre ellas las glitazonas y las biguanidas) que eran administradas para el tratamiento de diabetes resultaron posteriormente también efectivas en el tratamiento del SOP [137-144].

Los PPARs están expresados en diferentes compartimentos del sistema reproductor: hipotálamo, pituitaria, ovario, útero y testículos. Actúan en el endometrio y en el desarrollo y funcionalidad de la placenta. Más aún, la inactivación de PPARs puede ser causal de absorción embrionaria [145]. La PGD2 es la de mayor producción por el útero durante la preñez y se convierte *in vivo* en un ligando natural de los PPAR γ : la 15d-PGJ2 [146], pero se desconoce aún el rol biológico de ésta.

2.2.5. Alteraciones uterinas en SOP

Existen evidencias que indican incremento en la incidencia de hiperplasia y de carcinoma endometrial en mujeres SOP [147, 148].

Se denomina hiperplasia endometrial al engrosamiento anormal del endometrio causado por un exceso de células endometriales. Se caracteriza por una proliferación glandular irregular, no invasiva que presenta cantidades variable de estroma [149]. Estas lesiones son precursoras del adenocarcinoma de endometrio[150].

Se denomina adenocarcinoma al cáncer de tipo maligno originado a partir de células epiteliales glandulares. Existen dos tipos de adenocarcinoma endometriales, los de tipo I son aquellos que se asocian con exposición prolongada a E sin posición de P, tal como en el caso de las pacientes SOP anovulatorias. Este tipo de tumores presentan escasa infiltración endometrial y por ende en general tienen buen

pronóstico. Los adenocarcinomas tipo II, se presentan mayoritariamente en mujeres post menopausicas y carecen de connotación etiológica hormonal, además, no son precedidos ni acompañados de hiperplasia y presentan formas histológicas indiferenciada. Presentan alto riesgo de recidiva y metástasis.

Las causas de la hiperplasia endometrial son atribuidas a la persistente estimulación estrogénica sobre el endometrio sin la inhibición de la proliferación inducida por la progesterona y de la diferenciación a endometrio secretor que ocurre luego de la ovulación en condiciones normales [151]. Por otra parte, una gran proporción de las pacientes SOP tienen sobrepeso y muchas son obesas [152]; y se ha reportado que la obesidad, así como la disminución de la proteínas ligadoras de hormonas esteroides (SHBG), están asociadas con el cáncer endometrial [153-156].

Por otro lado, se ha asociado al aborto recurrente con la infertilidad y la anovulación crónica hiperandrogénica o SOP. Se ha reportado que en este grupo de pacientes, el porcentaje de abortos recurrentes es significativamente mayor (40-50%) que el de la población general (20-30%) [147, 157], desconociéndose las causas de esta anomalía. Sin embargo, se especula que la morfología y/o la función del tejido endometrial pudiesen estar alteradas dado que se ha descrito que cuando pacientes SOP son sometidas a IVF, también presentan fallas de implantación y pérdida de la preñez [158-160].

2.3. Ciclos reproductivos

Al igual que la mayoría de los mamíferos placentarios, tanto humanos como ratones poseen ciclos reproductivos regulares en el que tienen lugar cambios fisiológicos, histológicos y citológicos en el tracto reproductivo, iniciados y regulados por el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal. En humanos, dicho ciclo es denominado “ciclo menstrual” mientras que en roedores se lo denomina “ciclo estral”. Las características de ambos ciclos serán descriptas a continuación.

2.3.1. Ciclo estral

El ciclo estral comprende las modificaciones estructurales (a nivel uterino, ovárico, oviductal, vaginal y vulvar) y conductuales que sufren muchas hembras una

vez que alcanzan la pubertad y que se repite de forma periódica y característica según la especie.

En el ratón la duración del ciclo estral es de aproximadamente cuatro o cinco días. Clásicamente el ciclo estral se ha dividido en cuatro fases: proestro, estro, metaestro y diestro, o en dos: fase folicular y fase luteínica. En cualquier caso la mitad del ciclo viene marcada por la ovulación (coincidiendo con el estro o con el final de la fase folicular) [161, 162]. Los ratones ciclan continuamente a lo largo del año, de manera que el diestro es seguido inmediatamente por el proestro del siguiente ciclo. A continuación se describen las características principales de ambas fases del ciclo estral.

2.3.1.1. Fase folicular

Durante esta fase el ovario presenta una marcada actividad con crecimiento rápido de los folículos y maduración de los mismos. El proestro marca el inicio de la fase folicular con la consiguiente liberación de las hormonas gonadotropas, sobre todo de hormona FSH que dan lugar al crecimiento y desarrollo folicular y por tanto la producción de estrógenos. Esta etapa se continúa con el estro, momento en el que la hembra acepta al macho, y se produce el pico pre-ovulatorio de LH responsable de la ovulación.

2.3.1.2. Fase luteínica

En esta fase, los cuerpos lúteos inician su desarrollo y comienzan a sintetizar progesterona. Esta etapa se denomina metaestro. Cuando los cuerpos lúteos alcanzan su máxima actividad se dice que el animal está en diestro. Después de la fase luteínica puede ocurrir que:

- La hembra haya sido cubierta y quede gestante, por lo cual los niveles de progesterona continúan elevados y los cuerpos lúteos no regresen. Se dice que el animal presenta un anestro gestacional.
- La hembra no quede gestante, entonces, el cuerpo lúteo regresa y se inicia otra fase folicular.

2.3.1.3. Regulación endocrina del ciclo estral

En la figura 9 queda representada la endocrinología en las diferentes etapas del ciclo estral.

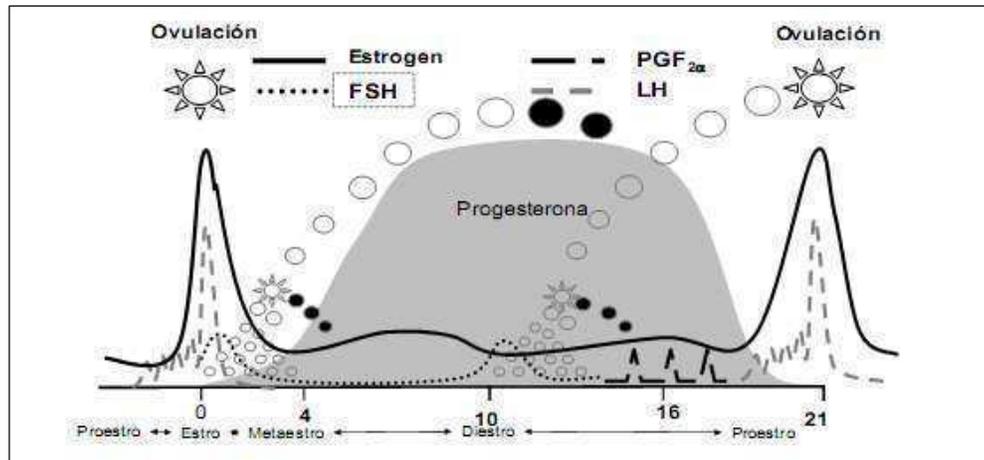


Figura 9: Endocrinología del ciclo estral. Niveles de Progesterona, estrógenos, hormona luteneizante (LH), hormona foliculo estimulante (FSH) y prostaglandina $F_{2\alpha}$ (PG $F_{2\alpha}$) según el estadio del ciclo estral. Adaptado de Lamb, 2009 [162]

2.3.2. Ciclo menstrual

Tal como fue mencionado anteriormente, el útero de los roedores sufre cambios cíclicos de crecimiento y degeneración; de manera similar a lo que ocurre con el de los humanos, cuyo ciclo reproductivo se lo denomina ciclo menstrual.

En ambas especies, los estrógenos producidos por los folículos en desarrollo estimulan el crecimiento endometrial y la progesterona es la responsable de convertir ese endometrio en receptivo, una vez que ha respondido a los estrógenos. En la figura 10 se grafica la dinámica endometrial durante el ciclo menstrual.

En los humanos la duración del ciclo es de aproximadamente 28 días. Si no ocurre preñez, en fase secretora (días 15-28 del ciclo menstrual; diestro en roedores) ocurre la regresión del cuerpo lúteo y se produce el colapso de las arterias espiraladas endometriales, lo que conlleva al desprendimiento de gran cantidad de endometrio evidenciado con hemorragia; proceso denominado menstruación (días 1-5 del ciclo menstrual; en roedores el endometrio es reabsorbido sin producirse hemorragia).

Durante la fase proliferativa (días 6-14 del ciclo menstrual; proestro en roedores) los folículos se desarrollan y comienzan a producir estrógenos que estimulan el crecimiento endometrial. Durante los días 13 a 15 del ciclo menstrual (estro en roedores) los folículos ováricos maduran y se produce la ovulación

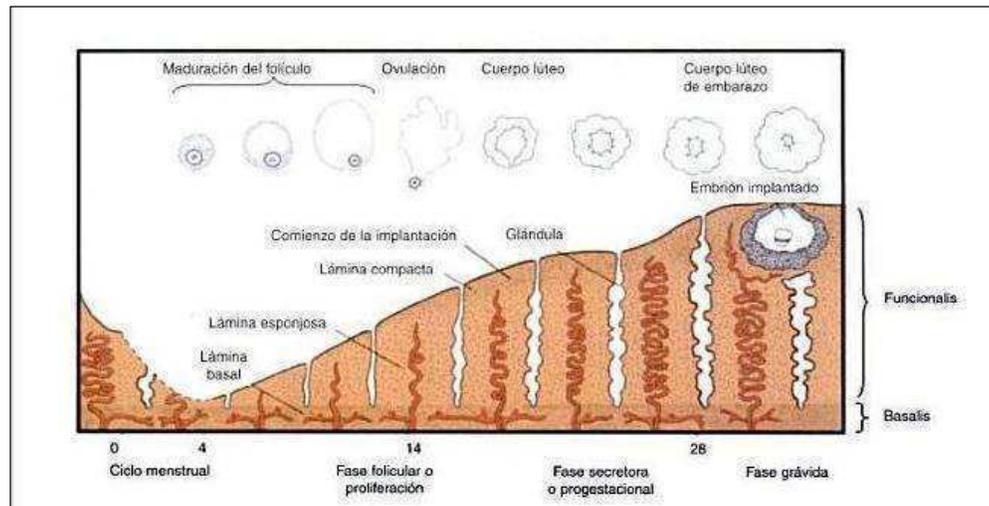


Figura 10: Diagrama representativo de la dinámica de endometrio humano durante el ciclo menstrual. Tomado de Simón, 2009 [163]

3. Tratamientos del SOP

La gran prevalencia y heterogeneidad del SOP hacen que no pueda utilizarse un único tratamiento para evitar los trastornos que trae aparejados, sino que debe ser “ajustado” según el cuadro clínico y las necesidades de cada paciente. Sin embargo, existen algunos lineamientos generales que deben tenerse en cuenta, entre los que se destacan la educación de la mujer afectada acerca de los efectos a corto y largo plazo de la patología, y el acompañamiento psicológico que permita evitar la ansiedad y depresión (revisado en [5]). Una vez atendidos los aspectos psico-sociales de la patología, debe apuntarse a cambios en el estilo de vida de la persona afectada, lo cual constituye el tratamiento de primera línea en las mujeres con SOP, según el Consenso Internacional Thessaloniki ESHRE/ASRM (2007). Esta recomendación se ve sustentada en el hecho de que en aquellas mujeres en las cuales éste síndrome se presenta conjuntamente con obesidad, la pérdida de entre el 5-10% de su peso mejora

alteraciones psicológicas [164], metabólicas y reproductivas [165]. En cuanto a este último aspecto, debemos destacar que la pérdida de peso se asocia con el aumento espontáneo de la tasa ovulatoria [166, 167] y el incremento de la tasa de embarazo en un 20% [168]. Estos resultados son aún más conspicuos si además de dieta se realizan ejercicios físicos [169].

3.1. Terapias farmacológicas para el tratamiento de SOP

En muchas ocasiones, el cambio en el estilo de vida de la paciente que padece SOP no resulta suficiente para paliar este síndrome, por lo cual se administran distintas terapias farmacológicas.

En aquellas pacientes que deciden evitar el embarazo, la terapia de primera línea en SOP se basa en la administración de anticonceptivos orales [170, 171]. Estos logran reducir la secreción de LH y la producción de andrógenos, aunque sus efectos sobre el metabolismo lipídico y glucémico aún resultan controvertidos (revisado en [172]).

En aquellos casos en los cuáles la mujer desee la concepción de un hijo, existen distintas terapias que pueden aplicarse, entre las que se cuentan la administración de citrato de clomifeno (CC), la utilización de agentes sensibilizantes a la insulina como la Metformina y las Glitazonas, la aplicación de gonadotrofinas y análogos de GnRH, la realización de drilling ovárico y la implementación de técnicas de reproducción asistida.

Entre las terapias mencionadas, la administración de CC aún continúa siendo la primera opción para la inducción de la ovulación en las mujeres que presentan el fenotipo anovulatorio de SOP, debido su bajo costo, simple administración y probados efectos sobre el aumento de la tasa de embarazos y de niños nacidos vivos (revisado en [173]). Sin embargo, la administración de este anti-estrógeno reviste potenciales inconvenientes, como ser: eventos de embarazos múltiples [174], síndrome de hiperestimulación ovárica e insuficiencia lútea [175]. Estos factores, sumados al hecho de que entre el 20-25% de las mujeres a las que se les administra CC no son capaces de responder al tratamiento (revisado en [173]), obligaron a los especialistas en reproducción a buscar terapias alternativas que posean beneficios comparables a los del CC, sin sus efectos adversos. En este contexto, en el año 1994 se publicó el primer estudio que evaluó la acción del agente sensibilizante a insulina

Metformina en una mujer con SOP, y aunque el estudio estaba orientado a la investigación de su rol sobre parámetros metabólicos y endocrinológicos, los autores notaron que el 12% de las mujeres tratadas lograban ovular espontáneamente [176], abriendo todo un nuevo campo de aplicación para este tipo de drogas.

3.1.1. La Metformina

La Metformina, N,N'dimetil biguanida, es la droga de mayor utilización en el tratamiento de la diabetes de tipo 2 en todo el mundo.

Su acción principal radica en inhibir la producción de glucosa hepática e incrementar la sensibilidad a insulina en los tejidos periféricos, disminuyendo de esta manera la hiperinsulinemia [177].

En las mujeres con SOP, tanto diabéticas como no diabéticas, existe una hipersensibilidad local ovárica a la insulina, que provoca la secreción incrementada de andrógenos [178]. La reducción de la insulino resistencia [141, 179, 180] y la disminución de la insulina sérica provocada por la administración de Metformina en pacientes SOP [181] estaría asociada con la disminución de andrógenos circulantes y sus efectos subsecuentes, resultando en beneficios metabólicos, reproductivos y clínicos [180]. Sin embargo, la acción de la Metformina sobre la esteroidogénesis ovárica es aún controversial, ya que no sólo ejerce sus acciones de manera indirecta al modular los niveles de insulina, sino que es capaz de actuar directamente estimulando [182] o inhibiendo la secreción de esteroides [183, 184] en función de las condiciones metabólicas y de maduración en las que se encuentre el tejido sobre el cual opera. Asimismo, la aplicación de Metformina ha mostrado tener efectos inmunomoduladores, dado que es capaz de regular la proporción de las subpoblaciones linfocitarias T CD4+ y T CD8+, la secreción de TNF- α *in vivo* en ratones prepúberes hiperandrogenizados [48] y la proliferación de linfocitos T *in vitro* [185]. Adicionalmente, posee actividad de aminoguanidina actuando como un agente capturador de especies reactivas del oxígeno (ROS) [186].

En lo que respecta particularmente a su acción sobre parámetros reproductivos, se demostró que la administración de Metformina induce incrementos en la tasa de ovulación [187, 188]. Asimismo, algunos reportes demostraron la capacidad de esta biguanida de mejorar la vascularización uterina [189], evitar la reabsorción embrionaria [190] e impedir complicaciones obstétricas durante el

embarazo [191]. Sin embargo, entre los estudios clínicos realizados, muy pocos tuvieron en cuenta el número de embarazos logrados y el de niños nacidos con vida [188] y, por otro lado, se ha descrito que las pacientes SOP obesas son poco respondedoras a la monoterapia con Metformina [192].

A pesar de los antecedentes expuestos, los mecanismos de acción por los cuales la Metformina ejerce sus acciones, ya sea sobre parámetros metabólicos como reproductivos, no se comprenden por completo. Dilucidar dichos mecanismos permitiría mejorar los resultados obtenidos en el tratamiento de SOP Y, en caso de ser necesario, mediante la aplicación conjunta de otros fármacos que complementen sus efectos.

3.1.2. Las Glitazonas

Las glitazonas, también conocidas como tiazolidinedionas, son fármacos hipoglucemiantes que originalmente fueron desarrollados como hipolipemiantes.

La primera de ellas fue la Ciglitazona, la cual demostró una disminución de la glucemia en modelos animales, pero con poco efecto clínico. En 1997 se lanzó al mercado la Troglitazona, pero fue retirada en marzo del 2000 por hepatotoxicidad.

Desde 1999 se tienen disponibles a la Rosiglitazona y la Pioglitazona. Estos fármacos han sido aprobados en Europa como drogas de segunda línea, restringidas a terapia combinada; en Estados Unidos se ha permitido su uso como agentes de primera línea en monoterapia o en combinación con otros fármacos [193].

Las Glitazonas ejercen su efecto pleiotrópico al unirse a los receptores PPAR γ . A nivel pancreático, producen un aumento en la síntesis y en el contenido de insulina en los islotes pancreáticos, estimulan la respuesta secretora, inducen una recuperación del patrón pulsátil de secreción de insulina y reducen el contenido graso en islotes [194]. Se ha postulado que estas acciones pueden contribuir a la preservación funcional de los islotes pancreáticos [195].

En tejidos periféricos, favorecen la utilización de glucosa por medio del aumento en la expresión de los transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT-4, e incremento de la oxidación de la glucosa. Por otro lado, tienen la capacidad de inducir apoptosis en células resistentes a la insulina y estimulan la proliferación de adipositos sensibles a insulina, lo cual conlleva a una migración de depósitos de grasa corporal [196]. Inhiben la expresión de la enzima 11-beta-hidroxisteroide-

deshidrogenasa, encargada de la conversión de cortisona en cortisol. A nivel hepático, disminuyen la producción de glucosa por medio del aumento de la síntesis de glucógeno y reducción de la glucocinasa hepática. En el metabolismo de lípidos, disminuyen la producción de ácidos grasos, de triglicéridos, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y aumentan el colesterol de alta densidad (HDL). Aunque también producen un aumento en las lipoproteínas de baja densidad (LDL), se argumenta que este cambio sólo se produce en las partículas de LDL grandes ligeras, las cuales son menos oxidables y aterogénicas [197-200].

Se ha descrito que las Glitazonas en pacientes SOP inhiben la secreción de progesterona y estradiol [201, 202]. Dicha acción se llevaría a cabo al activar los receptores PPAR γ y al actuar éste sobre los promotores de los genes correspondientes a las dos enzimas principales de la esteroidogénesis: la 3-beta-hydroxysteroidoide-deshydrogenasa ó 3-beta HSD y la aromatasa. Además, se vió que la Pioglitazona y la Rosiglitazona redujeron la insulino resistencia y la hiperinsulinemia en pacientes SOP, así como también restauró la ovulación y la ciclicidad menstrual [203].

Se han obtenido buenos resultados al tratar con Rosiglitazona a pacientes SOP obesas e insulino resistentes que mostraron no responder al tratamiento con Metformina [204-206]. Es por ello que se sugiere el tratamiento con Rosiglitazona representa una buena alternativa en pacientes obesas e insulino resistentes cuándo Metformina no es eficiente.

3.1.3. Terapias combinadas

La asociación de una Glitazona con Metformina ha comenzado a ser utilizada en el tratamiento de la diabetes tipo 2 y luego en el del SOP. Dicha terapia ha demostrado tener la ventaja de potenciar el efecto sensibilizante a la insulina debido a que ambas drogas actúan a través de distintos mecanismos moleculares y además, las Glitazonas tendrían la ventaja comparativa de mejorar la función β -pancreática.

En pacientes SOP, se ha observado una mejora en las tasas ovulatorias al utilizar el tratamiento combinado respecto de cada droga por separado [207], así como también en los niveles de insulina, glucosa, colesterol HDL y la regularidad menstrual, entre otros [208]. Sin embargo, la bibliografía al respecto es escasa y sólo

descriptiva, desconociéndose los mecanismos por los cuales esas mejoras se llevan a cabo y sin tener en cuenta el número de embarazos logrados.

Hipótesis y objetivos.

El hiperandrogenismo, una de las características más relevantes del SOP, se halla asociado a desórdenes psicológicos, metabólicos, inflamatorios y reproductivos. Entre los trastornos reproductivos, se ha descrito que el exceso de andrógenos tiene efectos perjudiciales sobre la función endometrial [209-211], contribuyendo a alteraciones asociadas al SOP como son: la infertilidad, las altas tasas de aborto, la hiperplasia endometrial y el cáncer de endometrio [147].

En mujeres con SOP, la administración de Metformina presenta beneficios metabólicos, reproductivos y clínicos [180], entre los que se cuentan la restauración de la ovulación [190] y la disminución en el hiperandrogenismo [212]; aunque pocos de los estudios realizados tuvieron en cuenta al número de embarazos logrados [188].

Existe controversia acerca de la efectividad de la Metformina para lograr mejores tasas de embarazo y parte de la misma se debe al desconocimiento del mecanismo de acción de la Metformina. Por otro lado, un gran número de pacientes obesas no responden a la monoterapia con Metformina [192] y se ha visto que en esas mujeres se obtienen mejores resultados al administrar la terapia combinada Metformina + Rosiglitazona [208], aunque en estos estudios tampoco fueron tenidos en cuenta en el número de embarazos logrados.

De acuerdo a todo lo expuesto anteriormente, se planteó la siguiente hipótesis de trabajo:

“El hiperandrogenismo produce alteraciones en la funcionalidad uterina que afecta, entre otros, a la ruta de activación de los receptores PPAR γ . La Metformina es capaz de prevenir solo alguna/s de dichas alteraciones y el tratamiento combinado Rosiglitazona + Metformina mejora parámetros que la monoterapia con Metformina no normaliza.”

A fines de comprobar dicha hipótesis se estableció el siguiente objetivo general:

“Estudiar los mecanismos por los cuales el hiperandrogenismo altera la funcionalidad uterina y el alcance del tratamiento con Rosiglitazona y/o Metformina.”

De acuerdo al objetivo general se propusieron los siguientes objetivos particulares:

Capítulo I: Estudiar el efecto de la hiperandrogenización y del tratamiento con Metformina sobre la funcionalidad uterina, evaluado a través de los siguientes parámetros:

- Peso uterino.
- Histología uterina.
- Niveles uterinos de Óxido Nítrico.
- Defensas antioxidantes uterinas, evaluadas a través de: actividad de la Superóxido Dismutasa, concentración de Catalasa y contenido de Glutation.
- Secreción uterina de prostaglandinas y su modulación, por medio de:
 - Niveles de PGE producida y liberada.
 - Niveles de PGF_{2α} producida y liberada.
 - Expresión de las enzimas COXs.
 - Expresión de la enzima 9 Cetorreductasa.
- Análisis de la abundancia de los receptores PPAR γ en el útero.
- Disponibilidad uterina de ligandos de PPAR γ , a través de la expresión uterina de:
 - La enzima 15-Lipo-oxigenasa.
 - La enzima 12-Lipo-oxigenasa.
 - La Prostaglandina D Sintasa.
- Niveles de apoptosis en los úteros.
- Proliferación celular endometrial.

Capítulo II: Evaluar los efectos del tratamiento Metformina + Rosiglitazona sobre aquellos parámetros alterados como consecuencia del hiperandrogenismo (evaluados en el capítulo I) que no fueron prevenidos con la monoterapia de Metformina, o sea analizando:

- Peso uterino.
- Defensas antioxidantes uterinas, evaluadas a través de: actividad de la Superóxido Dismutasa, concentración de Catalasa y contenido de Glutation.

Materiales y métodos

1. Modelo Experimental

1.1. Animales

Para la realización del presente trabajo, se utilizaron ratones hembras prepúberes de la cepa BALB/c (*Mus musculus*, 22-25 días de edad).

Los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura (21-23°C) y con un fotoperíodo de 14 horas luz: 10 horas oscuridad (las luces encendidas a las 7.00 hs y apagadas a las 21.00 hs), teniendo acceso *ad libitum* a agua y alimento.

Todos los experimentos y protocolos fueron realizados siguiendo las normas del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires, y la “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” U.S. National Research Council, 1996.

1.2. Tratamientos

Con el fin de evaluar el estado uterino en el síndrome del ovario poliquístico, se utilizó el modelo murino propuesto por Lee y col., 1998 [38], que consiste en la inducción de ovarios poliquísticos al androgenizar ratas con DHEA, luego de las leves modificaciones realizadas [46] con el fin de ser aplicado a ratones. Dado que la Metformina y la Rosiglitazona son utilizadas en el tratamiento del síndrome del ovario poliquístico, fue de nuestro interés evaluar el efecto de las drogas sobre la funcionalidad uterina de ratonas hiperandrogenizadas. Para ello, los animales fueron divididos en grupos experimentales:

* Grupo C (control): Los animales de este grupo fueron inyectados en forma subcutánea con aceite vegetal (0,1 ml) y se les suministró agua (0,05 ml) oralmente por medio de cánula. Ambos tratamientos fueron aplicados diariamente durante 20 días.

* Grupo M (Metformina): Los animales recibieron oralmente, por medio de cánula, Metformina en una dosis de 50 mg/kg de peso corporal (disuelta en 0,05 ml de agua) durante 20 días consecutivos. Dicha dosis es la equivalente a la utilizada en el tratamiento de mujeres con SOP [213].

* Grupo DHEA: Los animales fueron inyectados subcutáneamente con DHEA en una dosis de 60 mg /kg peso corporal (disuelto en 0,1 ml de aceite vegetal), diariamente durante un lapso de 20 días. Dicha dosis es la utilizada previamente por otros grupos de trabajo [37-39, 46-51].

* Grupo DHEA+M: Los animales fueron inyectados subcutáneamente con DHEA (dosis: 60 mg/kg peso corporal, disuelto en 0,1 ml de aceite vegetal) y les fue administrada simultáneamente Metformina oralmente por medio de una cánula (dosis: 50 mg/kg de peso corporal disuelto en 0,05 ml de agua). Ambos tratamientos fueron aplicados conjuntamente durante 20 días.

* Grupo DHEA+R: Los animales fueron inyectados subcutáneamente con DHEA (dosis: 60 mg/kg peso corporal, disuelto en 0,1 ml de aceite vegetal) y les fue administrada simultáneamente Rosiglitazona oralmente por medio de una cánula (0,16 mg/ kg peso corporal, disuelta en agua 0,05 ml de agua). Dicha dosis es la equivalente a la utilizada en el tratamiento de mujeres con ovarios poliquísticos [207, 214]. Ambos tratamientos fueron aplicados conjuntamente durante 20 días.

*Grupo DHEA+M+R: Los animales fueron inyectados subcutáneamente con DHEA (dosis: 60 mg/kg peso corporal, disuelto en 0,1 ml de aceite vegetal) y les fueron administradas simultáneamente Rosiglitazona (0,16 mg/ kg peso corporal, disuelta en agua 0,05 ml de agua) y Metformina (dosis: 50 mg/kg de peso corporal disuelto en 0,05 ml de agua) oralmente por medio de una cánula. Los tres tratamientos fueron aplicados conjuntamente durante 20 días.

Al final de los tratamientos, se tomaron extendidos vaginales de cada individuo con el fin de determinar el estadio del ciclo sexual en el que se encontraban.

2. Obtención de tejidos

Finalizados los tratamientos, los animales fueron anestesiados y se les extrajo sangre (se centrifugó, se extrajo el suero, se lo fraccionó y se lo conservó a -80°C hasta su utilización). A continuación, fueron sacrificados por dislocación cervical y sus úteros fueron extraídos. Parte de esos úteros fueron procesados inmediatamente o fueron conservados a -80°C, según la determinación para la que serían usados.

En la primer parte del trabajo se emplearon 4 grupos de animales (C, M, DHEA, DHEA+M) y en el segundo capítulo se utilizaron 5 grupos (C, DHEA, DHEA+M, DHEA+R, DHEA+M+R).

3. Determinaciones experimentales

3.1. Cuantificación de los niveles séricos de progesterona y estradiol

Los sueros de las hembras fueron obtenidos por centrifugación de la sangre (900 g, 15 minutos) y las hormonas esteroideas totales fueron extraídas con éter dietílico y fueron llevadas a sequedad en estufa de vacío.

La concentración de P_4 y E_2 en dichas muestras se evaluó por la técnica de radioinmunoensayo (RIA) con anticuerpos específicos provistos por el Dr. GD Niswender (Colorado State University, Fort Collind, CO), tal como fue descrito previamente por [215]. Brevemente, los reactivos y las muestras fueron reconstituidos en el buffer RIA correspondiente (ver tabla 1). Tanto las muestras patrones como las muestras a ensayar (100 μ l) se incubaron a 4 °C toda la noche con 200 μ l del anticuerpo y 100 μ l del metabolito (P_4 ó E_2) marcado con tritio. Las uniones inespecíficas fueron separadas mediante el agregado de 200 μ l de una suspensión de carbón activado-dextrán (Carbón 1%, Dextrán 0,1 % en Buffer de RIA) y centrifugación a 2000 g por 15 minutos a 4°C en centrífuga refrigerada (Sorvall RC-5B). El sobrenadante de centrifugación se recogió en viales conteniendo líquido de centelleo, y se cuantificó la radioactividad en un contador de centelleo líquido beta. El anticuerpo para P_4 posee una alta especificidad, con baja reactividad cruzada: <2% para la 20 α - hidroxiprogesterona y para deoxicorticosterona y <1% para el resto de los esteroides presentes en suero. La sensibilidad es de 5-10 pg por tubo. El anticuerpo para E_2 presenta una baja reactividad cruzada:<1% para progesterona y testosterona, <5% para estriol y <10 para estrona.

Los resultados se calcularon a partir de una curva patrón del esteroide indicado y se expresaron en ng de esteroide/mg proteína.

Hormona determinada	Buffer RIA	Metabolito marcado
Progesterona	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 40mM, NaH ₂ PO ₄ 34 mM, NaCl 154 Mm, Gelatina 0.1 %, Azida Sódica 0.002%, pH=7.	17 α -Hidroxi-[1,2,6,7- ³ H] Progesterona, 60 Ci/mmol, 1 mCi/ml, Amersham Corporation, Arlington Heights, USA.
Estradiol	Tris HCl 0.05 M, NaCl 0.1 M, Gelatina 0.1 %, Azida Sódica 0.1%, pH 8.	[2,4,6,7,16,17- ³ H] -Estradiol, 250 μ Ci, Amersham Corporation, Arlington Heights USA

Tabla 1: Detalle de los buffers y metabolitos marcados utilizados para la determinación por RIA de progesterona y estradiol.

3.2. Procesamiento del tejido uterino para la realización de técnicas histológicas

Obtención de cortes histológicos

Úteros provenientes de animales de los 4 grupos experimentales (C, M, DHEA y DHEA+M) fueron fijados en una solución de formol 4% en PBS (pH 7) por 24 horas y luego conservados en etanol 75°. Posteriormente, fueron deshidratados gradualmente utilizando concentraciones crecientes de etanol (80°, 90°, 96° y 100°), etanol: xileno (1:1) seguido de xileno e incluidos en parafina.

Posteriormente se realizaron cortes histológicos de 6 μ m utilizando un micrótopo tipo Minot y montados en portaobjetos cubiertos con gelatina (gelatin-coated glass slides, Biobond; British Biocell International, Cardiff).

Estudio de la morfología uterina

Para evaluar si la histología uterina se veía afectada por alguno de los tratamientos, secciones de tejido fueron desparafinadas en xileno y re-hidratadas gradualmente utilizando concentraciones decrecientes de etanol (100°, 90°, 80°, 75° y 70°) y agua destilada. A continuación, se realizó la tinción con hematoxilina de Mayer durante 10-15 minutos y se lavó bajo flujo de agua corriente hasta obtener coloración azulada. Posteriormente, se realizó la tinción con eosina (1%) durante 2-4 minutos, eliminando el exceso con etanol 75°. Luego, se deshidrató cada corte con concentraciones crecientes de etanol (70°, 75°, 80°, 90° y 100°) y por último se aclaró con xileno y se procedió al montaje.

Los cortes fueron observados bajo microscopio y fotografiados. Con el objeto de evaluar si los tratamientos tenían efecto a nivel de la histología uterina, analizamos cada sección utilizando el criterio de *Scully* [216], según el cuál, las glándulas uterinas son clasificadas en cuatro tipos (Figura 1):

- (i) Glándulas normales: glándulas tubulares simples, que en secciones pueden aparecer circulares, ovaladas o elongadas con lumen angosto y sin ramificaciones ni glándulas hijas;
- (ii) Glándulas quísticas: glándulas circulares de gran tamaño;
- (iii) Glándulas con glándulas hijas: glándulas de varios tamaños y formas (circulares, elongadas o tortuosas) con glándulas hijas formadas o en formación o glándulas dentro del epitelio o dentro del lumen de la glándula madre, o sobre la superficie externa de la glándula madre (como un brote)
- (iv) Glándulas formando conglomerados: glándulas con arquitectura compleja en las cuales cada glándula está cerca de las demás sin estroma entre ellas y presentan numerosos lúmenes que las interconectan. Pueden desarrollarse a partir de glándulas hijas.

Además, se evaluó el tipo de epitelio que presentaban las glándulas endometriales. Éste fue clasificado en simple, pseudoestratificado y estratificado.

Tanto el epitelio estratificado como las glándulas con glándulas hijas (iii) y las que forman conglomerados (iv) son considerados indicadores de posible desarrollo de malignidad en el endometrio según el criterio utilizado.

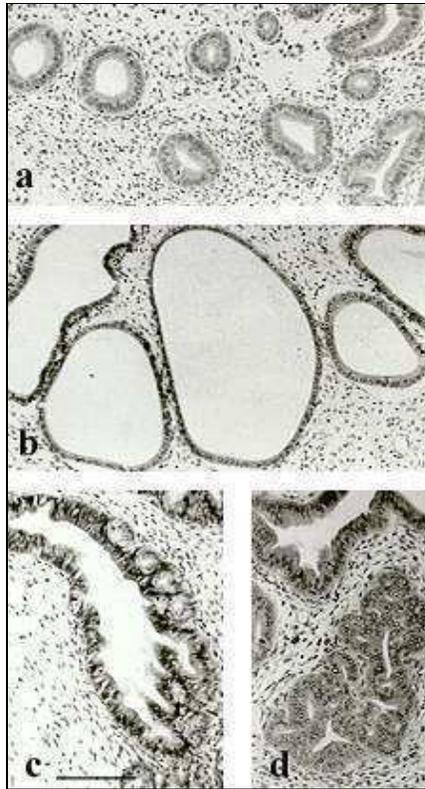


Figura 1: Clasificación de las glándulas uterinas. (a) glándulas normales, (b) Glándulas quísticas, (c) Glándulas con glándulas hijas y (d) Glándulas formando conglomerados. Tomado de Gunin, 2001 [217]. Tinción Hematoxilina-Plata. Barra de escala: 100 μ m

3.3. Actividad de la Óxido Nítrico Sintasa uterina.

Dado que la acumulación de óxido nítrico (NO) produce efectos de nitración nocivos para el tejido, evaluamos la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) a través de la cuantificación de ^{14}C -citrulina formada a partir de ^{14}C -L-arginina, reacción que también forma una molécula de NO:



Ecuación 1: Reacción catalizada por la Oxido Nítrico Sintasa (NOS)

El método utilizado es una modificación de la técnica de Salter y col., 1991 [218]. Brevemente, se homogeneizaron los tejidos mediante Tissuemizer Tekmar; Thomas Scientific, New Jersey a 0°C en 3 volúmenes de 50 mM Heps, 1 mM DL-dithiothreitol, 1 mM NADPH (pH 7.5) y L-valina (50 mM, para minimizar la

interferencia de la arginasa). Las muestras de úteros fueron incubadas a 37 °C con 10 μM $-\text{[}^{14}\text{C]}$ arginina (0.3 μCi ; 1 Ci = 37 GBq). Luego de 15 min de incubación, las muestras fueron centrifugadas durante 10 min a 1000 g y separadas en columnas de intercambio con resina de la forma Na^+ (DOWEX AG50W-X8). La radioactividad se midió con contador de centelleo líquido beta. Los coeficientes intra e inter ensayo fueron ambos menores de 8.0 %.

Los resultados se expresaron en pmol/g de peso húmedo de tejido x minuto.

3.4. Evaluación del balance oxidativo

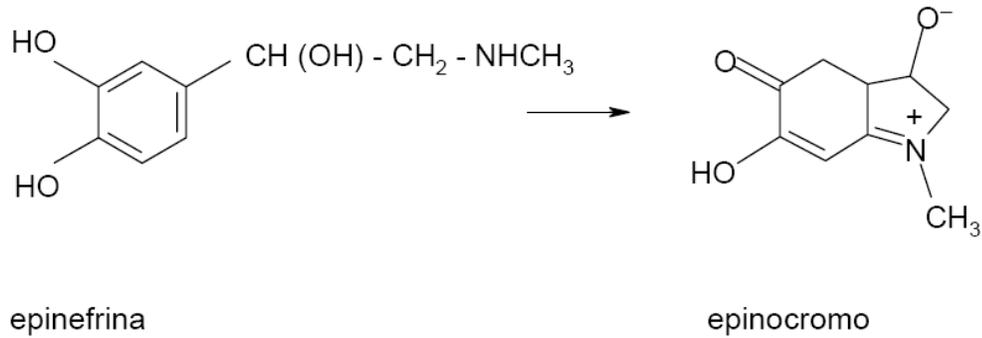
Procesamiento de las muestras

Los úteros fueron homogeneizados manualmente a 0°C en 1 ml de buffer de homogeneización para estrés oxidativo (EDTA 1mM, KCl 150 mM, beta Mercaptoetanol 1mM, Tris Base 20 mM, Sacarosa 500 Mm; pH 7.6). El homogenato fue centrifugado a 10000 g, 4°C por 10 minutos. Se separó el sobrenadante, se lo fracciono y se lo guardó en freezer a -20C para los ensayos de Superóxido dismutasa, Catalasa, Glutation y determinación de proteínas.

Determinación de la actividad de la enzima Superóxido Dismutasa

Las Superóxido Dismutasas (SOD) son un grupo de metaloenzimas que detoxifican las ROS mediante la conversión de anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno (O_2).

La actividad total de esta enzima fue medida por un método espectrofotométrico descrito por Misra y Fridovich, 1972 [219]. Este método se basa en la habilidad de la SOD de inhibir la auto-oxidación de la epinefrina, en la cual se produce como intermediario el anión superóxido. Dado que la oxidación de la epinefrina es seguida por la formación del epinocromo que tiene un máximo de absorbancia a 480 nm (ver esquema 4), se registra la concentración de este producto como medida de la actividad de enzima (condiciones de reacción: pH 10.2; T: 30°C).



Esquema 1: Oxidación de la epinefrina y formación del epinocromo detectable a 480 nm.

A fines de evaluar la actividad de esta enzima en los úteros estudiados, una fracción de cada muestra se disolvió en buffer glicina 50 mM (pH 10.2) y se agregó epinefrina 30 mM en ácido acético 0.05% v/v. Se midió la formación del epinocromo a 480 nm durante 4 min. Se determinó el volumen de enzima (μl) presente en la muestra que inhibía la oxidación de la epinefrina en un 50%, la cual corresponde a 1 unidad de SOD (USOD). La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford. Los resultados se expresaron como USOD/mg proteína.

Medición de la actividad enzimática de Catalasa

Este método [220] se basa en el rol de la enzima Catalasa para catalizar la conversión de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Dado que el peróxido de hidrógeno absorbe a 240 nm, el consumo de este compuesto puede medirse espectrofotométricamente.



Ecuación 2: Reacción catalizada por la enzima Catalasa

Se evaluó la actividad de esta enzima en los homogenatos uterinos. A 100 μl de cada muestra se le adicionaron 3 ml de buffer fosfato 50 mM (pH 7.2) y 100 μl H_2O_2 3M, registrándose la absorbancia a 240 nm durante 1 minuto en intervalos de 10 segundos. A continuación, se realizaron una serie de cálculos descriptos y

fundamentados previamente [220]. Brevemente, se graficó el $\log [H_2O_2]$ en función del tiempo, y se calculó la pendiente del gráfico (k'). Sinedo, $k' \times \text{dilución} / k \times \text{mg de proteína} = [\text{catalasa}] = \text{nmoles} / \text{mg de proteína}$. Donde $k = 4.6 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (para nuestro modelo de estudio). La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford. Los resultados fueron expresados como nmol Catalasa/mg de proteína.

Determinación del contenido total del metabolito antioxidante Glutation

El método utilizado aquí para la determinación del contenido de Glutation [221] se basa en la reacción de reducción del ácido 5,5,-ditiobis-2 nitro benzoico (DTNB), llevada a cabo por el Glutation reducido (GSH), en medio reductor:



Ecuación 3: Reacción de oxidación del GSH y reducción del DTNB en medio reductor.

Al reducirse, el DTNB forma un compuesto coloreado: el 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB) que es posible cuantificarlo a 412 nm.

Para medir el Glutation total, se agrega Glutation reductasa (GR) al medio, enzima que cataliza el pasaje de Glutation oxidado (GGSG) a su forma reducida.

Para medir la concentración de GSH se colocaron 50 μl de muestra, 950 μl de buffer, 50 μl de NADPH, 20 μl del reactivo de Ellman (DTNB) y, en último lugar, 20 μl de GR. Se registró la absorbancia a cada minuto, durante los primeros 6 minutos (donde se mantiene la linealidad de la reacción) y se determinó la pendiente de la reacción. El contenido de GSH se cuantificó mediante comparación de la pendiente de cada muestra con aquella obtenida de una reacción con concentración conocida de GSH. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford. Los resultados se expresaron como concentración μM de GSH/ μg de proteína.

3.5. Cuantificación de la producción de prostaglandinas E y F_{2α} uterina

Extracción de prostaglandinas uterinas

Los úteros fueron pesados e incubados en Krebs- Ringer- Bicarbonato (KRB: NaCl 118 mM; KCl 4.7 mM; MgSO₄ 1.2 mM; KH₂PO₄ 1.2 mM; glucosa 11.7 mM; NaHCO₃ 25 mM; CaCl₂ 1.2 mM; pH 7.4) por 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 fue retirado y la solución acidificada a pH 3 con HCl. La extracción de las prostaglandinas se realizó adicionando 3 veces con volumen de 1 ml de acetato de etilo. El producto de la extracción fue secado en atmósfera de N₂ y almacenados a -20°C hasta el momento de realizar el radioinmunoanálisis.

Radioinmunoanálisis de prostaglandinas

Los reactivos y las muestras fueron reconstituidos en el buffer de RIA prostaglandinas (K₂HPO₄*3H₂O 7.30 mM; KH₂PO₄ 2.70 mM; NaCl 154 mM; albúmina bovina sérica 7.14 mM; azida sódica 15.38 mM; pH 7.4). Tanto las muestras patrones como las muestras a ensayar (100µl) se incubaron por 30 minutos con 500µl del anticuerpo específico (anti-PGF_{2α} o anti-PGE, ambos de Sigma Chemical Co, USA) a 4°C. Luego se agregaron 100µl del metabolito marcado con tritio (para PGF_{2α}: [5,6,8,9,11,12,14,15(n)-³H]-PGF_{2α}; 160Ci/mmol, o para PGE: ([5,6,8,9,11,12,14,15 (n)-3H]- PGE; 160Ci/ml ambos de Amersham Corporation, Arlington Heights USA) y se incubó por 1 hora a 4°C. Una vez transcurrida la hora, se agregaron 200µl de una suspensión de carbón activado-dextrán (carbón 1% / dextrán 0,1% en buffer RIA prostaglandinas), se dejó reposar por 10 minutos a 0°C. Finalmente se realizó una centrifugación a 2000g por 15 minutos a 4°C en centrífuga refrigerada (Sorvall RC-5B).

El sobrenadante de centrifugación se colectó en viales conteniendo líquido de centelleo (Optiphase), y se procedió a cuantificar la radioactividad en un contador de centelleo líquido alfa.

La concentración de prostaglandinas (PGE y PGF_{2α}) se calcularon a partir de una curva patrón (15-4000 pg), y los resultados finales se expresaron en pg PG /mg de peso húmedo de tejido.

3.6. Obtención de ARN para la realización de retro-transcripción y amplificación

Extracción de ARN

El contenido total de ARN de los úteros fue obtenido utilizando TRIZOL (Invitrogen Life Technologies) siguiendo las instrucciones del productor. Brevemente, los úteros fueron homogeneizados en 1 ml de Trizol. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se agregó 200 μ l de cloroformo. Se incubó por 3 minutos y se centrifugó a 12000g por 15 minutos a 4°C. La fase acuosa (superior) fue transferida a otro tubo para proseguir con la extracción de ARN, mientras que la fase orgánica (inferior) se recuperó para la posterior extracción de proteínas. La fase acuosa (500 μ l) fue precipitada con 600 μ l de isopropanol y centrifugando a 12000 g por 10 minutos a 4°C. A continuación, se lavó con etanol 75 % y se dejó secar el pellet durante 1-2 minutos. El mismo fue resuspendido en 30 μ l agua libre de ARNasas y se calculó la concentración de ARN midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm. Finalmente se evaluó su integridad mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Luego, las muestras fueron fraccionadas y almacenadas a -70°C para ser utilizadas posteriormente.

Retro-transcripción

A partir del ARN, obtenido como se describió en el punto anterior, se obtuvo el ADN copia (ADNc) correspondiente, mediante retrotranscripción (RT-PCR). Para ello se utilizaron hexámeros al azar (random primers) como cebadores y Transcriptasa Reversa del Virus de Leucemia Murina Moloney (M-MLV RT, Promega Corporation, Madison, USA) siguiendo las especificaciones del productor. Brevemente, se colocaron 4 μ g de ARN, y 2 μ g de random primers (Promega Corporation, Madison, USA) en un volumen final no superior a 14 μ l. Se incubó a 70°C por 5 minutos y, luego, se cortó la reacción llevando a hielo. Posteriormente se adicionaron los siguientes reactivos en el orden indicado: 5 μ l de buffer RT-MMLV 5X (Tris-HCl 250 mM; KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM y DTT 50 mM), 5 μ l de una mezcla dNTPs (dATP 10mM; dGTP 10mM, dCTP 10mM, dTTP10mM), RT-MMLV 200U y agua libre de nucleasas hasta completar los 25 μ l. Se mezcló delicadamente y se incubó por 60 minutos a 37°C. Las muestras de ADNc sintetizadas se guardaron a -70°C hasta la realización de la PCR correspondiente.

Reacción en cadena de la polimerasa

Alícuotas del ADNc, producto de la retrotranscripción, fueron amplificadas utilizando buffer y cebadores (primers) específicos bajo las siguientes condiciones generales: el volumen final de reacción fue de 30 μ l. La mezcla de reacción consistió en primers en una concentración de 0.5 μ M, 0.2 μ M de los 4 deoxy-nucleótidos trifosfato, 2.5 μ M de MgCl₂, 1.25 U de Taq-DNA polimerasa en buffer de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Promega, Madison, WI).

Se utilizaron como controles negativos muestras de ARN a las cuales se les practicó la reacción de PCR sin previa retro-transcripción y controles donde no se agregó ácidos nucleicos.

El ADNc fue amplificado en un termociclador *Ivema T-18*, comenzando por 4 minutos de desnaturalización a 94°C y finalizado con 10 minutos de extensión a 72°. Las condiciones particulares de cada amplificación son las que se describen en la Tabla 2.

Las condiciones y cantidades de ADNc que se utilizaron fueron tales que la intensidad del producto de amplificación se encontraba en la fase exponencial y el ensayo fue lineal con respecto a la cantidad de ADNc utilizado.

Los productos de la PCR se resolvieron en geles de agarosa al 1,5 % que contenían 0,5 mg/ml de bromuro de etidio) y utilizando un marcador de peso molecular de ADN de 50-1000 pares de bases.

Los geles fueron visualizados y fotografiados utilizando un analizador de imágenes (ImageQuant RT-ECL with ImageQuant TL software, Amersham Biosciences). Posteriormente, la intensidad de las bandas se calculó utilizando el software Imagen J. La cantidad relativa de los ARNm se expresaron con relación a la intensidad de la señal del ARNm de 18s utilizado como gen control.

Gen	Secuencia del primer (5'-3')	Nº de acceso al banco de genes	Tamaño del producto (pb)	Cantidad de ADNc (ul de RT)	Condiciones	Nº de ciclos
15-LOX	Sense: TAGCCATCCAGCTCGAACTG Antisense: GGTGTAGAGTAGGTGAGGAACTA	NM_009660	250	4	94°C 45'', 51°C 30'', 72°C 30''	35
12-LOX	Sense: TGATCAGGTAGTGAGCACAGGT Antisense: CCTTCACATACCTGGCAGTGA	NM_007440	192	4	94°C 45'', 51°C 30'', 72°C 30''	35
COX-2	Sense: ATCCTGCCAGCTCCACCG Antisense: TGGTCAAATCCTGTGCTCATACAT	NM_011198	169	3	94°C 45'', 54°C 30'', 72°C 30''	35
CBR1 (9 ceto)	Sense: CTTCCACCAGCTGGACATC Antisense: CATTGAGGAGGATCTTGTC	U31966	500	4	94°C 45'', 52°C 60'', 72°C 60''	45
PGDS	Sense: CAGGAAAACAGTGTGAGACC Antisense: AGAGGGTGGCCATGCGGAAG	NM_008963 XM_974597	194	4	94°C 45'', 58°C 30'', 72°C 30''	45
PPAR γ	Sense: TGACACAGAGATGCCATTCTGG Antisense: GTAATAGCAACCATTGGGTCAGCTC	U01664	184	4	94°C 45'', 60°C 30'', 72°C 30''	40
18s	Sense: TAACGAGGATCCATTGGAGG Antisense: CCCTCTTAATCATGGCCTCA	NR_003278	374	2	94°C 45'', 50°C 1', 72°C 30''	30

Tabla 2: Secuencia de primers y condiciones de reacción utilizadas para la amplificación por PCR

3.7. Obtención de proteínas y realización de Western Blots

Extracción de proteínas

El contenido proteico de los úteros fue obtenido utilizando TRIZOL (Invitrogen Life Technologies) como se describió previamente para la extracción de ARN. Brevemente, los úteros fueron homogeneizados en 1 ml de Trizol. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se agregó 200 μ l de cloroformo. Se incubó

por 3 minutos y se centrifugó a 12000g por 15 minutos a 4°C. La fase acuosa (superior) fue transferida a otro tubo para proseguir con la extracción de ARN como se describió previamente, mientras que la fase orgánica (inferior) se recuperó para la posterior extracción de proteínas. La fase orgánica contiene el ADN en suspensión y las proteínas. Para precipitar el ADN se adicionaron 240 µl de etanol absoluto cada 300 µl de fase orgánica, se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 2000 g por 5 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante (que contenía las proteínas) y se descartó el pellet (ADN). Para precipitar las proteínas se agregaron 1200 µl de alcohol isopropílico, se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 12000 g por 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y las proteínas (pellet) se lavaron 3 veces con 2 ml de una solución 0,3 M de hidrocloreuro de guanidina en etanol 95°. En cada ciclo de lavado se incubaron las proteínas a temperatura ambiente por 20 minutos y luego se centrifugaron a 7500 g por 5 minutos a 4°C. Luego del último lavado, se resuspendieron las proteínas en etanol absoluto, se incubaron por 20 minutos y se centrifugaron a 7500 g por 5 minutos a 4°C. El pellet se secó por 5 minutos en bomba de vacío y luego se resuspendió en SDS 1% (peso/volumen) en agua. El contenido proteico de las soluciones obtenidas se determinó por el método de Bradford [222]. Las muestras fueron fraccionadas y almacenadas a -20°C.

Western Blot

✓ *Corrida electroforética:*

Las muestras (90 µg de proteínas) fueron diluidas y desnaturalizadas en buffer muestra 5X-SDS (10 mM Tris-HCl pH 6,8; SDS 2% p/v; glicerol 10% v/v; azul de Bromofenol 0,06 % p/v; β-mercaptoetanol 1% v/v) y calentadas a 95°C por 4 minutos.

Posteriormente fueron sembradas en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) al 10% para COX-1 y COX-2 y al 12% para PPARγ, 12 y 15-LOX.

Las proteínas se separaron por electroforesis a 25 mA durante 2 horas en Tris-glicina 0.1% p/v en buffer SDS. Además de las muestras de interés se cargó un marcador de peso molecular de proteínas (Rainbow-coloured protein mass markers

14.3-200 kDa, BioRad). Como control positivo para PPAR γ se utilizaron extractos proteicos de: músculo esquelético de rata.

✓ *Transferencia:*

Las proteínas ya separadas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) en buffer de transferencia (metanol 20% v/v; glicina 150 mM; Tris-HCl 20 mM; pH 8,3) durante 1 hora a 4°C a 100V, utilizando una celda de transferencia mini-electroforética (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)

Para verificar que la transferencia se llevó a cabo correctamente, a continuación se realizó una tinción con una solución de Rojo Ponceau (Ponceau 0,2%, ácido tricloroacético 3%, ácido sulfosalicílico 3%) a temperatura ambiente por 1 minuto. Luego, las membranas fueron lavadas en TBS (Tris-HCl 4 mM, pH 7,5; NaCl 100 mM) e incubadas por 90 m en T-TBS (Tween 20 0,1% v/v, 1X TBS) conteniendo albúmina bovina sérica (BSA: 0,1 % p/v) a temperatura ambiente con agitación suave para bloquear las uniones inespecíficas. Luego, se realizaron lavados con T-TBS a fin de eliminar el exceso de albúmina.

✓ *Inmunodetección de las proteínas de interés:*

La presencia de las proteínas de interés se confirmó incubando a 4°C durante toda la noche con anticuerpos específicos: COX-1 (1:1000, Cayman, Ann Arbor, MI, USA), los restantes anticuerpos fueron provistos por Santa Cruz Biotechnology Inc., USA: COX-2 (1:200), PPAR γ (1:100), 12LOX (1:100), 15-LOX (1:100) y β -Actina (1:500).

Los controles negativos se realizaron omitiendo la incubación con anticuerpos primarios y en ningún caso se detectaron bandas.

Las membranas fueron, luego, lavadas con T-TBS seguido de una incubación por 1 hora a temperatura ambiente en agitación con Ig-G de cabra anti-conejo (1:4000 o 1:5000, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA). Posteriormente el exceso de anticuerpo fue quitado de las membranas lavandolas con T-TBS y, a continuación, se las incubó con reactivos de detección de quimioluminiscencia (Sigma-Aldrich).

Las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas usando un analizador de imágenes (ImageQuant RT-ECL with ImageQuant TL software, Amersham Biosciences).

Los resultados se expresaron como Densidad Óptica relativa, definida como el cociente entre las densidades ópticas de la proteína de interés y de la actina.

3.8. Marcación *in situ* del ADN fragmentado

La valoración de la apoptosis por el método de marcaje *in situ* del ADN fragmentado o técnica de TUNEL (TdT-mediated d-UTP nick end labelling) tiene su fundamento en la detección de la rotura del ADN internucleosomal, característica de la apoptosis, en secciones de tejido incluidos en parafina. La técnica se basa en la incorporación de nucleótidos marcados, llevada a cabo por la enzima transferasa terminal (TdT), en los extremos 3'-OH libres que se generan al fragmentarse el ADN.

El protocolo se realizó según las indicaciones del proveedor del kit utilizado (DeadEnd™ Fluorometric tunel System, Promega, Madison, WI). Brevemente, secciones de 6 µm de tejido fueron desparafinadas en xileno y re-hidratadas gradualmente utilizando concentraciones decrecientes de etanol (100°, 90°, 80°, 75° y 70°) y PBS. A continuación, los cortes fueron desproteinizados durante 10 minutos con proteinasa K (Sigma) 20 µg/ml en PBS. Luego se lavó en PBS y las secciones fueron incubadas con buffer de equilibrio. Se descartó el buffer y se los cubrió con TdT incubation buffer que contiene por cada 15 µl de buffer equilibrio, 5 µl de mix de nucleótidos y 1 µl de la enzima TdT. Se incubó durante 1 hora a 37°C protegido de la luz. Se lavó en PBS a fin de remover la fluoresceína no incorporada y a continuación se realizó la tinción con 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI, 1µg/ml).

Los controles negativos fueron cortes incubados sin TdT y los controles positivos fueron secciones que se trataron previamente con ADNasa con el objeto de causar la fragmentación del ADN. Finalmente los cortes fueron montados y, luego, observados y fotografiados utilizando un microscopio de fluorescencia utilizando filtros de 520 nm (fluoresceína) y 460 nm (DAPI).

Las células positivas para TUNEL fueron contadas en sectores al azar utilizando el programa Image J, tanto en el epitelio como en el estroma endometrial, y, posteriormente relativizadas al número total de núcleos del mismo sector.

3.9. Cuantificación de la proliferación celular

Secciones de 6 μm de tejido fueron desparafinadas en xileno y re-hidratadas gradualmente utilizando concentraciones decrecientes de etanol (100°, 96° y 70°) y agua bidestilada. La actividad de la enzima peroxidasa endógena se bloqueó con 3% peróxido de hidrógeno en agua bidestilada. Luego se procedió a la recuperación antigénica, calentando las muestras sumergidas en buffer citrato 0,01 M pH 6.

A continuación, la unión no específica a otros epitopes se bloqueó incubando las secciones con BSA 4% (seroalbúmina bovina) durante 2 horas. Luego las secciones se incubaron con los anticuerpos anti antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) (1:200, Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) durante toda la noche a 4°C.

Al otro día, luego de lavados sucesivos con PBS, las secciones fueron incubadas con el anticuerpo secundario biotilado (1:200, Sigma B7139) durante 1 hora y luego durante 30 minutos con Streptavidina-HRP.

La marca positiva fue visualizada con el sustrato de la enzima peroxidasa, diaminobencidina (DAB) en buffer de revelado (Roche, Diagnostics, Germany). La reacción se detuvo con agua destilada, las secciones se tiñeron con hematoxilina durante 30 s y se procedió a la deshidratación previamente a realizar el montaje con Bálsamo de Canadá.

Los controles negativos correspondieron a cortes que fueron incubados en ausencia de anticuerpo primario.

Finalmente los cortes fueron analizados bajo microscopio y fotografiados. Utilizando el programa Image J, se contabilizaron los núcleos positivos para PCNA en sectores al azar y se los relativizó a los núcleos negativos para PCNA (teñidos con hematoxilina) en el mismo sector.



Resultados

Capítulo I: Efectos de la hiperandrogenización y de la Metformina

Ciclo estral post tratamientos

La oligo-anovulación es una de las principales afecciones reproductivas observadas en SOP.

En roedores, las características citológicas de extendidos vaginales permiten diferenciar en qué estadio del ciclo estral se encuentran los animales y, mediante su seguimiento, es posible obtener información sobre la ciclicidad ovárica. Es por ello que en el presente trabajo, se tomaron extendidos vaginales y se los clasificó en función del estadio del ciclo en que se hallaban los animales.

Debido a la juventud de los animales durante la etapa estudiada, el ciclo estral no se observó aún completamente establecido: los animales controles presentaron los distintos estadios del ciclo, mostrando en algunos casos ciclos completos. Por el contrario, la totalidad de los animales hiperandrogenizados se encontraron arrestados en estro. Es por ello que para las posteriores determinaciones se seleccionaron los animales de los restantes grupos de trabajo en el mismo estadio del ciclo. Esto se hizo para poder realizar correctamente las comparaciones. De otro modo, podrían detectarse diferencias en algunos parámetros a estudiar, que se debieran al momento del ciclo en el que se encuentran los animales y no al tratamiento en sí.

Por ello, de aquí en adelante, todos los resultados presentados comparan úteros de animales que se hallaban en estro el día 20 de tratamiento.

Efecto de los tratamientos sobre el peso corporal

El SOP se ha visto asociado a un amplio rango de alteraciones metabólicas, entre las que puede destacarse la obesidad [223]. Es por ello que decidimos evaluar la ganancia de peso corporal de los animales durante el tratamiento de hiperandrogenización con DHEA durante 20 días.

Dado que el período estudiado corresponde a la maduración de los animales desde la etapa peripuberal a la etapa adulta, esto se vió acompañado del crecimiento en el tamaño corporal que se reflejó en ganancia de peso para todos los grupos de trabajo.

Sin embargo, ese incremento fue significativamente mayor en los animales que habían sido hiperandrogenizados con DHEA. Además, ese incremento no fue revertido al tratar con Metformina a los animales que estaban siendo hiperandrogenizados (Figura 1A).

Evaluación del peso uterino post tratamientos

Se ha descrito que existen receptores androgénicos tanto en las células estromales como en células epiteliales endometriales; y tanto la androstenediona como la testosterona inducen cambios en la función endometrial. Estos datos, sumados a la observación del incremento en el peso corporal post-hiperandrogenización y el aspecto higroscópico que presentaban los úteros de los animales que habían sido hiperandrogenizados, nos llevaron a proponernos como próximo objetivo evaluar si el exceso de andrógenos tendría efectos a nivel del peso uterino.

Al relativizar el peso uterino al peso corporal, se detectó un incremento de la relación en los animales que habían sido hiperandrogenizados con DHEA. Dicho aumento no fue prevenido al tratar con Metformina a los animales mientras eran hiperandrogenizados (Figura 1B).

Al analizar la morfología de dichos úteros al momento de la extracción, encontramos un aumento del aspecto higroscópico en los úteros de animales que habían sido hiperandrogenizados. Lo que nos lleva a sugerir que el aumento en el peso uterino relativo podría deberse al incremento en el contenido de agua de los úteros producto de la hiperandrogenización. Posteriormente, al analizar la histología de los tejidos, se detectó el incremento en el grosor endometrial (Figura 1C), que podría ser, al menos en parte, responsable de dicho aumento.

Características morfológicas de los ratones y sus úteros luego de la hiperandrogenización y del tratamiento con Metformina

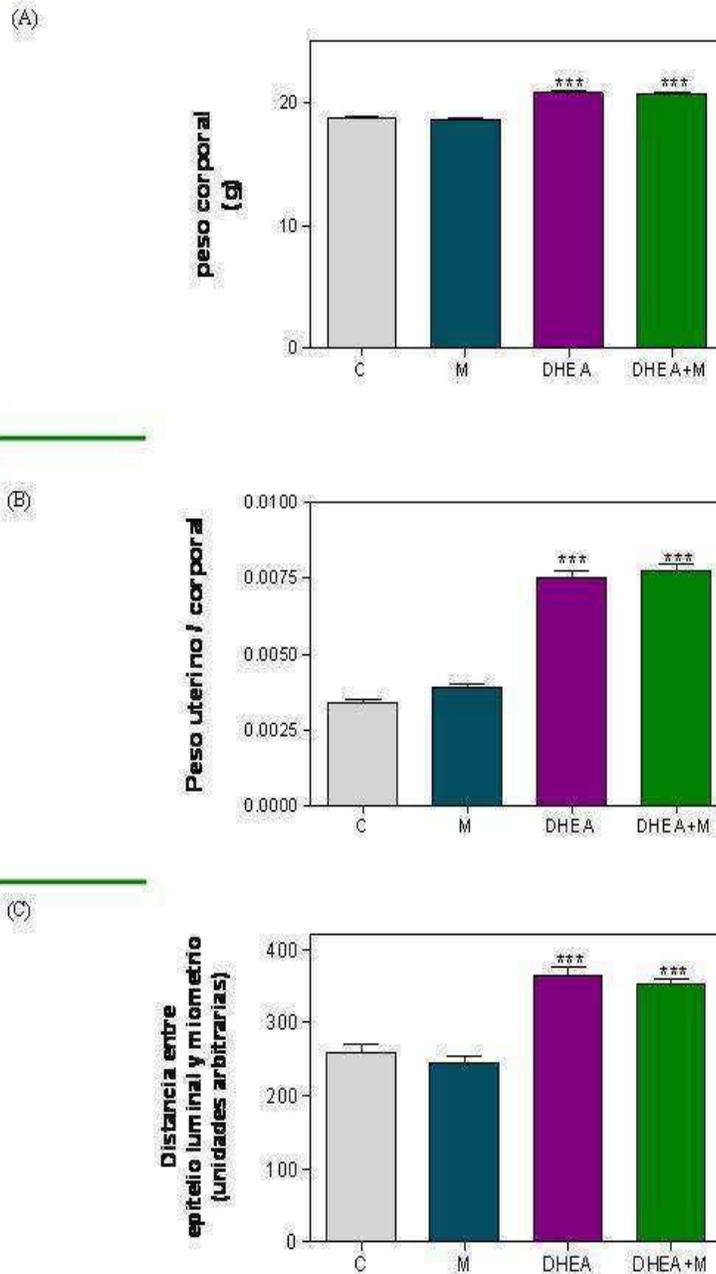


Figura 1: Variaciones del peso corporal (A), del peso uterino relativo (B) y del grosor endometrial (C) luego de 20 días de hiperandrogenización y de la administración de Metformina. (A) y (B): N= 10 animales/ grupo, (C): N= 5 animales/ grupo. Cada barra representa la media \pm SEM. Los resultados fueron evaluados por el test de ANOVA seguido de la prueba de Tukey. Las diferencias fueron consideradas significativas para $P < 0.05$. *** $P < 0.001$ respecto al Control.

Niveles de estradiol séricos

La observación del incremento en el peso uterino como consecuencia de la hiperandrogenización puede deberse al incremento en el número de células presentes en dicho tejido. Al respecto, se sabe que en SOP se ha descrito un aumento en la actividad esteroideogénica y un incremento en la tasa de proliferación celular que es atribuido principalmente a la persistente estimulación estrogénica sobre el endometrio sin la inhibición de la proliferación inducida por la P₄. Es por ello que nuestro próximo objetivo fue evaluar los niveles de dichos esteroides.

La inyección diaria de DHEA durante 20 días consecutivos incrementó significativamente los niveles séricos de E₂ respecto de los del grupo control.

Cuando los ratones fueron tratados con DHEA y Metformina conjuntamente, los niveles séricos de esta hormona se reestablecieron a los de los controles (Figura 2A).

Niveles de progesterona séricos

La P₄ se encontró significativamente incrementada en animales hiperandrogenizados con respecto al grupo de animales controles.

En el grupo DHEA+M, la concentración de esta hormona no mostró diferencias significativas con el grupo control (Figura 2B).

Análisis de la histología uterina

Nuestro siguiente objetivo fue evaluar si la alteración en los niveles de esteroides y en los pesos uterinos previamente descritas, se traducían en alteraciones a nivel de la histología uterina. Para ello el criterio utilizado fue el de Scully [216].

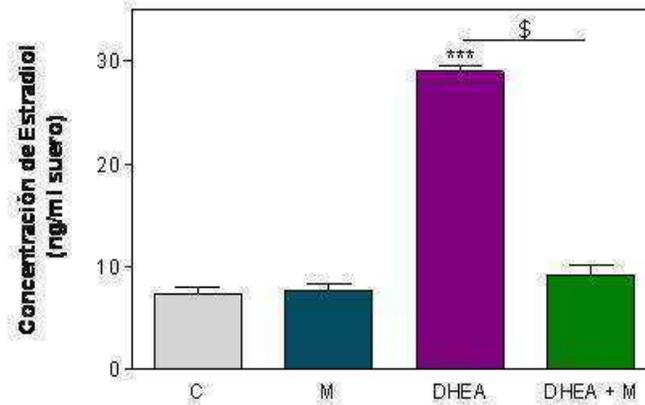
La examinación microscópica de los úteros de animales de los grupos control y metformina reveló endometrios de aspecto normal dado que presentaron glándulas de tipo normales y quísticas, con un epitelio glandular de tipo cúbico simple (Figura 3 a-d).

El análisis histológico de los úteros del grupo hiperandrogenizado mostró glándulas con glándulas hijas y formando conglomerados. El epitelio glandular fue de tipo pseudoestratificado a estratificado (Figura 3 e y f).

Los úteros provenientes de animales que habían recibido el tratamiento conjunto de DHEA con Metformina presentaron glándulas de tipos normales y quísticas, características de endometrios normales y similares a los observados en úteros del grupo control (Figura 3 g y h).

Niveles de Progesterona y Estradiol séricos luego de la hiperandrogenización y del tratamiento con Metformina

(A)



(B)

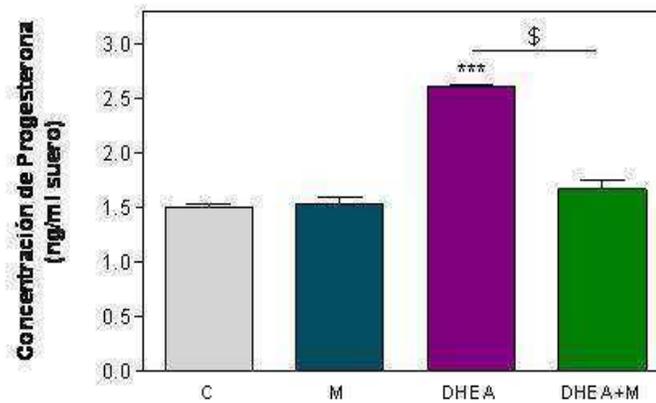


Figura 2: Por radioinmunoensayo se evaluaron los niveles de Estradiol (A) y Progesterona (B) séricos de animales que habían sido hiperandrogenizados y/o tratados con Metformina durante 20 días. (A): N= 10 animales/ grupo; (B): N= 6 animales/ grupo. Cada barra representa la media \pm SEM. Los resultados fueron evaluados por el test de ANOVA seguido de la prueba de Tukey. Las diferencias fueron consideradas significativas para $P < 0.05$, $***P < 0.001$ y $\$P < 0.001$

Efecto de la hiperandrogenización y del tratamiento con Metformina sobre la histología uterina

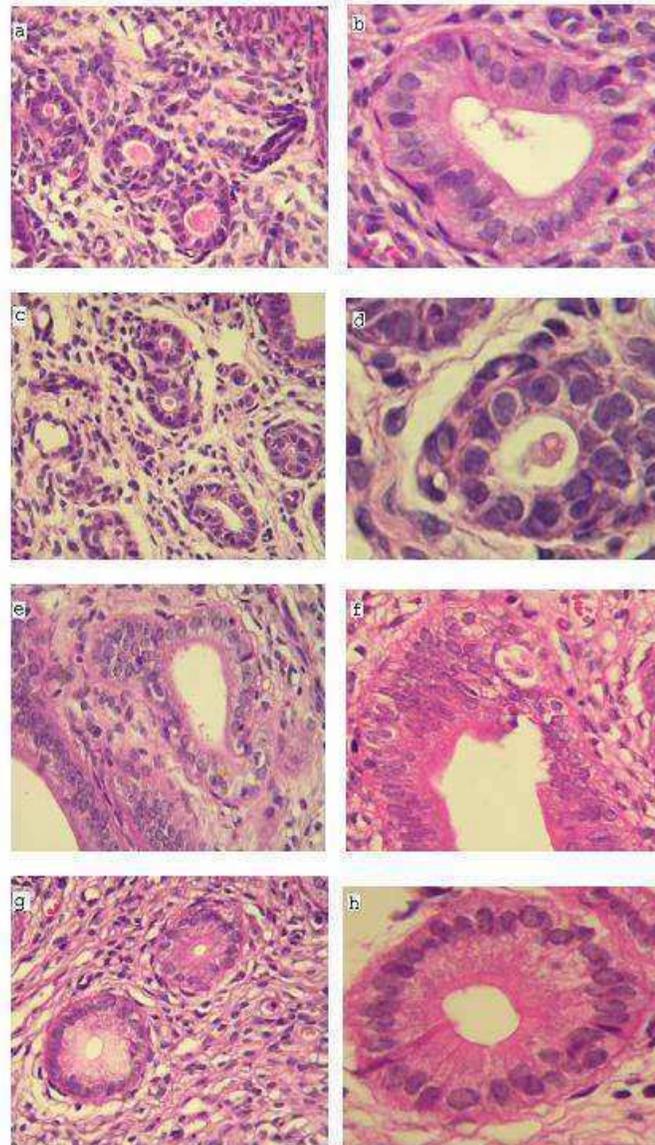


Figura 3: Los úteros de animales que habían sido hiperandrogenizados y/o tratados con Metformina durante 20 días fueron extraídos, fijados, incluidos en parafina y seccionados como se describe en materiales y métodos. Luego, fueron teñidos con hematoxilina-eosina a fines de evaluar la histología uterina. N= 10 animales/grupo. **a y b:** Control; **c y d:** Metformina; **e y f:** DHEA y **g y h:** DHEA+Metformina. Aumentos: a, c, e y g: 100x; b, d, f y h: 200x.

Actividad de la Óxido Nítrico Sintasa uterina

El óxido nítrico (NO) es un relajante muscular que al ser sintetizado cumple un rol fundamental en la preñez, ya que se encuentra implicado en los procesos de implantación y decidualización. Pero, además, altos niveles de NO pueden ser perjudiciales para los tejidos ya que puede combinarse con especies reactivas del oxígeno (ROS), como el radical superóxido, formando peroxinitrito, una especie muy reactiva del nitrógeno (RNS) que causa daño tisular (nitración protéica, lipídica y al ADN), llevando, en muchos casos, a la apoptosis celular. Es por ello que, a continuación, estudiamos la actividad de la enzima responsable de su síntesis: la Oxido Nítrico Sintasa (NOS).

La actividad de la NOS uterina se vió incrementada con respecto a los controles al tratar a los animales con DHEA (Figura 4). El tratamiento conjunto de DHEA con Metformina normalizó la actividad de NOS uterina a los niveles de los controles (Figura 4).

Evaluación del balance oxidante/antioxidante del tejido uterino

El incremento en la producción de NO nos dio un indicio de que la hiperandrogenización podría estar produciendo un desequilibrio en el balance oxidante/ antioxidante en las células uterinas, por esa razón el próximo objetivo fue evaluar las defensas antioxidantes en el tejido uterino.

La protección contra las especies reactivas del oxígeno en las células está dada por las enzimas SOD, Catalasa y Glutati6n peroxidasa (GPX), además de metabolitos como el GSH y las vitaminas.

1. Actividad de la Superóxido Dismutasa

Las SODs son un grupo de metaloenzimas que detoxifican ROS mediante la conversi6n del radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2). En este trabajo, la actividad total de la SOD fue medida utilizando un método espectrofotométrico basado en la inhibici6n de la oxidaci6n de la epinefrina inducida por SOD [219].

Como se ve en la figura 5A, tanto el grupo que sólo recibió Metformina como el que fue hiperandrogenizado y el que fue hiperandrogenizado y tratado

simultáneamente con Metformina presentaron una disminuída actividad de la SOD respecto de los animales del grupo control (Figura 5A).

2. *Concentración de Catalasa*

Uno de los mecanismos antioxidantes enzimáticos mejor descritos es el llevado a cabo por la enzima Catalasa. Con el fin de estudiar si el H_2O_2 producido por la acción de la SOD es detoxificado, se evaluó la actividad de la enzima Catalasa., que cataliza la conversión de H_2O_2 a O_2 y H_2O .

Encontramos que la hiperandrogenización con DHEA disminuyó la concentración de Catalasa respecto de los úteros control y el tratamiento conjunto de DHEA y Metformina no previno la disminución producida por la hiperandrogenización (Figura 5B).

3. *Contenido de Glutation total*

Teniendo en cuenta que el H_2O_2 también puede ser convertido a H_2O mediante la acción de la GPX a partir de la utilización del metabolito antioxidante GSH (ver ecuación 3), se evaluó la concentración de este último en los úteros de los diferentes grupos de trabajo.

Como se ve en la figura 5C, el grupo de animales tratados con DHEA presentó una disminución del antioxidante GSH en el tejido uterino respecto de los controles. El tratamiento conjunto de DHEA con Metformina no normalizó los niveles de GSH uterino (Figura 5C).

Efecto de la hiperandrogenización y de Metformina sobre la actividad de la Óxido Nítrico Sintasa uterina

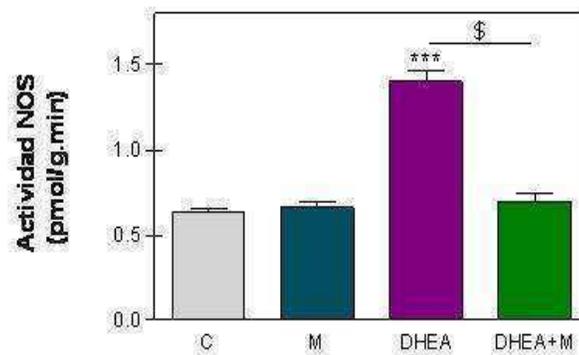


Figura 4: La actividad de la Óxido Nítrico Sintasa (NOS) fue evaluada a través de la cuantificación de la ^{14}C -citrulina formada a partir de ^{14}C -L-arginina en homogenatos de úteros provenientes de animales que habían sido hiperandrogenizados y/o tratados con Metformina durante 20 días. $N=5$ animales/ grupo. Cada barra representa la media \pm SEM. Los resultados fueron evaluados por el test de ANOVA seguido de la prueba de Tukey. Las diferencias fueron consideradas significativas para $P < 0.05$, $***P < 0.001$ y $\$P < 0.001$.

Evaluación del estado de las defensas antioxidantes uterinas luego de la hiperandrogenización y del tratamiento con Metformina

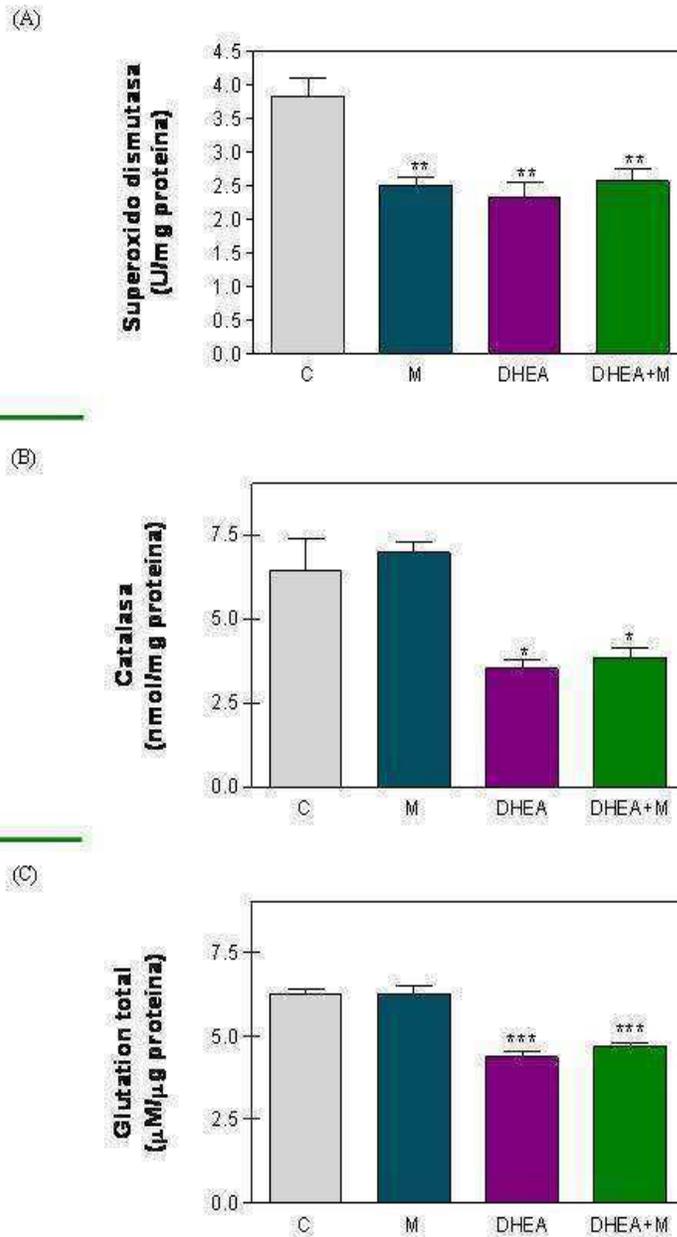


Figura 5: Por espectrofotometría se evaluaron: (A) la actividad de Superóxido dismutasa, (B) la actividad de Catalasa y (C) los niveles del metabolito Glutacion, en úteros de animales que habían sido hiperandrogenizados y/o tratados con Metformina durante 20 días. N= 10 animales/ grupo. Cada barra representa la media \pm SEM. Los resultados fueron evaluados por el test de ANOVA seguido de la prueba de Tukey. Las diferencias fueron consideradas significativas para $P < 0.05$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$.

Secreción de Prostaglandinas y su modulación

1. Niveles de PGE producida y liberada por los úteros

La PGE es un prostanoide con función luteotrófica de manera que su síntesis favorece el mantenimiento del cuerpo lúteo funcional, la alta síntesis de progesterona y consecuentemente la receptividad uterina. Se ha descrito, además, que los niveles elevados de andrógenos disminuyen la receptividad uterina. Por esas razones, nuestro objetivo fue analizar si la hiperandrogenización con DHEA afecta la producción y liberación uterina de PGE y evaluar, además, el efecto del tratamiento con Metformina. Para ello, luego de los 20 días de tratamiento, se extrajeron los úteros de los cuatro grupos de animales, se incubaron como se describió en Materiales y Métodos y se evaluaron los niveles de PGE liberados por medio de RIA.

La hiperandrogenización produjo la disminución de la producción de PGE respecto de los controles (Figura 6A). Por otra parte, el tratamiento conjunto de DHEA con Metformina no previno la disminución producida por la hiperandrogenización (Figura 6A).

2. Niveles de $PGF_{2\alpha}$ producida y liberada por los úteros

La $PGF_{2\alpha}$ es un prostanoide con función luteolítica, vasoconstrictora y estimuladora de las contracciones de la musculatura uterina, haciendo que el útero se encuentre menos receptivo. Como, además, se ha visto que los niveles elevados de andrógenos disminuyen la receptividad uterina, nuestro próximo objetivo fue analizar si la hiperandrogenización con DHEA y el tratamiento con Metformina afectan la producción y liberación uterina de $PGF_{2\alpha}$. Para ello, luego de los 20 días de tratamiento, se extrajeron los úteros de los cuatro grupos de animales, se incubaron como se describió en materiales y métodos y se evaluaron los niveles de $PGF_{2\alpha}$ liberados por medio de RIA.

La hiperandrogenización produjo un incremento en la producción de $PGF_{2\alpha}$ respecto de los controles (Figura 6B). El tratamiento conjunto de DHEA y Metformina normalizó los niveles de PGF_2 (Figura 6B).

Niveles de Prostaglandina E y F_{2α} liberadas por los úteros luego de la hiperandrogenización y del tratamiento con Metformina

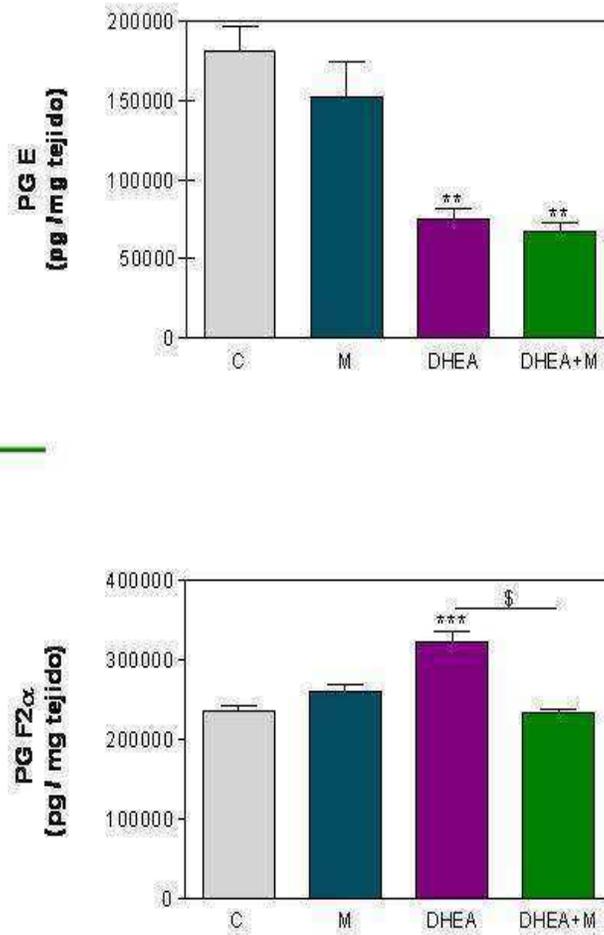


Figura 6: Por radioinmunoensayo se evaluaron los niveles de Prostaglandina E y F_{2α} liberadas por úteros de animales que habían sido hiperandrogenizados y/o tratados con Metformina durante 20 días. N= 10 animales/grupo. Cada barra representa la media ± SEM. Los resultados fueron evaluados por el test de ANOVA seguida de la prueba de Tukey. Las diferencias fueron consideradas significativas para P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 y \$P < 0.001.

3. *Expresión proteica de las enzimas COX-1 y COX-2 uterinas*

Dado que habíamos observado que DHEA alteraba la síntesis de PGs y dichos eicosanoides son sintetizados por de las Cicloxigenasas, evaluamos la expresión proteica de la COX-1 y de la COX-2 uterinas.

Por Western Blot, encontramos que la expresión de la COX-1 no era modificada por ninguno de los tratamientos (Figura 7). Mientras que al analizar la abundancia de COX-2, hallamos que el tratamiento con DHEA disminuyó los niveles de COX-2 respecto de los controles. Cuando se administró Metformina conjuntamente con DHEA, la abundancia de COX-2 fue similar a los del grupo control (Figura 7).

4. *Expresión génica de la enzima 9-Cetorreductasa en el útero*

Observar que la hiperandrogenización produjo una disminución de la PGE junto con el incremento de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ mientras que la expresión de COX-2 se veía disminuida, nos condujo a preguntarnos a que se debía el incremento de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Es por ello que decidimos evaluar la expresión de la enzima 9-Cetorreductasa (CBR1), responsable de la conversión de PGE a $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Encontramos que la hiperandrogenización produjo un incremento en la expresión del ARNm que codifica para CBR1, efecto que fue revertido al tratar conjuntamente con DHEA y Metformina (Figura 8).

Efecto de la hiperandrogenización y de Metformina sobre la expresión proteica de la Cicloxigenasa 1 y 2

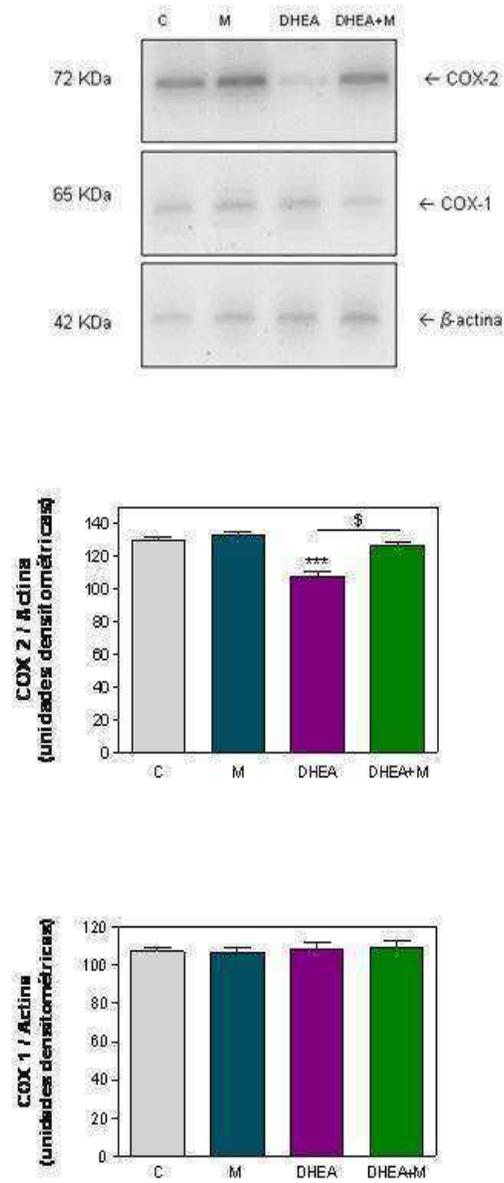


Figura 7: En úteros de animales que habían sido hiperandrogenizados y/o tratados con Metformina durante 20 días, se evaluó la expresión de la isoforma 1 y 2 de la enzima cicloxigenasa (COX) a nivel proteico por medio de Western Blot. N= 6 animales/ grupo. Cada barra representa la media \pm SEM. Los resultados fueron evaluados por el test de ANOVA seguido de la prueba de Tukey. Las diferencias fueron consideradas significativas: para $P < 0.05$, $***P < 0.001$ respecto a los controles (C y M) y $^{\$}P < 0.001$.

Niveles del ARN mensajero que codifica para la enzima 9-Cetorreductasa

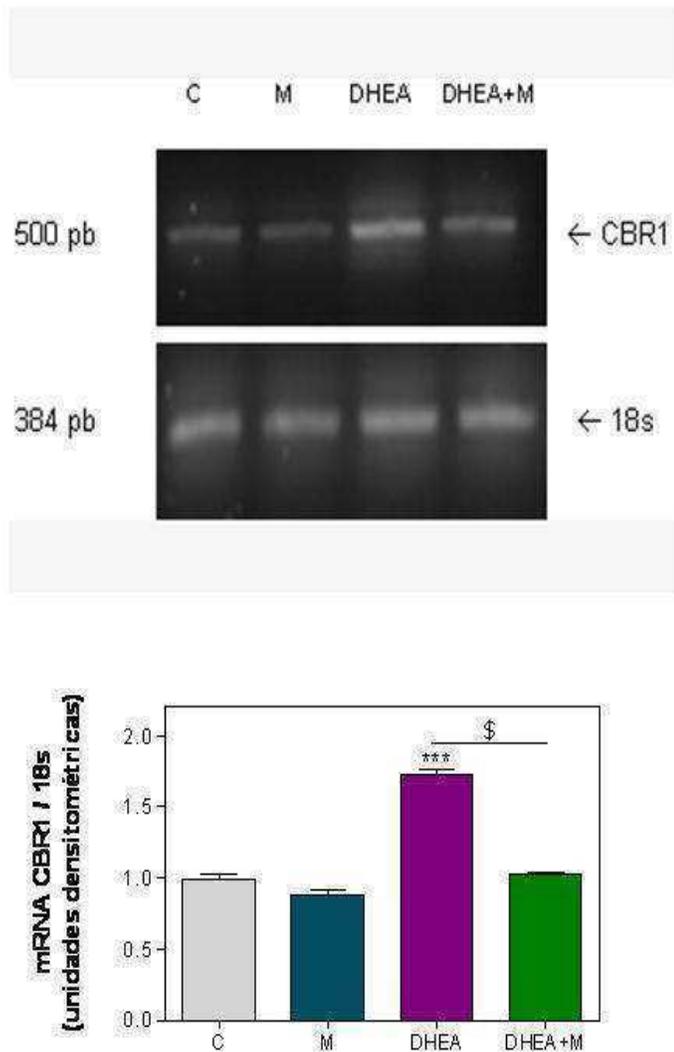


Figura 8: En úteros de animales que habían sido hiperandrogenizados y/o tratados con Metformina durante 20 días, se evaluó la expresión del ARNm que codifica para la enzima 9-cetorreductasa (CBR1) por medio de RT-PCR. N= 5 animales/ grupo. Cada barra representa la media \pm SEM. Los resultados fueron evaluados por el test de ANOVA seguido de la prueba de Tukey. Las diferencias fueron consideradas significativas para $P < 0.05$. *** $P < 0.001$ respecto de los controles (C y M), \$ $P < 0.001$.

Análisis de la expresión génica y proteica de los receptores PPAR γ en el útero

Las prostaglandinas y los leucotrienos actúan como ligandos de receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs). Además, se sabe que existe una modulación de la expresión del PPAR γ por la COX-2. Dadas las alteraciones observadas en la liberación de prostaglandinas y en la expresión de COX-2 producto de la hiperandrogenización, nos propusimos evaluar si el exceso de andrógenos alteraba la expresión de los receptores PPAR γ en los úteros. Para ello, se analizó su expresión a nivel de ARNm por RT-PCR y a nivel de proteína por Western Blot.

Como puede observarse en la figura 9A, los tratamientos no tuvieron efecto sobre la expresión de mRNA que codifica para los receptores PPAR γ , sin embargo en grupo control que sólo recibió Metformina mostró un incremento en los niveles del mensajero que codifica para los receptores.

Al analizar la expresión proteica de dicho receptor, detectamos ambas isoformas del receptor (γ 1 y γ 2) en el tejido uterino. La expresión de ninguna de las dos isoformas fue modificada por los tratamientos (Figura 9B).

Efecto de la hiperandrogenización y de Meformina sobre la expresión génica y proteica del PPAR γ

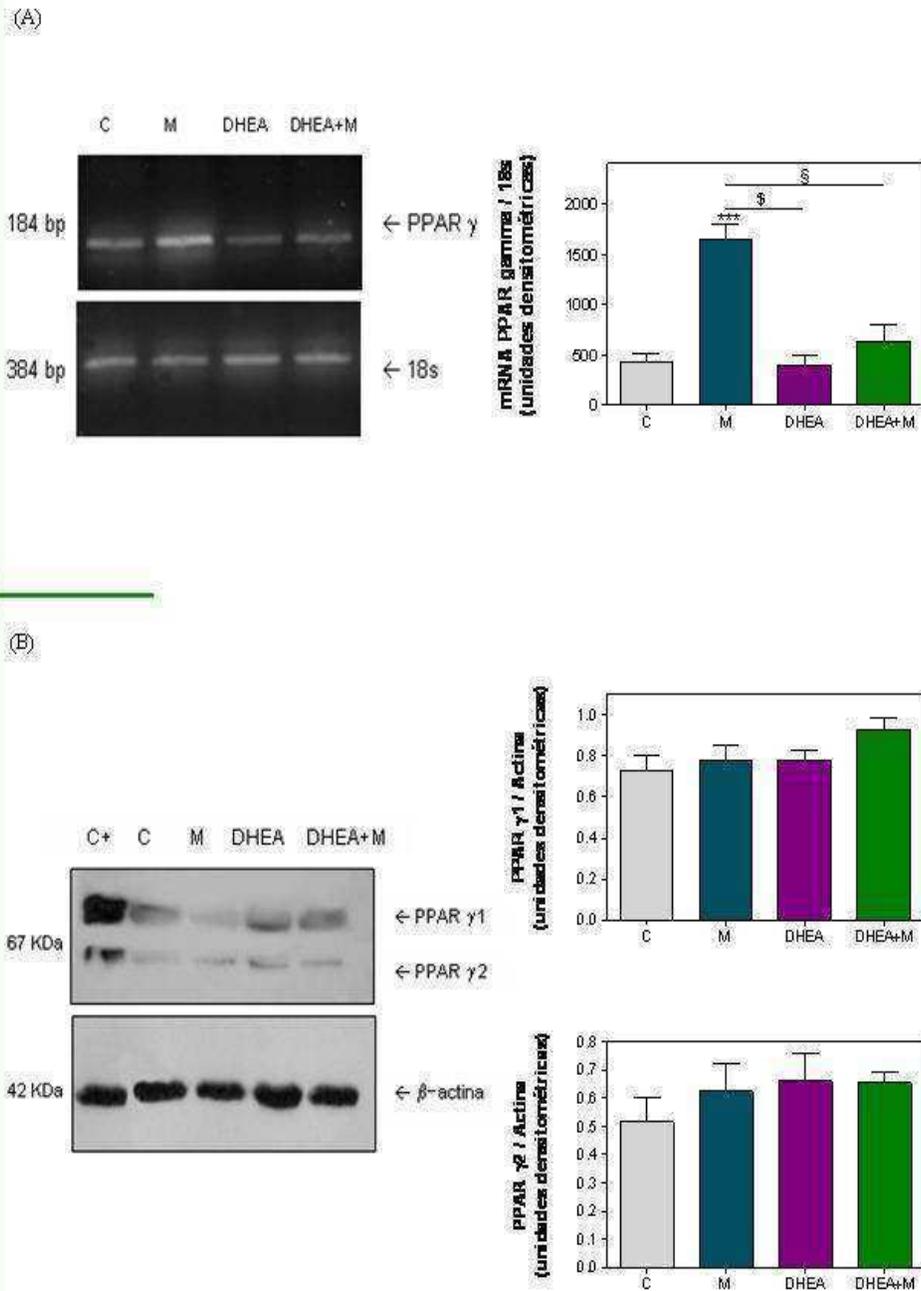


Figura 9: En úteros de animales que habían sido hiperandrogenizados y/o tratados con Meformina durante 20 días, se evaluó la expresión del receptor PPAR γ : (A) la nivel génica por medio de RT-PCR, y (B) a nivel proteico por medio de Western Blot. N= 6 animales/ grupo. Cada barra representa la media \pm SEM. Los resultados fueron evaluados por el test de ANOVA seguido de la prueba de Tukey. Las diferencias fueron consideradas significativas para $P < 0.05$. *** $P < 0.001$ respecto al Control. § $P < 0.001$ y § $P < 0.01$.

Disponibilidad de ligandos de PPAR γ

El no observar alteraciones en la expresión de los receptores PPAR γ no siempre implica que la actividad de dichos receptores sea normal ya que si, por ejemplo, la disponibilidad de ligandos fuera menor, dicha actividad se vería disminuida. Es por ellos que nuestro próximo objetivo fue evaluar la disponibilidad de: 15d-PGJ₂, proveniente de la vía de la COX y los ácidos hidroieicosatetraenoicos (HETEs) e hidroioctadecadienoicos (HODEs), provenientes de la vía de las LOXs, todos ligandos naturales de PPAR γ .

1. Expresión de la enzima 15-Lipoxigenasa en el útero

La 15-LOX es la enzima que cataliza la conversión de ácido araquidónico y linoleico en ácidos 15-HETE y 15-HODE, ligandos naturales de PPAR γ . La expresión de la 15-LOX fue estudiada a nivel de ARNm por RT-PCR y a nivel de proteína por Western Blot.

Al analizar la expresión del ARNm que codifica para la 15-LOX, encontramos que ninguno de los tratamientos alteró dicha expresión (Figura 10A).

Estos resultados se correlacionaron con los de la expresión proteica de la 15-LOX, donde observamos que tampoco fue modificada por ninguno de los tratamientos (Figura 10B).

2. Análisis de la abundancia de la enzima 12- Lipoxigenasa uterina

La enzima 12-LOX es la responsable de convertir ácido araquidónico y linoleico en ácidos 12-HETE y 12-HODE, ligandos naturales de PPAR γ . Los niveles de ARNm y de la proteína 12-LOX fueron estudiados por RT-PCR y por Western Bolt respectivamente.

Como puede observarse en la figura 11A, la hiperandrogenización produjo una disminución en la expresión del ARNm que codifica para la 12-LOX, hecho que no fue revertido al tratar conjuntamente con DHEA y Metformina.

A nivel proteico, encontramos que el grupo DHEA presentó una menor expresión de 12-LOX uterina comparado con los controles. La Metformina administrada conjuntamente con DHEA previno el efecto del andrógeno, llevando los niveles de 12-LOX a los del grupo control (Figura 11B).

3. Expresión de la Prostaglandina D Sintasa en el útero

La PGDS es la enzima responsable de la síntesis de PGD₂. Este prostanoides es altamente inestable y es convertido, no enzimáticamente, a 15d-PGJ₂, otro ligando natural del PPAR γ .

La expresión de la PGDS fue estudiada a nivel de ARNm por RT-PCR. Como puede observarse en la figura 12, la hiperandrogenización produjo una disminución en la expresión del ARNm que codifica para la PGDS. Dicho efecto no fue revertido al tratar conjuntamente con DHEA y Metformina.

Efecto de la hiperandrogenización y de Metformina sobre la expresión génica y proteica de la 15-Lipoxigenasa

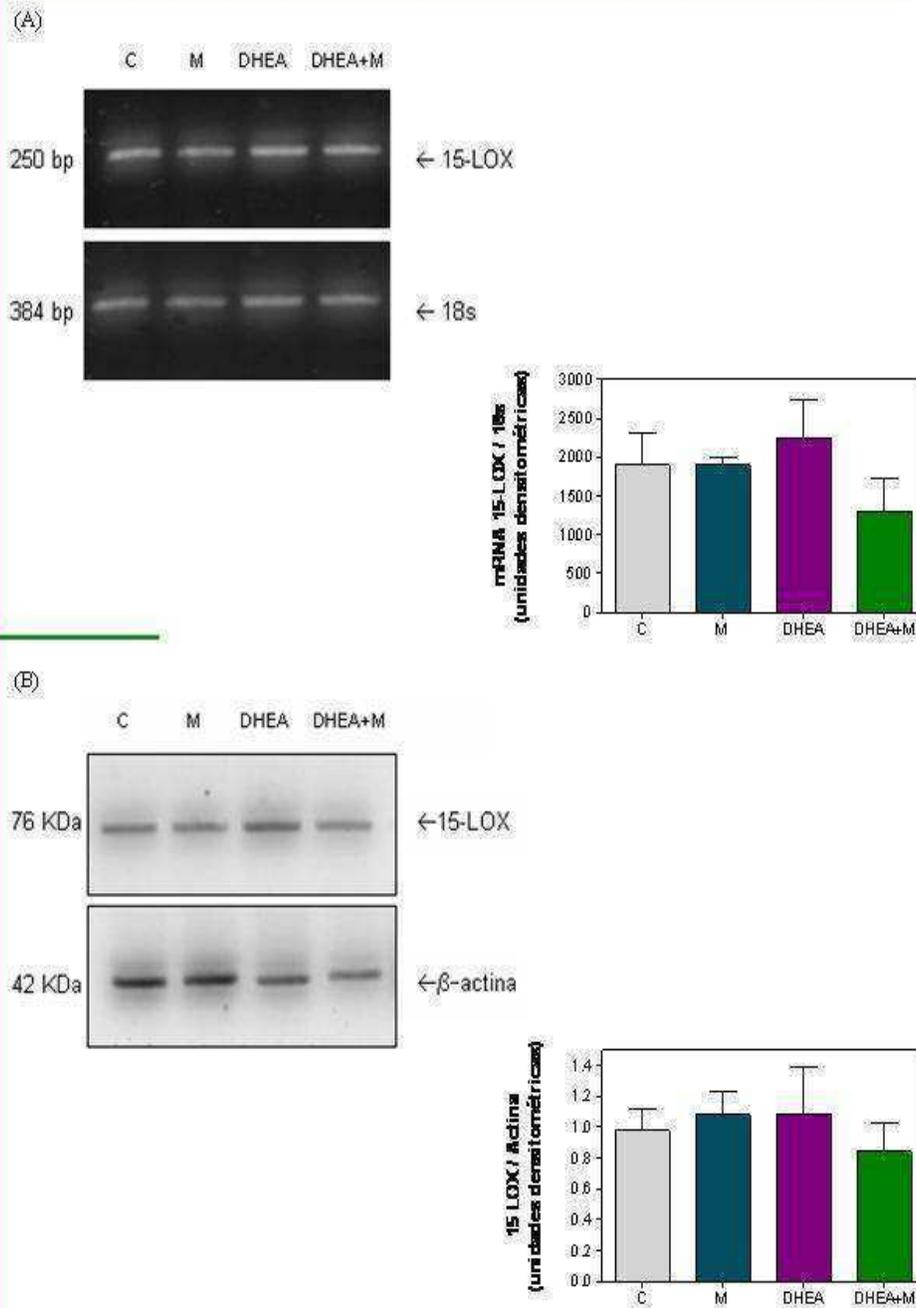


Figura 10: En úteros de animales que habían sido hiperandrogenizados y/o tratados con Metformina durante 20 días, se evaluó la expresión de la enzima 15-Lipoxigenasa (15-LOX): (A) a nivel génico por medio de RT-PCR; y (B) a nivel proteico por medio de Western Blot. N= 7 animales/ grupo. Cada barra representa la media \pm SEM. Los resultados fueron evaluados por el test de ANOVA seguido de la prueba de Tukey. Las diferencias fueron consideradas significativas para $P < 0.05$.

Efecto de la hiperandrogenización y de Metformina sobre la expresión génica y proteica de la 12-Lipoxigenasa

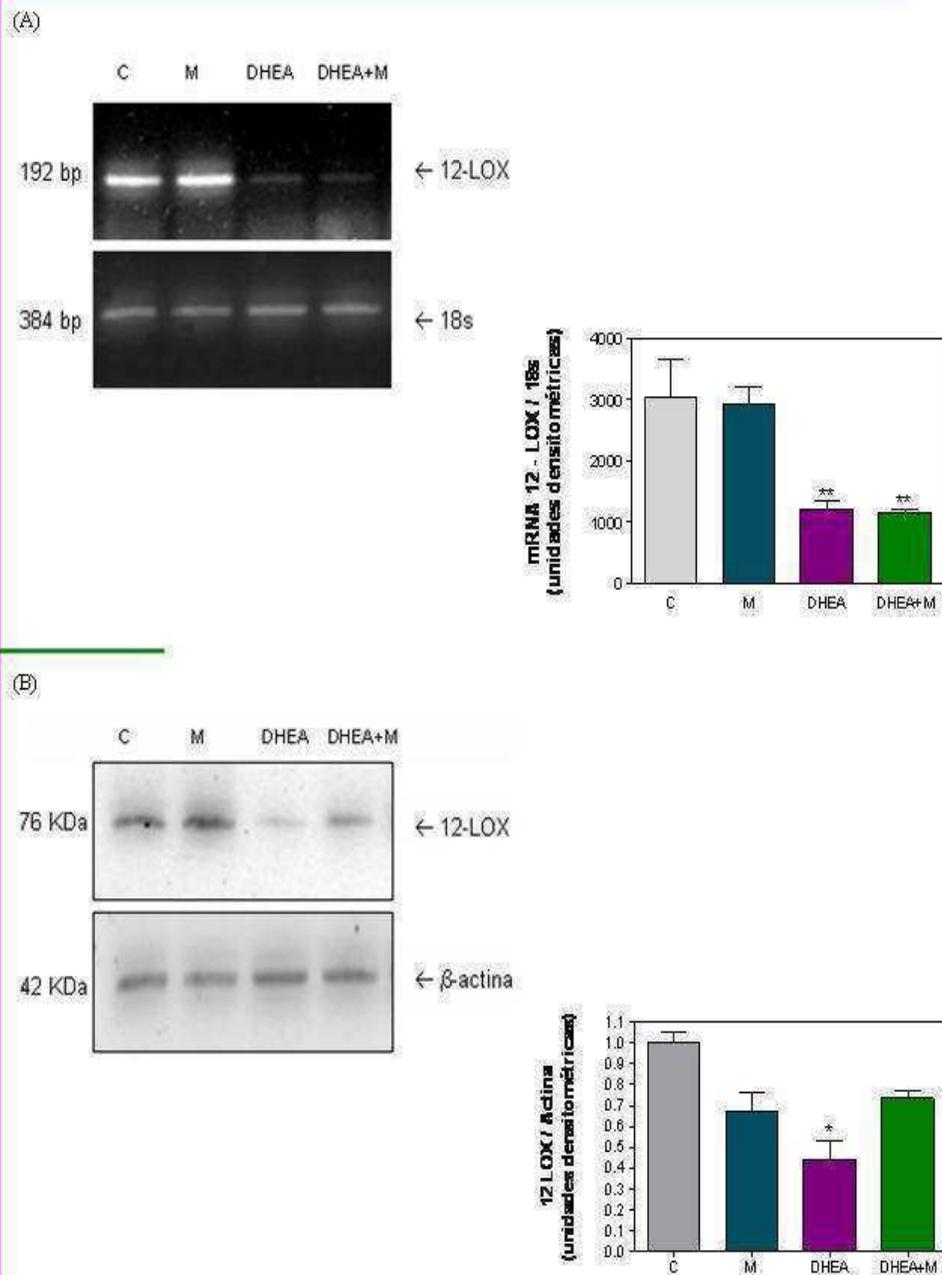


Figura 11: En úteros de animales que habían sido hiperandrogenizados y/o tratados con Metformina durante 20 días, se evaluó la expresión de la enzima 12Lipoxigenasa (12-LOX): (A) a nivel génico por medio de RT-PCR, y (B) a nivel proteico por medio de Western Blot. N= 7 animales/ grupo. Cada barra representa la media \pm SEM. Los resultados fueron evaluados por el test de ANOVA seguido de la prueba de Tukey. Las diferencias fueron consideradas significativas para $P < 0.05$. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.001$ respecto al Control.

Niveles del ARN mensajero que codifica para la enzima Prostaglandina D Sintetasa

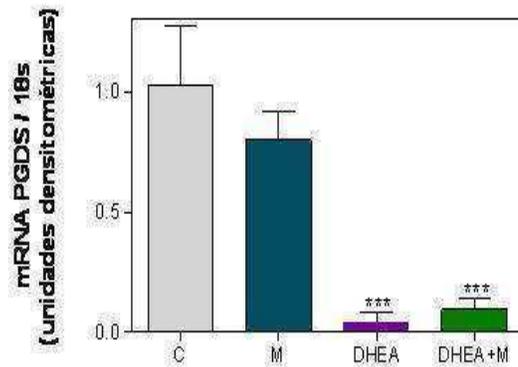
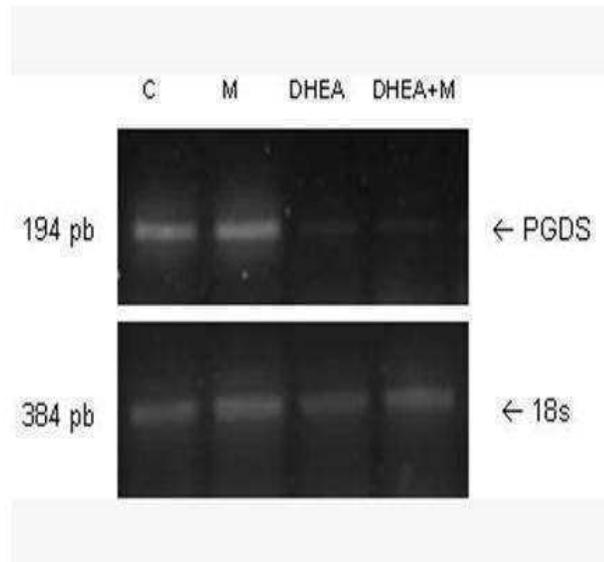


Figura 12: En úteros de animales que habían sido hiperandrogenizados y/o tratados con Metformina durante 20 días, se evaluó la expresión del ARNm que codifica para la enzima Prostaglandina D Sintasa (PGDS) por medio de RT-PCR. N= 6 animales/grupo. Cada barra representa la media \pm SEM. Los resultados fueron evaluados por el test de ANOVA seguido de la prueba de Tukey. Las diferencias fueron consideradas significativas para $P < 0.05$. *** $P < 0.001$ respecto de los controles (C y M).

Niveles de apoptosis en los úteros

Los receptores PPAR γ regulan numerosos procesos claves para las células, entre ellos el proceso de apoptosis. Por otro lado las alteraciones observadas a nivel histológico en los úteros podía deberse a alteraciones en el proceso apoptótico. Es por estas razones que decidimos evaluar el índice de apoptosis en el tejido uterino hiperandrogenizado y/o tratado con metformina.

La apoptosis fue evaluada cuantificando la fragmentación del DNA, en cortes histológicos de los úteros, utilizando la técnica: *Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick-end labeling* (TUNEL) y utilizando como contraindicación el 4', 6- diamidino-2- phenylindole (DAPI) como se describe en materiales y métodos.

En la figura 13 se muestran fotos representativas de los cortes evaluados. En la figura 14 se grafica el análisis de las fotografías realizado empleando el programa Image J. Como puede observarse, la hiperandrogenización produjo un incremento en la cantidad de núcleos apoptóticos presentes en los endometrios respecto de endometrios provenientes de animales control (Figura 14A) mientras que el tratamiento simultáneo con Metformina previno ese efecto. Un patrón similar fue observado al analizar que le ocurría al epitelio endometrial. Se detectó un incremento en el grado de apoptosis producto de la hiperandrogenización que fue prevenido al tratar simultáneamente con Metformina (Figura 14B). La misma tendencia fue observada al analizar particularmente lo que ocurría en el estroma endometrial. El tratamiento de Metformina junto con DHEA normalizó los niveles de apoptosis a los niveles control (Figura 14C).

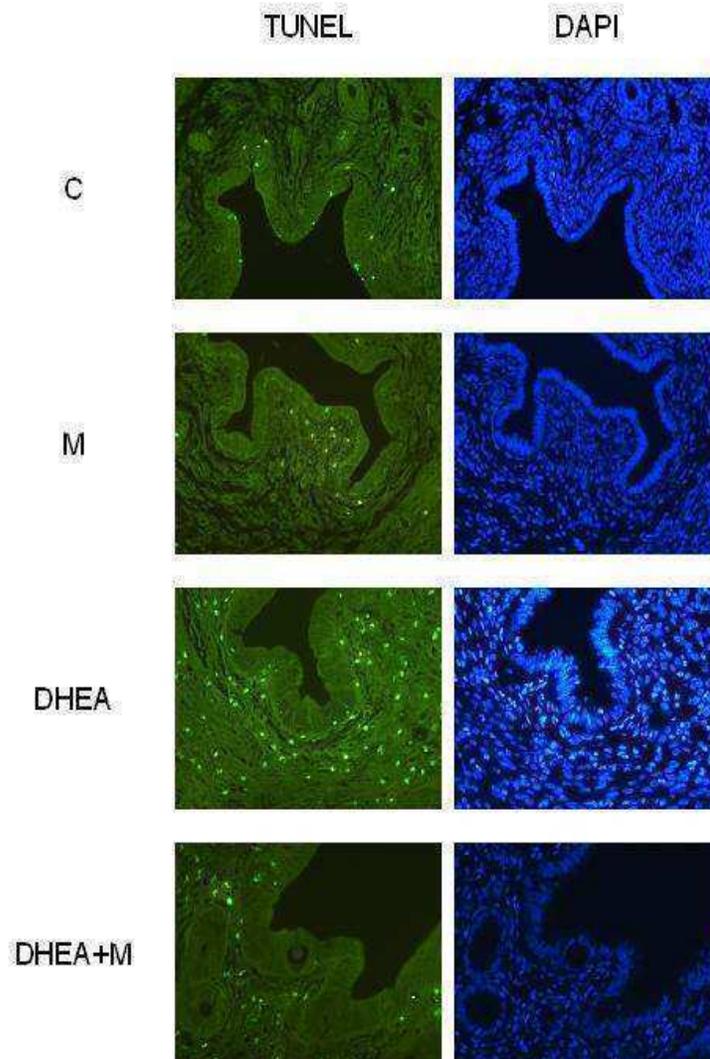
Efecto de la hiperandrogenización y del tratamiento con Metformina sobre la apoptosis uterina

Figura 13: Los úteros de animales que habían sido hiperandrogenizados y/o tratados con Metformina durante 20 días fueron extraídos, fijados, incluidos en parafina y seccionados como se describe en materiales y métodos. Luego, por la técnica de TUNEL, se evaluó el grado de apoptosis presente en las células uterinas de animales que habían sido hiperandrogenizados y/o tratados con Metformina durante 20 días. N= 10 animales/ grupo. Aumentos: 100x.

Efecto de la hiperandrogenización y del tratamiento con Metformina sobre la apoptosis uterina

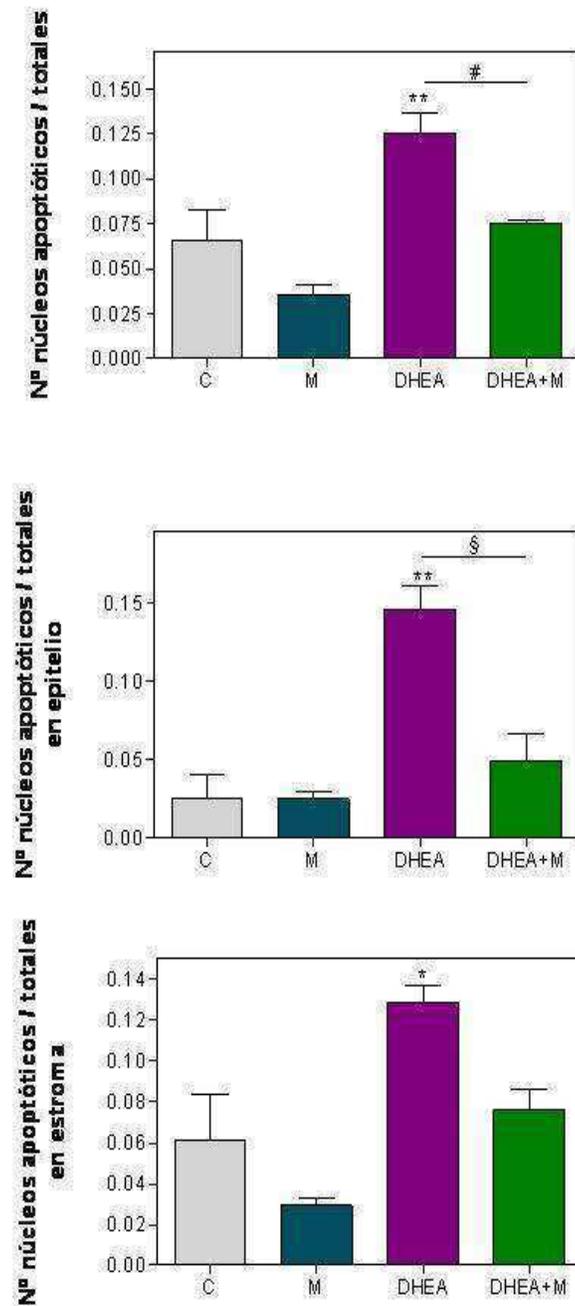


Figura 14: Cuantificación de las imágenes obtenidas luego de realizar la técnica de TUNEL. Cada barra representa el promedio de los núcleos apoptóticos respecto de la totalidad de núcleos detectados en cada corte \pm SEM. Se evaluaron 3 cortes histológicos de úteros por animal y se utilizaron 10 animales/ grupo. Los resultados fueron evaluados por el test de ANOVA seguido de la prueba de Tukey. Las diferencias fueron consideradas significativas para $P < 0.05$. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ respecto al Control. # $P < 0.05$ y § $P < 0.01$.

Proliferación celular endometrial

Otro de los procesos regulados por los receptores PPAR γ es la proliferación celular, proceso que también se halla altamente regulado por los estrógenos a nivel endometrial. Debido al incremento del grosor endometrial, en el tipo de glándulas y en el tipo de epitelio observado, decidimos evaluar si la proliferación celular se veía alterada como consecuencia de la hiperandrogenización. Para ello evaluamos la expresión del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA).

Encontramos un incremento de células en etapa proliferativa en el epitelio luminal de los endometrios de animales que habían sido hiperandrogenizados respecto de los controles. Por otro lado, los animales que habían sido tratados simultáneamente con DHEA y Metformina presentaron niveles de proliferación similares a los animales control (Figura 15).

Efecto de la hiperandrogenización y del tratamiento con Metformina sobre la proliferación celular uterina

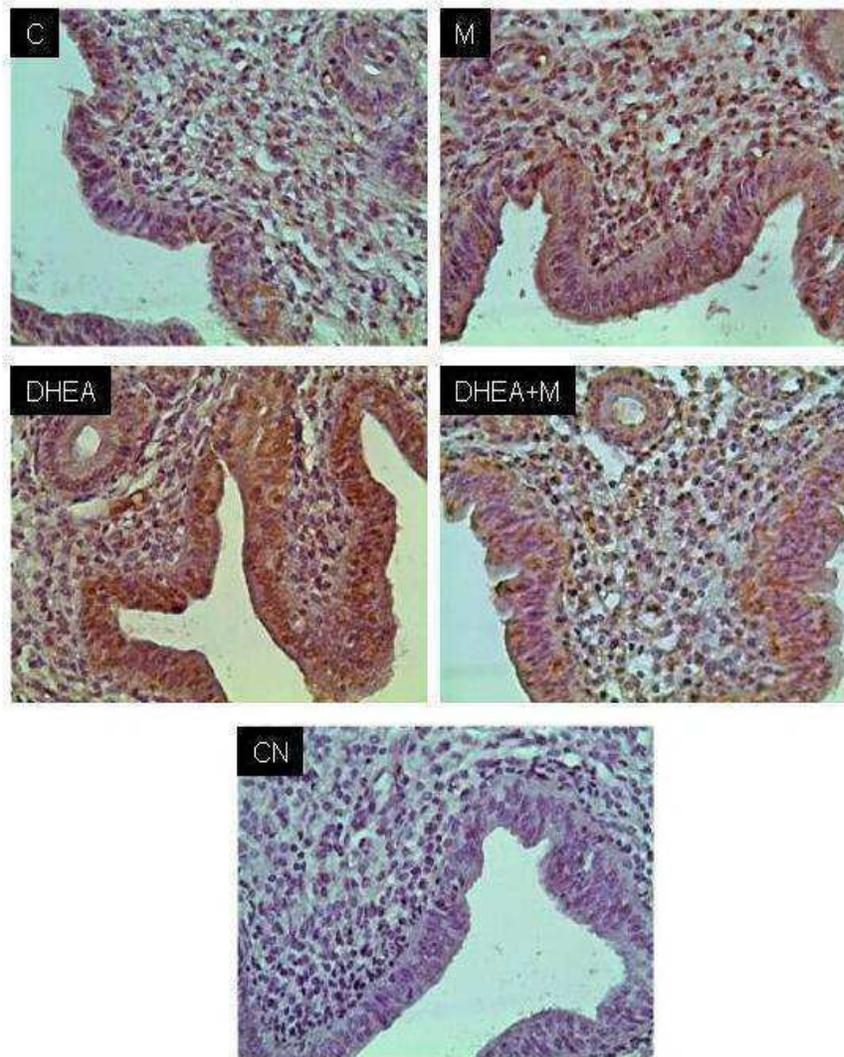


Figura 15: Los úteros de animales que habían sido hiperandrogenizados y/o tratados con Metformina durante 20 días fueron extraídos, fijados, incluidos en parafina y seccionados como se describe en materiales y métodos. Luego, por inmunohistoquímica con anticuerpos anti antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) , se evaluó el grado de células en proliferación presentes en los úteros de animales que habían sido hiperandrogenizados y/o tratados con Metformina durante 20 días. N= 10 animales/ grupo. Aumentos: 100x. CN: control negativo

Capítulo II: Efectos de la hiperandrogenización y del tratamiento conjunto Metformina+Rosiglitazona

Efecto de los tratamientos sobre el peso corporal

Como se describió en el primer capítulo de Resultados, cuando se evaluaron los pesos corporales de los animales luego del día 20 de tratamiento, se detectó un aumento en los pesos de los animales que habían sido hiperandrogenizados con DHEA; que no era prevenido al tratarlos simultáneamente con Metformina. Es por ello que nuestro próximo objetivo fue evaluar si el tratamiento combinado Metformina+Rosiglitazona prevenía dicho incremento.

Observamos que la combinación de Metformina + Rosiglitazona fue capaz de evitar el incremento en el peso corporal producido por la hiperandrogenización. Sin embargo, al administrar solo Rosiglitazona conjuntamente con la hiperandrogenización, el peso corporal de los animales fue similar al de los animales control (Figura 16A).

Evaluación del peso uterino post tratamientos

En el capítulo anterior se describió el incremento en la relación entre el peso uterino y el corporal en animales que habían sido hiperandrogenizados mientras que dicho aumento no fue prevenido al tratar con Metformina. Es por esa razón que nuestro próximo propósito fue evaluar si el tratamiento combinado Metformina+Rosiglitazona era capaz de prevenir dicha alteración.

Encontramos que ni el tratamiento con Rosiglitazona sola ni el combinado con Metformina evitó el efecto de los andrógenos dicho efecto (Figura 16B) y que, seguramente, dicho aumento se debió al aumento en el grosor endometrial (Figura 16C).

Características morfológicas de los ratones y sus úteros luego de la hiperandrogenización y de los tratamientos con Metformina y/o Rosiglitazona

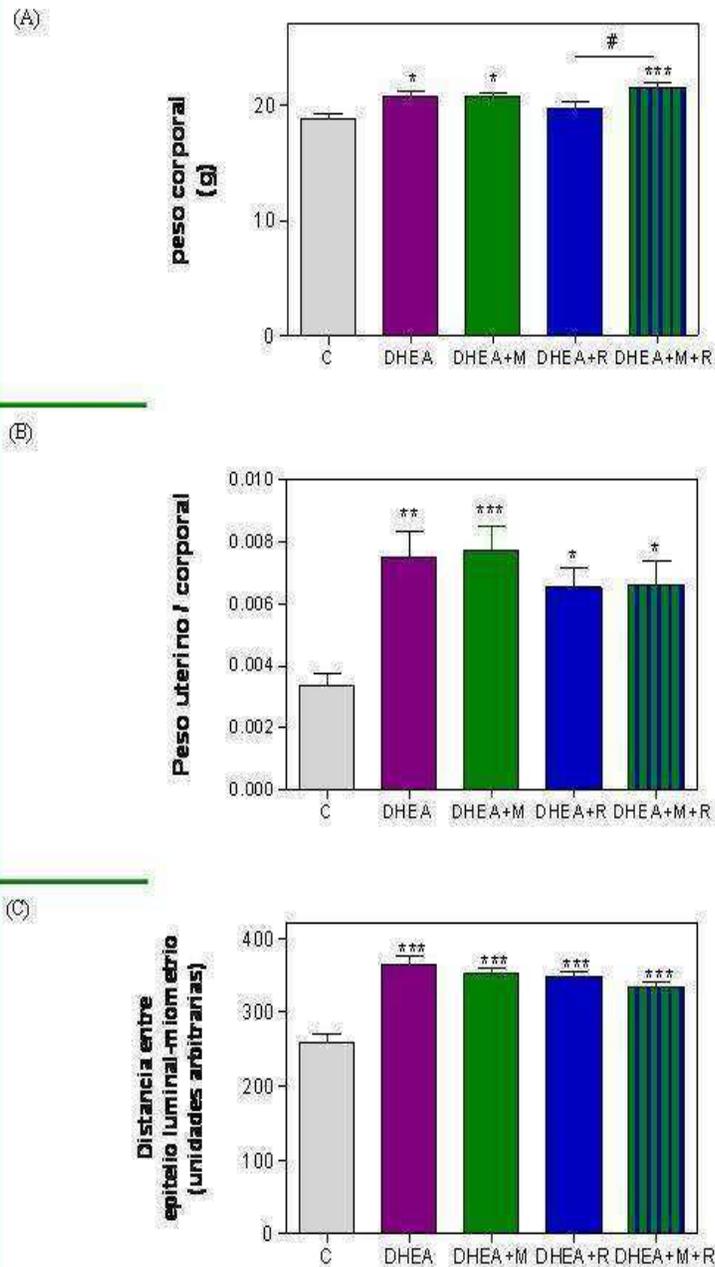


Figura 16: Variaciones del peso corporal (A), del peso uterino (B) y de la distancia entre epitelio luminal y miometrio uterino (C) luego de 20 días de hiperandrogenización y de la administración de Metformina y/o Rosiglitazona. N= 10 animales/ grupo. Cada barra representa la media \pm SEM. Los resultados fueron evaluados por el test de ANOVA seguido de la prueba de Tukey. Las diferencias fueron consideradas significativas para $P < 0.05$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ respecto al Control. # $P < 0.05$.

Evaluación del balance oxidante/antioxidante del tejido uterino

En el primer capítulo de esta sección se encontró que la hiperandrogenización produjo una disminución en las defensas antioxidantes presentes en el útero que no era prevenida al tratar con Metformina. Como en la clínica se ha visto que, en muchos casos, se obtienen mejores resultados cuando el tratamiento administrado para el SOP es la combinación de drogas Metformina+Rosiglitazona que cuando se administra Metformina sola, nuestro próximo objetivo fue evaluar si el tratamiento conjunto Metformina+Rosiglitazona normalizaba los parámetros oxidativos que eran alterados por la hiperandrogenización y que Metformina como monoterapia no logra prevenir.

1. Actividad de la Superóxido Dismutasa

Como se describió anteriormente, encontramos que el hiperandrogenismo producía una disminución en la actividad de la SOD, que no fue prevenido cuando la DHEA fue administrada conjuntamente con Metformina. Al analizar si el tratamiento conjunto Metformina+Rosiglitazona normalizaba los niveles de SOD alterados como producto de la hiperandrogenización, encontramos que dicho tratamiento tampoco era capaz de hacerlo (Figura 17A).

2. Concentración de Catalasa

Con el fin de estudiar si el H_2O_2 producido por la acción de la SOD es detoxificado, se evaluó la actividad de la enzima Catalasa, que cataliza la conversión de H_2O_2 a O_2 y H_2O .

Como se describió en el primer capítulo de este trabajo de tesis, la hiperandrogenización con DHEA disminuyó la concentración de Catalasa respecto de los úteros control y el tratamiento conjunto de DHEA y Metformina no previno la disminución producida por la hiperandrogenización (Figura 17B). Sin embargo, cuando el andrógeno fue administrado junto con la combinación de Metformina+Rosiglitazona, los niveles de Catalasa fueron normalizados a los de los controles (Figura 17B).

3. *Contenido de Glutation total*

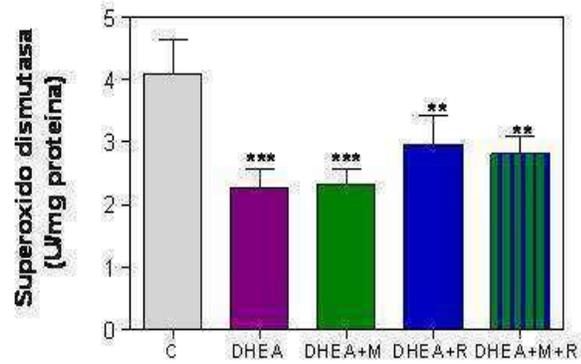
Teniendo en cuenta que el H_2O_2 también puede ser convertido a H_2O mediante la acción de la GPX a partir de la utilización del metabolito antioxidante GSH (ver esquema 2), se evaluó la concentración de este último en los úteros de los diferentes grupos de trabajo.

En el primer capítulo de este trabajo, habíamos observado que el grupo de animales tratados con DHEA presentaba una disminución del antioxidante GSH en el tejido uterino respecto de los controles y que el tratamiento conjunto de DHEA con Metformina no normalizaba los niveles de GSH uterino.

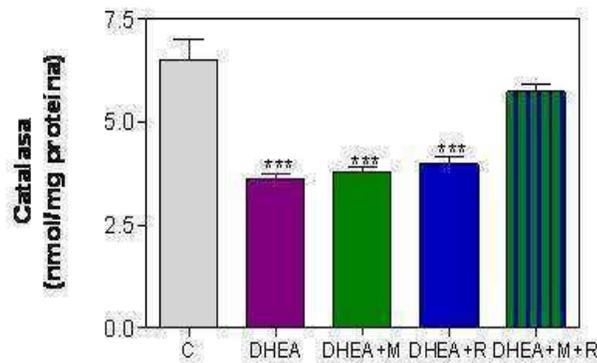
Cuando se aplicó la terapia combinada Metformina+Rosiglitazona conjuntamente con el andrógeno, observamos que los efectos del exceso de andrógenos fue prevenido y, como consecuencia de ello, los niveles de GSH fueron normalizados en los úteros provenientes de este grupo de animales (Figura 17C).

Evaluación del estado de las defensas antioxidantes uterinas luego de la hiperandrogenización y del tratamiento con Metformina y/o Rosiglitazona

(A)



(B)



(C)

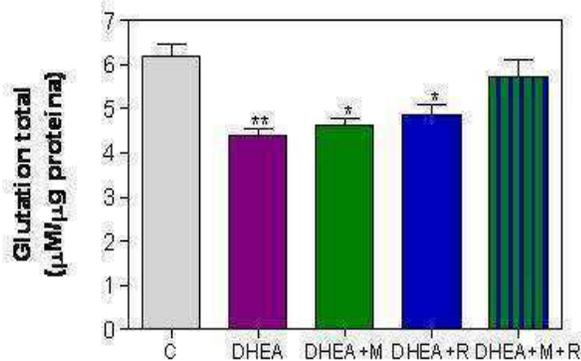


Figura 17: Por espectrofotometría se evaluaron: (A) la actividad de Superóxido dismutasa, (B) la actividad de Catalasa y (C) los niveles del metabolito Glutathion; en úteros de animales que habían sido hiperandrogenizados y tratados con Metformina y/o Rosiglitazona durante 20 días. N= 10 animales/ grupo. Cada barra representa la media \pm SEM. Los resultados fueron evaluados por el test de ANOVA seguido de la prueba de Tukey. Las diferencias fueron consideradas significativas para $P < 0.05$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$.

Discusión

El Síndrome del Ovario Poliquístico (SOP) constituye la patología más común asociada a la esterilidad femenina [4] y es una de las endocrinopatías más frecuentes entre las mujeres en edad reproductiva, representando al 4-18% de esta población, según el criterio utilizado para su diagnóstico (revisado en [5]).

Este síndrome no sólo produce alteraciones reproductivas, sino que se halla vinculado a numerosos desórdenes sistémicos (insulino resistencia, hiperinsulinemia, síndrome metabólico, etc.), siendo el hiperandrogenismo su defecto central [12]. A pesar de ser una condición biológica, el SOP no representa sólo un problema físico, sino uno psicosocial, que interfiere y compromete la calidad de vida de las mujeres afectadas [224].

El factor más importante implicado en la baja fertilidad de las pacientes con SOP es la anovulación. Sin embargo, en aquellas mujeres con SOP que presentan ciclos ovulatorios se observan fallas en la implantación embrionaria, riesgo incrementado de pérdida temprana de la gestación y complicaciones obstétricas tardías [4]. Tanto en el mantenimiento de la ciclicidad ovárica como en el establecimiento de la gestación se hallan alterados en esta patología. De hecho, se ha descrito que el endometrio de pacientes SOP difiere del endometrio normal. En mujeres que padecen SOP se han detectado altas tasas de abortos espontáneos [225, 226], así como alta incidencia de hiperplasia y de carcinoma endometrial [147, 148]. Estas pacientes presentan entre un 40-50% de abortos mientras que las tasas de aborto en mujeres normales es de entre el 20- 30 % [147, 157].

Los síntomas en las mujeres con SOP varían ampliamente, desde aquellas con parámetros bioquímicos alterados que no poseen manifestaciones clínicas del síndrome, hasta las que padecen las formas más severas de la patología, en las cuales se presentan diversos trastornos metabólicos, entre los que se cuentan la obesidad y sus complicaciones.

Esta gran heterogeneidad de síntomas, impide que exista un único tratamiento para el SOP, y al momento de elegir la estrategia a utilizarse, deben tenerse en cuenta todos los aspectos de la patología y las características particulares de la paciente, trabajando de forma interdisciplinaria de manera de poder abarcar los aspectos fisiológicos, psicológicos y sociales implicados en ella. En aquellas mujeres con diagnóstico de SOP que padecen obesidad central, la primera línea de tratamiento debe apuntar a cambios en el estilo de vida que promuevan dietas reducidas en grasas y la realización de ejercicio físico, ya que se ha demostrado que con una reducción

del 5-10% del peso corporal se mejoran múltiples parámetros clínicos y bioquímicos (revisado en [5]).

Los tratamientos médicos en los cuales se utilizan drogas, están abocados a tratar los síntomas del SOP y no deben ser una alternativa al cambio de estilo de vida, sino que ambos deben aplicarse conjuntamente.

La primera línea de tratamiento de mujeres con SOP resulta ser el citrato de clomifeno, sin embargo, existe un amplio número de mujeres que se denominan “citrato de clomifeno resistentes” para las cuales debe diagramarse un tratamiento alternativo. La Metformina resultó ser el primer tratamiento alternativo utilizado en este grupo de mujeres. La Metformina es una de las terapias médicas más difundidas en las últimas décadas. Es una droga antihiper glucemiante utilizada en el tratamiento de la diabetes tipo 2, y que en las mujeres con SOP es capaz de generar beneficios metabólicos, reproductivos y clínicos [180]. Entre los efectos observados sobre las anormalidades reproductivas en SOP, se puede mencionar que la terapia con Metformina demostró mejorar la tasa ovulatoria en numerosos estudios clínicos; aunque sólo unos pocos de ellos tuvieron en cuenta al número de embarazos logrados (revisado en [188]). El hecho de que una terapia incremente la tasa ovulatoria no se traducirá necesariamente en un aumento de la tasa de niños nacidos con vida. Existe controversia acerca de la efectividad de la Metformina para lograr mejores tasas de embarazo, y mientras algunos estudios la proponen como la droga de primera línea en estos tratamientos [227, 228], otros coinciden en que fármacos como el citrato de clomifeno (CC) deberían ser la primera opción terapéutica para lograr la concepción y el embarazo en las mujeres diagnosticadas con SOP [229]. Sin embargo, el riesgo de embarazos múltiples ya demostrado por el tratamiento con CC, es prácticamente nulo para el caso de la Metformina, lo cual representa un beneficio no menor. Por otro lado, y aún más importante, la Metformina ejerce acciones sobre parámetros no reproductivos que favorecen el estado general de las pacientes SOP.

Otra de las terapias ampliamente utilizadas en el tratamiento del SOP son las Glitazonas. Una de las Glitazonas más utilizadas es la Rosiglitazona que funciona como ligando sintético de los receptores nucleares PPAR γ [195, 230]. Dichos receptores son factores de transcripción, de esta forma, Rosiglitazona al unirse a ellos, modula la expresión de los genes blanco. Se ha visto que son capaces de inhibir la secreción de progesterona y estradiol [201, 202], normalizar la insulino resistencia y la hiperinsulinemia en pacientes SOP, así como también restaurar la ovulación y la

ciclicidad menstrual [203]. Respecto de la insulino resistencia y la restauración de la ovulación, se han observado mejores resultados, aún, al tratar a pacientes SOP no respondedoras al tratamiento con Metformina con la combinación de Metformina y Rosiglitazona [204, 205, 207, 208, 214, 231].

El conjunto de datos mencionados resalta la importancia de estudiar los alcances y efectos de dichos tratamientos sobre aquellos parámetros alterados en SOP que impiden alcanzar un embarazo exitoso a pesar de normalizar algunos de los parámetros ováricos y/o metabólicos alterados en SOP. Debemos considerar también que el fin último no solo es alcanzar la gestación, sino lo más importante será lograr el control metabólico de la paciente y de esta forma disminuir los riesgos de complicaciones asociadas al síndrome, como lo son los abortos, la diabetes gestacional, la diabetes mellitus, la hipertensión arterial, etc.

Se han descrito numerosas alteraciones en el tejido uterino de pacientes SOP. Tal como hemos mencionado previamente, se ha observado un incremento en la incidencia de hiperplasia y de carcinoma endometrial en mujeres SOP [147, 148]. Asimismo, se han reportado mayores porcentajes de abortos recurrentes y de fallas de implantación en estas pacientes respecto de la población general [147, 157]. En este sentido se ha observado un incremento en las fallas de implantación aún en pacientes SOP receptoras de embriones obtenidos por donación oocitaria e IVF, aún cuando la calidad oocitaria era normal [158-160]. Esto sugiere que el endometrio de pacientes SOP se ve alterado en su funcionalidad como consecuencia de la patología, pero se desconocen aún las posibles causas de dichas alteraciones. En base a los conocimientos actuales, se sugiere que el exceso de andrógenos y/o de estrógenos podrían ser los responsables, al menos parcialmente, de las alteraciones uterinas observadas en SOP. Por un lado, es sabido que el exceso de andrógenos tiene efectos perjudiciales sobre la función endometrial, contribuyendo a la infertilidad en mujeres con SOP [209-211]. Por otro lado, los elevados niveles de estrógenos (sin los efectos opuestos de la P en ausencia de ovulación), la hiperinsulinemia, los niveles elevados de IGF-1 y andrógenos libres así como la obesidad, son factores que contribuyen a la disfuncionalidad, la infertilidad, las altas tasas de aborto, la hiperplasia endometrial y el cáncer de endometrio; alteraciones comunes en mujeres SOP [147]. Pero sin embargo, los mecanismos por los cuales esto ocurre son complejos y desconocidos por el momento.

En conjunto, los datos mencionados con anterioridad, nos llevaron a formular la hipótesis de que: *“El hiperandrogenismo produce alteraciones en la funcionalidad uterina que afectan, entre otros, a la ruta de activación de los receptores PPAR γ . La Metformina es capaz de prevenir algunas de dichas alteraciones y el tratamiento combinado Rosiglitazona + Metformina mejora parámetros que la monoterapia con Metformina no normaliza”*. En función de esta hipótesis, el objetivo del presente trabajo de tesis fue: *“Estudiar los mecanismos por los cuales el hiperandrogenismo altera la funcionalidad uterina y el alcance del tratamiento con Rosiglitazona y/o Metformina.”*

Debido a la creciente incidencia de SOP y dado que las anomalías asociadas al síndrome no solo afectan la fisiología ovárica sino que constituyen en sí mismas afecciones de la salud a mediano y largo plazo que deterioran la esperanza y calidad de vida, se ha considerado necesario el desarrollo de un modelo experimental que refleje tanto la sintomatología ovárica y uterina, como la endocrina y metabólica del SOP.

Durante las últimas décadas se han desarrollado numerosos modelos animales que permiten el estudio de distintos aspectos de la patología [6, 232-234]. El modelo murino de hiperandrogenización utilizado en el presente trabajo fue desarrollado a partir de la observación de la alta producción de DHEA por ovarios poliquísticos y de que su administración en animales induce anovulación y formación de quistes ováricos [41, 43]. Desde entonces, la caracterización de las alteraciones endocrinas y de la morfología quística ha evidenciado que este modelo reproduce los síntomas diagnósticos y aspectos más salientes de la patología quística [37, 39, 44, 46-48, 235-238].

El modelo de SOP utilizado en el presente trabajo se aplicó a hembras en desarrollo (etapa prepuberal), por lo cual todos los animales aumentaron de peso durante el tratamiento, pero este incremento fue mayor en animales hiperandrogenizados que en controles. En trabajos previos de nuestro laboratorio [46] hemos descrito un aumento en el tejido graso en la cavidad peritoneal, definida como adiposidad abdominal o visceral [239]. En este sentido, las hormonas sexuales se encuentran implicadas en la distribución corporal del tejido graso: los estrógenos están asociados con la acumulación adiposa en las caderas, glúteos y piernas en las mujeres, y los andrógenos determinan que el hombre sea más propenso a una acumulación abdominal de la grasa [240]. Por estos motivos, ha sido propuesto que

los altos niveles de andrógenos circulantes serían responsables de la frecuente distribución abdominal de las grasas en SOP aún en mujeres delgadas [241, 242], así como de la acumulación de grasa visceral en el modelo de SOP por hiperandrogenización con DHEA [46]. Estos resultados fueron a su vez reproducidos en otros modelos animales de hiperandrogenización pre y post-natal [234, 243].

Por su parte, la administración de Metformina junto con la hiperandrogenización no modificó el incremento en el peso corporal producido por el exceso de andrógenos. Existe controversia respecto del efecto de Metformina sobre el peso corporal en mujeres con SOP. Algunos autores aseguran que dicho tratamiento produce la reducción del peso corporal en las pacientes [244] mientras que otros indican que la biguanida no produce efectos sobre el peso corporal [245, 246]. Nuestros resultados apoyan a aquellos que no encontraron modificaciones en el peso corporal luego del tratamiento con la biguanida [245, 246]. Existen cada vez más trabajos que aseguran que, si bien Metformina no tiene un efecto directo sobre la reducción del peso corporal, se obtienen mejores resultados si se administra dicha droga junto con el cambio en el estilo de vida. Sugieren que la Metformina presenta un efecto aditivo a la realización de dietas y ejercicio, mejorando parámetros de hiperandrogenismo e insulino resistencia [5, 247, 248].

Los efectos de los andrógenos con frecuencia son subestimados en el ciclo reproductor femenino; sin embargo existen receptores androgénicos tanto en las células estromales como en células epiteliales endometriales; y tanto la androstenediona como la testosterona inducen cambios en la función endometrial que podrían ser importantes al momento de producirse la implantación [249]. Todos estos datos sumados a la observación del incremento en el peso corporal post-hiperandrogenización y el aspecto higroscópico que presentaban los úteros de los animales que habían sido hiperandrogenizados, nos llevaron a proponernos como próximo objetivo evaluar si el exceso de andrógenos tendría efectos a nivel del peso uterino. Observamos que los pesos uterinos relativos, también, eran mayores en los animales hiperandrogenizados respecto de los controles, o sea que el exceso de andrógenos produce un incremento del peso corporal que se ve acompañado de un aumento en el peso uterino.

Luego, al evaluar la morfología uterina encontramos que el aumento en el peso uterino se debió, al menos en parte, al incremento del grosor endometrial.

El endometrio puede verse engrosado debido al aumento en el número de células que lo forman y/o al aumento del contenido de agua que se encuentra entre las células.

Cuando evaluamos la histología de los endometrios, encontramos que el exceso de andrógenos produjo tanto edema uterino como el incremento en la cantidad de células en proliferación. O sea, que el hiperandrogenismo está alterando, ya sea directa o indirectamente, la proliferación celular endometrial. Respecto de este punto, se ha descrito que dicho proceso se halla alterado en pacientes SOP, ya que existe un incremento en las incidencias de hiperplasia y de carcinoma endometrial en mujeres SOP [147, 148]. Este resultado nos lleva, entonces, a concluir que ésta es otra de las similitudes que presenta nuestro modelo de estudio con la patología humana

El incremento en la tasa de proliferación celular es atribuido principalmente a la persistente estimulación estrogénica sobre el endometrio sin la inhibición de la proliferación inducida por la P₄ [151], dado por P₄ y E que son los principales moduladores de la maduración endometrial [76].

Los estrógenos son el estímulo proliferativo primario para el epitelio endometrial y son inhibidos por la P₄. Los progestágenos contrarrestan los efectos proliferativos de los estrógenos por medio de la reducción de sus receptores, el aumento en la tasa de metabolismo del E₂ a compuestos inactivos (estrona y metabolitos sulfatados) y la interferencia con las acciones transcripcionales de los estrógenos [81].

Además, se ha descrito que el útero de los roedores presenta dos tipos de respuesta al E₂. Las respuestas tempranas, que incluyen tanto el aumento en la síntesis de ARN y de proteínas como del contenido de agua del tejido, mientras que las tardías incluyen ciclos de síntesis de ADN y mitosis de las células epiteliales [250].

La magnitud del crecimiento uterino depende de la duración del estímulo estrogénico y de la interacción con su receptor [251]. Se ha visto que la administración de una dosis baja de E₂ (0.25 o 2.5 µg/animal en ratas inmaduras) causó crecimiento uterino luego de las 24 horas de aplicado el tratamiento. Sin embargo, con una dosis mayor (10 µg/rata), los niveles circulantes del esteroide se mantuvieron altos por más tiempo y los úteros continuaron creciendo hasta las 72 horas, alcanzando cinco veces su peso húmedo original [252]. Ma y col [253]

demonstraron que la concentración de E₂ también controla la duración de la ventana de receptividad uterina. Finn y col [254] demostraron que la administración de dosis más altas de E₂ estimuló la división celular pero no ocurrió la deciduización. La dosis mínima de E₂ requerida para inducir la sensibilidad uterina necesaria para que se pueda producir la implantación debe ser entre 1.5-3 ng [253, 255]. Conjuntamente, estos hallazgos sugieren que los niveles uterinos de E₂ deben superar cierto umbral para iniciar los eventos tempranos asociados a la inducción del crecimiento uterino. Sin embargo, se requiere una biodisponibilidad sostenida de estrógenos, así como también de sus receptores, para inducir una respuesta uterina proliferativa completa que le permita a ese útero volverse receptivo y se pueda producirse la implantación embrionaria. Niveles excesivos de estrógenos generarían efectos adversos sobre la fisiología endometrial requerida para la implantación.

En el presente trabajo, encontramos que el exceso de andrógenos generó un incremento los niveles de E₂ y P₄, sugiriendo un aumento en la actividad esteroideogénica, como se ha descrito en SOP [6, 256].

En base a lo anteriormente descrito y con los resultados obtenidos en el presente trabajo, sugerimos que el incremento en el contenido de agua en el útero detectado al hiperandrogenizar podría ser consecuencia del aumento en los niveles de E₂.

Según lo expuesto, el análisis de nuestros resultados nos permite sugerir que el incremento en el contenido de líquido que observamos en el útero de ratones hiperandrogenizados sería, entonces, una de las respuestas tempranas a los elevados niveles de E₂ producto del exceso de andrógenos, mientras que el incremento en la proliferación celular, detectada aquí en el epitelio luminal, podría evidenciar la respuesta tardía a esta hormona. En síntesis, los elevados niveles de E₂ serían responsables del incremento en el peso uterino detectado como consecuencia del exceso de andrógenos. Cabe destacar que es probable entonces que el aumento de P₄ detectado post-hiperandrogenización no sería suficiente para inhibir los efectos proliferativos del E₂ en estos animales.

Respecto del efecto de Metformina sobre dichas alteraciones, el tratamiento de la biguanida normalizó los niveles de P₄ y E₂, coincidentemente con lo descrito previamente por otros grupos de trabajo [180, 257-259]. Además, también normalizó las tasas de proliferación celular endometrial.

Por todo lo expuesto anteriormente, sugerimos que la normalización del proceso proliferativo sería consecuencia del restablecimiento de los niveles de esteroides. Sin embargo, los pesos uterinos resultaron mayores a los de animales controles debido a que el contenido de líquido continuaba siendo alto. Esto nos lleva a inferir que la administración de Metformina conjuntamente con DHEA, podría estar evitando que se produjeran las respuestas tardías a E₂ (proliferación celular endometrial), mientras que no sería capaz de impedir las respuestas tempranas a esta hormona (imbibición de agua).

Además, la actividad hormonal no sólo depende de los niveles de P₄ y E₂ y de sus receptores sino también de los efectos de coactivadores y correpresores [76] y de las tasas de metabolismo de P₄ y E₂.

En los animales que fueron hiperandrogenizados y tratados simultáneamente con Metformina los niveles de E₂ son normales, por lo que el mayor contenido de agua podría deberse, entonces, a un incremento en la disponibilidad de receptores de E₂ uterinos, un aumento de los coactivadores y/o a una disminución en las tasas de metabolismo de dicho esteroide en el tejido uterino. Esto permitiría un incremento en la biodisponibilidad de la hormona en el útero, a pesar de que los niveles circulantes de la hormona sean normales.

Teniendo en cuenta el incremento en la proliferación celular endometrial detectado en condiciones hiperandrogenicas, decidimos evaluar en profundidad si la histología uterina se veía alterada como consecuencia del exceso de andrógenos. Encontramos que la hiperandrogenización con DHEA indujo la formación de glándulas anormales (con glándulas hijas y formando conglomerados), las que se hallaban delimitadas en su mayoría por un epitelio de tipo pseudo/estratificado; características que son utilizadas como síntomas de un posible desarrollo de malignidad en el endometrio [217]. Por otro lado, se sabe que los andrógenos regulan numerosos procesos en el epitelio endometrial y mamario que se ven alterados en condiciones de cáncer [260, 261]. Por todo lo expuesto hasta aquí, concluimos que en nuestro modelo de estudio, el exceso de andrógenos alteraría procesos de la fisiología endometrial que lo llevan a adquirir características de pre-malignidad. Esta sería otra característica asociada a SOP que se presenta en el modelo experimental propuesto aquí.

El tratamiento con Metformina normalizó la histología uterina, probablemente como consecuencia de la normalización la esteroidogénesis ovárica y

en consecuencia de las tasas de proliferación endometrial, llevandonos a concluir que Metformina no sólo mejora en nuestro modelo parámetros metabólicos y reproductivos sino que, además, prevendría el desarrollo de estructuras endometriales anormales que podrían conducir al desarrollo de cancer endometrial.

Con los resultados descriptos hasta aquí, podemos concluir que en nuestro modelo de estudio, el exceso de andrógenos alteró no solo los niveles de P_4 y E_2 séricos sino que también alteró diferentes parámetros uterinos que regulan su funcionalidad que podrían interferir con la receptividad endometrial.

Se sabe que P_4 y E_2 regulan numerosos factores uterinos, dado que, por ejemplo, en respuesta a la caída de las hormonas esteroideas se produce la rotura lisosómica. De este modo, los lisosomas vierten su contenido enzimático entre las que se encuentra la fosfolipasa A2 (PLA2), lo que genera un suministro constante de AA a las vías de las COXs y de las LOXs [163].

Teniendo en cuenta esta información y al haber observado un aumento en los niveles de dichas hormonas esteroideas como consecuencia de la hiperandrogenización, decidimos evaluar la expresión de las enzimas COXs y LOXs uterinas luego de los tratamientos.

Encontramos que la hiperandrogenización disminuyó los niveles uterinos de COX-2 y de 12-LOX, sin afectar los de COX-1 y 15-LOX. Estas observaciones nos llevan a sugerir que los elevados niveles de P_4 y E_2 circulantes, que se producen a causa de la hiperandrogenización, evitarían la liberación del contenido lisosomal en el útero. De este modo, la biodisponibilidad de AA uterina sería baja y, como consecuencia de ello, se produciría la disminución en la expresión de la COX-2 y de la 12-LOX. Si esta sugerencia fuera correcta, al normalizarse los niveles de P_4 y E_2 mediante el tratamiento con Metformina deberían normalizarse los niveles uterinos de COX-2 y de 12-LOX. Hechos que fueron confirmados en este trabajo.

Por todo lo expuesto, sugerimos que en nuestro modelo de estudio, el exceso de andrógenos altera los niveles de P_4 y E_2 y, como consecuencia de ello, los niveles de AA biodisponible en el útero. Metformina, al normalizar los niveles de dichos esteroides, normalizaría la biodisponibilidad uterina de AA.

La COX-2 es una de las isoformas de la enzima que cataliza los pasos limitantes en la síntesis de PGs. La isoforma COX-1 normalmente se expresa de manera constitutiva, mientras que la COX-2 es la isoforma que se induce en determinadas condiciones como ser en situaciones pro-inflamatorias; por lo tanto

COX-1 y COX-2 son reguladas independientemente [262]. Esto permitiría explicar por qué observamos alteraciones en la expresión de una de las isoformas pero no en la otra.

Al observar alteraciones en la expresión de la COX-2 como consecuencia del exceso de andrógenos y dado que, por un lado, se sabe que los eventos reproductivos asociados a las funciones endometriales tienen carácter inflamatorio y por ende están involucradas las PGs [263] y que, además, los esteroides sexuales y las PGs regulan la función uterina [264, 265]; decidimos evaluar si el exceso de andrógenos alteraba los niveles de PGs uterinos [56].

Encontramos que el hiperandrogenismo produjo el aumento en los niveles de la $\text{PGF}_{2\alpha}$, prostanoides con acciones pro-inflamatorias y vasoconstrictoras, mientras que disminuyó los de la PGE, anti-inflamatoria y luteotrófica. El hecho de que el tratamiento con DHEA haya disminuido la abundancia de COX-2 sin afectar a la de COX-1 sería consecuencia del proceso pro-inflamatorio. Esto es coherente con estudios previos de nuestro laboratorio, donde observamos que el hiperandrogenismo inhibió la abundancia de COX-2 por un mecanismo de retroalimentación negativa disparado por la acumulación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ [47]. Sin embargo, a pesar de la inhibición de la expresión de COX-2, los niveles de $\text{PGF}_{2\alpha}$ se mantuvieron altos en los animales hiperandrogenizados como consecuencia del incremento en la expresión de 9-cetorreductasa ó CBR-1, enzima que convierte la PGE en $\text{PGF}_{2\alpha}$. Esto permitiría explicar por qué los niveles de $\text{PGF}_{2\alpha}$ resultaron elevados a pesar de que los niveles de COX-2 se encontraban disminuidos en condiciones hiperandrogénicas. Asimismo explicaría, al menos parcialmente, por qué los niveles de PGE disminuyen frente al exceso de andrógenos. Así, la disminución de PGE post-hiperandrogenización sería consecuencia no sólo de la disminución de COX-2 sino también debido al incremento de CBR-1.

Por su parte, el tratamiento con Metformina normalizó la producción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y los niveles de COX-2; esto podría deberse a que Metformina al normalizar la producción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ favoreció la regularización del proceso inflamatorio y como consecuencia de ello se produjo la normalización en los niveles de COX-2.

En otros sistemas, se ha descrito que PGs, COX-2 y el proceso apoptótico se encuentran íntimamente ligados. Se ha demostrado, por ejemplo, que la PGE y la

COX-2 inhiben la apoptosis en carcinomas endometriales [266-269] mientras que la $\text{PGF}_{2\alpha}$ induce la apoptosis en el cuerpo lúteo [270].

Al respecto, en el presente trabajo, encontramos que el exceso de andrógenos indujo la apoptosis uterina concomitantemente con el incremento en los niveles de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y la disminución en los niveles de PGE y de COX-2, apoyando a las observaciones realizadas por los grupos de trabajo anteriormente citados. Por otro lado, encontramos que la administración de Metformina previno el incremento en la abundancia de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y la disminución en la de COX-2 generados al hiperandrogenizar mientras que normalizó el proceso apoptótico.

Existe controversia sobre el efecto de Metformina sobre el proceso apoptótico. Algunos autores describen que la Metformina puede inducir tanto como inhibir al proceso apoptótico [185, 271, 272]. Nuestros resultados coinciden con aquellos trabajos que describen un rol anti-apoptótico de la Metformina [272] y apoyan la hipótesis de la existencia de una asociación entre PGs y COX-2 controlando la apoptosis uterina tal como fue descrito previamente en carcinomas endometriales [266-269].

En trabajos previos de otros laboratorios se ha descrito que el estrés oxidativo estimula la producción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ tanto en células endometriales humanas como en murinas [273]. De hecho, la relación entre PGs y estrés oxidativo regulando la proliferación y la apoptosis de linfocitos T ha sido previamente descrita [185]. Es por esta razón que al observar que el exceso de andrógenos estimuló tanto la proliferación celular como la síntesis uterina de $\text{PGF}_{2\alpha}$, decidimos evaluar el estado oxidativo de este tejido en condiciones hiperandrogénicas.

Encontramos que la hiperandrogenización condujo al aumento de la actividad de la NOS uterina y disminuyó las defensas anti-oxidantes: SOD, Calatasa y GSH.

El incremento en la actividad de la NOS conduce al aumento de NO, mientras que la disminución en la actividad de la SOD lleva a la acumulación de radical superóxido (O_2^-). La reacción entre NO y O_2^- produce un agente más agresivo aún, el radical peroxinitrito (ONOO^-), que se ha visto relacionado con la producción de estructuras anormales [274-276]. Esto nos lleva a postular que el hiperandrogenismo podría conducir hacia la formación de estructuras anormales como consecuencia del exceso de radical peroxinitrito que produce. El estrés oxidativo/nitrosativo

incrementado conduciría, además, al aumento en la producción uterina de $\text{PGF}_{2\alpha}$ y al incremento en los índices de apoptosis, como se describió anteriormente.

Respecto de los resultados obtenidos al tratar con Metformina, Ota y col. [272] ha reportado que, en células Schawn, la Metformina inhibe al proceso apoptótico a través de la regulación de las ROS. Es importante señalar que la actividad del tipo aminoguanidina de la Metformina le permite a la droga interactuar con el grupo hemo de la NOS, regulando así el estrés nitrosativo [47, 277]. En consecuencia, el efecto de la Metformina observado en este trabajo podría deberse a una acción directa de la biguanida sobre la NOS. Así, al evitar la acumulación de NO y la consecuente formación de peroxinitrito, prevendría el daño a estructuras endometriales y normalizaría la producción de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Sorprendentemente, la administración de Metformina en el grupo control disminuyó la actividad de la SOD. Estos resultados concuerdan con los de Tosca y col. [278] quienes reportaron, en otro modelo, que la Metformina sin ningún otro tipo de estímulo es capaz de modular el estrés oxidativo.

Se ha descrito previamente que Metformina actúa sobre el útero de mujeres SOP mejorando numerosos parámetros relacionados a la receptividad endometrial [189]. Nuestros resultados demuestran, por primera vez, que Metformina también regula la producción de NO uterina en condiciones de hiperandrogenismo. Además, previene la formación de estructuras pre-cancerosas y el estado pro-apoptótico. Por todas esas razones, nuestros hallazgos representan nuevas evidencias acerca de las implicancias clínicas del tratamiento con Metformina normalizando no solo la función ovárica sino también previniendo la disfunción uterina que incluye la formación de estructuras anómalas. Respecto a este último punto se ha descrito previamente la capacidad de Metformina de inhibir el crecimiento de células tumorales [279] y nuestros resultados apoyan dichos hallazgos.

Existen trabajos que muestran la acción sinérgica de la Metformina con ligandos de los receptores nucleares PPAR en los tratamientos del SOP [208, 280-282]. Asimismo, se ha descrito que PPAR regula el camino de las PGs [283] y que la activación del sistema PPAR se relaciona con la función endometrial [122, 284]. Todas estas observaciones nos condujeron a evaluar la acción de la Metformina y el sistema PPAR γ en úteros hiperandrogenizados.

Se ha descrito, por un lado, que la activación de los receptores PPAR γ promueve la diferenciación celular [285], y por otro lado se ha visto que la administración de 15d-PGJ₂ (uno de los ligandos naturales de dichos receptores) estimula la proliferación celular [286, 287].

En nuestro modelo, encontramos que el PPAR, tanto su isoforma $\gamma 1$ como la $\gamma 2$, se expresa en el tejido uterino de ratones prepúberes y que ni la expresión proteica ni la génica de este receptor se ven afectadas en condiciones de hiperandrogenismo como tampoco al tratar simultáneamente con Metformina. El hecho de que la Metformina administrada sin exceso de andrógenos aumentó los niveles de ARNm que codifican para PPAR γ puede deberse al hecho de que dicha biguanida es capaz de actuar en condiciones basales aún en ausencia de estímulos [288]. Sin embargo, los resultados aquí presentados no resultan suficientes para asegurar dicha sugerencia y se requieren más experimentos para confirmar dicha especulación.

Dado que el exceso de andrógenos no afectó la expresión de PPAR γ , decidimos evaluar si se veían alterados sus ligandos y, consecuentemente, la activación de dichos receptores. Dicho camino de señalización desencadenado con la activación de PPAR γ ha sido descrito en varios sistemas, como monocitos [289], macrófagos [290], trofoblasto [291] y útero [122]. Consecuentemente, decidimos evaluar la expresión de las enzimas responsables de la síntesis de los ligandos más importantes de PPAR γ : la 12-LOX (que sintetiza 12-HPETE, que es convertido a 12-HETE, uno de los ligandos de PPAR γ), la 15-LOX (que cataliza la síntesis de 15-HPETE, que se convierte en el ligando 15-HETE) y la PGDS (que media la síntesis de PGD₂, que es transformada no enzimáticamente en 15d-PGJ₂, el ligando natural más importante de PPAR γ)

En este trabajo demostramos, por primera vez, que el ARNm que codifica para las enzimas responsables de la síntesis de los ligandos más importantes de PPAR γ :12-LOX, 15-LOX y PGDS [122, 290, 291] se expresa en el útero de ratones prepúberes, así como también se detectó la expresión proteica de la 12-LOX y de la 15-LOX en dicho tejido. Además, observamos que tanto la PGDS como la 12-LOX fueron susceptibles a la acción del hiperandrogenismo. El exceso de andrógenos produjo la disminución en la expresión los genes que codifican para la PGDS y para la 12-LOX. Esto se tradujo en la disminución en la expresión proteica de la 12-LOX.

La Metformina solo previno la disminución a nivel proteico de la 12-LOX, no así la expresión génica. Esto sugiere, aunque los resultados presentados en el presente trabajo no son suficientes para asegurarlo, que la Metformina regularía la expresión de la 12-LOX mediante un efecto a nivel post-transcripcional.

Aparentemente, existe una relación directa entre la actividad de la 12-LOX y la implantación embrionaria [122, 292] debido a que la 12-LOX regula la expresión génica del receptor de progesterona en el útero durante la ventana de implantación [292]. En base a todo lo descrito, sugerimos que en nuestro modelo de estudio el hiperandrogenismo altera la funcionalidad uterina (y probablemente reduce la receptividad uterina), al menos en parte, como consecuencia de la alteración en la cascada de señalización disparada por PPAR γ . Dichas alteraciones parecen focalizarse en alteraciones en las enzimas 12-LOX y PGDS.

La Metformina es capaz de normalizar la expresión proteica de la 12-LOX, pero no de normalizar la expresión de la PGDS. Es decir que los niveles de 15d-PGJ2 estarían disminuídos en condiciones hiperandrogénicas y el tratamiento con Metformina no sería capaz de evitarlo.

Al observar que el tratamiento con Metformina no era capaz de prevenir la disminución en los niveles de PGDS, junto con la evidencia de que al tratar pacientes SOP con la combinación de Metformina con un ligando sintético de PPAR γ se obtienen mejores resultados comparados con los obtenidos al administrar Metformina como monoterapia [207, 208, 281, 282] nos llevó a pensar que, en condiciones hiperandrogénicas la Rosiglitazona podría suplir el déficit de 15d-PGJ2, al unirse a los receptores PPAR γ , y normalizaría, así, los procesos desencadenados río abajo en la cadena de señalización disparada por dichos factores de transcripción. Esta sugerencia se ve apoyada, además, por el hecho de que se ha descrito que la Rosiglitazona activa el sistema PPAR γ al aumentar los niveles de ARNm que codifica para los propios receptores [293]. Uno de los procesos regulados por la activación de PPAR γ es el estrés oxidativo [284, 294-298].

Hasta aquí, en el presente trabajo hemos descrito una disminución en los ligandos de PPAR γ y en las defensas antioxidantes como consecuencia de la hiperadrogenización, que no fueron revertidos al tratar con Metformina a pesar de haberse normalizado los niveles de esteroides circulantes. Por un lado, estas observaciones nos llevan a sugerir que existiría un efecto de los andrógenos a nivel

uterino que sería independiente del ovario, dado que el tratamiento con Metformina normaliza los esteroides ováricos pero sin embargo, existen alteraciones a nivel uterino que continúan alterados. Nuestros resultados nos llevaron a pensar que si se administrara Rosiglitazona a animales hiperandrogenizados, ésta, al unirse a PPAR γ , compensaría el déficit de ligandos naturales del receptor, normalizando así los procesos alterados río abajo, como lo son las defensas antioxidantes. A fines de probar dicha hipótesis, evaluamos las defensas antioxidantes presentes en el tejido uterino luego de hiperandrogenizar y de tratar con Metformina y Rosiglitazona conjuntamente a los animales.

Encontramos que el tratamiento combinado normalizó los niveles de Catalasa y GSH, llevándonos a pensar que la activación de PPAR γ , en nuestro modelo, estaría regulando la expresión de Catalasa y GSH pero no así la de SOD. Estas acciones de Rosiglitazona al ser administrada de manera conjunta con Metformina podrían ser responsables, al menos parcialmente de los buenos resultados obtenidos cuando pacientes SOP reciben dicho tratamiento.

Conclusiones

Las conclusiones generales a las que llegamos utilizando nuestro modelo murino es que el exceso de andrógenos produjo:

- 1- Aumento del peso corporal.
- 2- Incremento del peso relativo uterino provocado, al menos en parte, por engrosamiento del endometrio y aumento en el número de células proliferativas en el epitelio luminal endometrial.
- 3- Aumento en la producción de P_4 y E_2 por parte del ovario.
- 4- Alteraciones en la histología uterina.
- 5- Aumento en la actividad de la NOS.
- 6- Disminución de las defensas antioxidantes (SOD, Catalasa y GSH) uterinas.
- 7- Disminución en la producción uterina de PG E y aumento en la producción uterina de PG $F_{2\alpha}$ que se deben a la disminución en la expresión uterina de COX-2 junto con el incremento en la expresión de CBR1.
- 8- Disminución en la expresión uterina de 12-LOX y de PGDS y, como consecuencia de ellos se disminuirían los niveles de ligandos naturales de PPAR γ .
- 9- Incremento en los niveles de apoptosis endometrial (tanto epitelial como estromal).

Por su parte, la administración simultánea de Metformina evitó todas las alteraciones anteriormente descritas excepto:

- 1- El aumento del peso corporal.
- 2- El incremento del peso relativo uterino, dado que si bien normalizó la proliferación endometrial, no fue capaz de prevenir el engrosamiento endometrial producido por el exceso de andrógenos.

- 3- La disminución de las defensas antioxidantes (SOD, Catalasa y GSH) uterinas.
- 4- Disminución en la producción uterina de PG E.
- 5- Disminución en la expresión uterina de PGDS.

Cuando se administró conjuntamente Metformina + Rosiglitazona se normalizaron los niveles de Catalasa y Glutation, a pesar de que no se vieron efectos sobre el peso corporal, ni uterino, ni sobre el grosor endometrial.

Con este trabajo, concluimos que el exceso de andrógenos circulantes actúa sobre el útero murino, afectando sus funciones esenciales. Algunos de los efectos del hiperandrogenismo podrían ser directos sobre el tejido uterino, mientras otros podrían deberse a efectos de los andrógenos sobre otros tejidos, como por ejemplo, su efecto sobre el ovario, que se traduce en alteraciones en la síntesis de esteroides en nuestro modelo de estudio. En éste sentido podemos afirmar que el exceso de andrógenos produce sobre el tejido uterino murino alteraciones que conducen a alteraciones en su fisiología que conllevarían a la disminución en la receptividad uterina. Ésto permitiría explicar, al menos en parte, la disminución en la receptividad uterina observada en pacientes SOP.

La administración de Metformina evita muchas de las alteraciones producidas por el exceso de andrógenos pero no aquellas que se relacionan con la activación de los factores de transcripción PPAR γ .

A raíz de ello, y dado el éxito observado al tratar a pacientes SOP con la combinación Metformina+ Rosiglitazona, en el presente trabajo, admistramos dicho tratamiento a animales hiperandrogenizados, encontrando mejoras en gran parte de aquellos parámetros que la monoterapia con Metformina no evitó.

El efecto de cada droga por separado no resulta suficiente para normalizar el estado oxidativo uterino, sin embargo la administración conjunta muestra un efecto de “potenciación” que permite la normalización de las defensas antioxidantes.

Posiblemente esto se deba a que las drogas actuan por diferentes mecanismos, Metformina funcionaría como un antioxidante mientras que Rosiglitazona, a través de la activación de PPAR γ , estimularía la expresión génica delas enzimas antioxidantes.

Esta podría ser una de las causas por las que se obtienen mejores resultados al tratar pacientes SOP con dicha combinación de drogas aún cuando las pacientes no responden a la monoterapia con Metformina.

Además, sugerimos que la terapia combinada daría mejores resultados en el tratamiento de las mujeres SOP, especialmente en aquellas pacientes que no responden óptimamente a Metformina.

Para concluir, podemos decir que el modelo de estudio utilizado en el presente trabajo nos permitió probar de manera empírica los buenos resultados que se obtienen en la clínica al tratar pacientes SOP con el tratamiento combinado Metformina + Rosiglitazona, permitiéndonos, además, comprender algunos de los mecanismos por los cuales esto ocurre.

Bibliografia

- 1 Zegers-Hochschild F., Adamson G.D., De Mouzon J., Ishihara O., Mansour R., Nygren K., Sullivan E., Vanderpoel S. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertility and sterility*, 2009. 92(5): p. 1520-1524.
- 2 Boivin J., Bunting L., Collins J.A., Nygren K.G. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human Reproduction*, 2007. 22(6): p. 1506-1512.
- 3 Cahill D., Wardle P. Management of infertility. *BMJ*, 2002. 325(7354): p. 28-32.
- 4 Sastre M., Prat M.O., Heca C.A., Carreras R.C. Current trends in the treatment of polycystic ovary syndrome with desire for children. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2009 5 (1): p. 353-360
- 5 Teede H., Deeks A., Moran L. Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan. *BMC Medicine*, 2010. 8(1): p. 41.
- 6 Abbott D., Dumesic D., Franks S. Developmental origin of polycystic ovary syndrome - a hypothesis. *J Endocrinol*, 2002. 174(1): p. 1-5.
- 7 Franks S. Polycystic Ovary Syndrome. *N Engl J Med*, 1995. 333(13): p. 853-861.
- 8 Asuncion M., Calvo R.M., San Millan J.L., Sancho J., Avila S., Escobar-Morreale H.F. A Prospective Study of the Prevalence of the Polycystic Ovary Syndrome in Unselected Caucasian Women from Spain. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. 85(7): p. 2434-2438.
- 9 Stein I., Leventhal M. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol* 1935. 29: p. 181-191.
- 10 Stein I. Duration of fertility following ovarian wedge resection-stein-leventhal syndrome. *West J Surg Obstet Gynecol* 1964. 72: p. 237-242.
- 11 Zawadzki J., Dunaif A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. *Polycystic Ovary Syndrome Current Issues in Endocrinology and Metabolism*, 1992: p. 377 - 384.
- 12 Azziz R., Carmina E., Dewailly D., Diamanti-Kandarakis E., Escobar-Morreale H.F., Futterweit W., Janssen O.E., Legro R.S., Norman R.J., Taylor A.E., Witchel S.F., Androgen Excess S. Position statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. 91: p. 4237 - 4245.
- 13 Franks S. Diagnosis of Polycystic Ovarian Syndrome: In Defense of the Rotterdam Criteria. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. 91(3): p. 786-789.
- 14 Azziz R. Diagnosis of Polycystic Ovarian Syndrome: The Rotterdam Criteria Are Premature. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. 91(3): p. 781-785.
- 15 Dasgupta S., Reddy B. Present status of understanding on the genetic etiology of polycystic ovary syndrome. *J Postgrad Med*, 2008. 54(2): p. 115-25.
- 16 Codner E., Iniguez G., Villaroel C., Lopez P., Soto N., Sir-Petermann T., Cassorla F., Rey R.A. Hormonal Profile in Women with Polycystic Ovarian

- Syndrome with or without Type 1 Diabetes Mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007: p. jc.2007-1252.
- 17 Franks S., Stark J., Hardy K. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction Update*, 2008. 14(4): p. 367-378.
- 18 Joseph-Horne R., Mason H., Batty S., White D., Hillier S., Urquhart M., Franks S. Luteal phase progesterone excretion in ovulatory women with polycystic ovaries. *Hum. Reprod.*, 2002. 17(6): p. 1459-1463.
- 19 Lunn S.F., Fraser H.M., Mason H.D. Structure of the corpus luteum in the ovulatory polycystic ovary. *Hum. Reprod.*, 2002. 17(1): p. 111-117.
- 20 Rai R., Backos M., Rushworth F., Regan L. Polycystic ovaries and recurrent miscarriage: a reappraisal. *Human Reproduction*, 2000. 15(3): p. 612-615.
- 21 Glueck C.J., Wang P., Goldenberg N., Sieve-Smith L. Pregnancy outcomes among women with polycystic ovary syndrome treated with metformin. *Hum. Reprod.*, 2002. 17(11): p. 2858-2864.
- 22 Dhindsa G B.R., Dhindsa M, Bhatia V Insulin resistance, insulin sensitization and inflammation in polycystic ovarian syndrome. *J Postgrad Med* 2004. 50: p. 140-144.
- 23 Rice S., Christoforidis N., Gadd C., Nikolaou D., Seyani L., Donaldson A., Margara R., Hardy K., Franks S. Impaired insulin-dependent glucose metabolism in granulosa-lutein cells from anovulatory women with polycystic ovaries. *Hum. Reprod.*, 2005. 20(2): p. 373-381.
- 24 Norman R.J., Masters L., Milner C.R., Wang J.X., Davies M.J. Relative risk of conversion from normoglycaemia to impaired glucose tolerance or non-insulin dependent diabetes mellitus in polycystic ovarian syndrome. *Hum. Reprod.*, 2001. 16(9): p. 1995-1998.
- 25 Glintborg D., Andersen M. An update on the pathogenesis, inflammation, and metabolism in hirsutism and polycystic ovary syndrome. *Gynecological Endocrinology*, 2011. 26(4): p. 281-296.
- 26 Moran L.J., Pasquali R., Teede H.J., Hoeger K.M., Norman R.J. Treatment of obesity in polycystic ovary syndrome: a position statement of the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. *Fertil Steril*, 2009. 92: p. 1966 - 1982.
- 27 Himelein M.J., Thatcher S.S. Polycystic ovary syndrome and mental health: A review. *Obst Gynecol Surv*, 2006. 61: p. 723 - 732.
- 28 Deeks A., Gibson-Helm M., Teede H. Anxiety and depression in polycystic ovary syndrome (PCOS): a comprehensive investigation. *Fertil Steril*, 2010. 93: p. 2421 - 2423.
- 29 Huang A., Brennan K., Azziz R. Prevalence of hyperandrogenemia in the polycystic ovary syndrome diagnosed by the National Institutes of Health 1990 criteria. *Fertility and sterility*, 2010. 93(6): p. 1938-1941.
- 30 Azziz R., Woods K.S., Reyna R., Key T.J., Knochenhauer E.S., Yildiz B.O. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. 89: p. 2745 - 2749.

- 31 Azziz R., Sanchez L.A., Knochenhauer E.S., Moran C., Lazenby J., Stephens K.C., Taylor K.,Boots L.R.Androgen excess in women: experience with over 1000 consecutive patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. 89: p. 453 - 462.
- 32 Hagymási K., Reismann P.T., Rácz K.R.,Tulassay Z.Role of the endocrine system in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Orvosi Hetilap*, 2009. 150(48): p. 2173-2181.
- 33 Rieder J., Santoro N., Cohen H.W., Marantz P.,Coupey S.M.Body Shape and Size and Insulin Resistance as Early Clinical Predictors of Hyperandrogenic Anovulation in Ethnic Minority Adolescent Girls. *The Journal of adolescent health : official publication of the Society for Adolescent Medicine*, 2008. 43(2): p. 115-124.
- 34 Escobar-Morreale H.F., Calvo R.M., Sancho J.,San Millan J.L.TNF- α and Hyperandrogenism: A Clinical, Biochemical, and Molecular Genetic Study. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. 86(8): p. 3761-3767.
- 35 Alemzadeh R., Kichler J.,Calhoun M.Spectrum of metabolic dysfunction in relationship with hyperandrogenemia in obese adolescent girls with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol*, 2010. 162(6): p. 1093-1099.
- 36 Ginsburg K. Luteal phase defect. Etiology, diagnosis, and management. *Endocrinol Metab Clin North Am.* , 1992. 21(1): p. 85-104.
- 37 Lee M., Anderson E.,Lee G.Changes in ovarian morphology and serum hormones in the rat after treatment with dehydroepiandrosterone. *Anat Rec.*, 1991. 231(2): p. 185-92.
- 38 Lee G., Croop J.,Anderson E.Multidrug resistance gene expression correlates with progesterone production in dehydroepiandrosterone-induced polycystic and equine chorionic gonadotropin-stimulated ovaries of prepubertal rats. *Biol Reprod*, 1998. 58(2): p. 330-337.
- 39 Henmi H., Endo T., Nagasawa K., Hayashi T., Chida M., Akutagawa N., Iwasaki M., Kitajima Y., Kiya T., Nishikawa A., Manase K.,Kudo R.Lysyl Oxidase and MMP-2 Expression in Dehydroepiandrosterone-Induced Polycystic Ovary in Rats. *Biology of Reproduction*, 2001. 64(1): p. 157-162.
- 40 Cocksedge K.A., Saravelos S.H., Wang Q., Tuckerman E., Laird S.M.,Li T.C.Does free androgen index predict subsequent pregnancy outcome in women with recurrent miscarriage? *Human Reproduction*, 2008. 23(4): p. 797-802.
- 41 Mahesh V.B.,Greenblatt R.B.Isolation of Dehydroepiandrosterone and 17 α -Hydroxy- Δ^5 -Pregnenolone from the Polycystic Ovaries of the Stein-Leventhal Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 1962. 22(4): p. 441-448.
- 42 Coney P.Polycystic ovarian disease: current concepts of pathophysiology and therapy. *Fertil Steril*, 1984. 42(5): p. 667-82.
- 43 Roy S., Mahesh V.,Greenblatt R.Effect of dehydroepiandrosterone and delta4-androstenedione on the reproductive organs of female rats: production of cystic changes in the ovary. *Nature*, 1962. 196: p. 42-3.
- 44 Anderson E., Lee M.,Lee G.Cystogenesis of the ovarian antral follicle of the rat: ultrastructural changes and hormonal profile following the administration of dehydroepiandrosterone. *Anat Rec*, 1992. 234(3): p. 359-82.

- 45 Kronenberg H., Melmed S., Polonsky K., Larsen P. Tratado de Endocrinología. 02/2009 ed, ed. Elsevier. 2009.
- 46 Luchetti C.G., Solano M.E., Sander V., Arcos M.L.B., Gonzalez C., Di Girolamo G., Chiocchio S., Cremaschi G., Motta A.B. Effects of dehydroepiandrosterone on ovarian cystogenesis and immune function. *Journal of reproductive immunology*, 2004. 64(1): p. 59-74.
- 47 Elia E., Sander V., Luchetti C.G., Solano M.E., Di Girolamo G., Gonzalez C., Motta A.B. The mechanisms involved in the action of metformin in regulating ovarian function in hyperandrogenized mice. *Mol. Hum. Reprod.*, 2006. 12(8): p. 475-481.
- 48 Sander V., Luchetti C.G., Solano M.E., Elia E., Di Girolamo G., Gonzalez C., Motta A.B. Role of the N, N'-dimethylbiguanide metformin in the treatment of female prepuberal BALB/c mice hyperandrogenized with dehydroepiandrosterone. *Reproduction*, 2006. 131(3): p. 591-602.
- 49 Sander V., Solano M., Elia E., Luchetti C., Di Girolamo G., Gonzalez C., Motta A. The influence of dehydroepiandrosterone on early pregnancy in mice. *Neuroimmunomodulation*, 2005. 12(5): p. 285-92.
- 50 Solano M.E., Elia E., Luchetti C.G., Sander V., Di Girolamo G., Gonzalez C., Motta A.B. Metformin prevents embryonic resorption induced by hyperandrogenisation with dehydroepiandrosterone in mice. *Reproduction, Fertility and Development*, 2006. 18(5): p. 533-544.
- 51 Luchetti C.G., Mikó E., Szekeres-Bartho J., Paz D.A., Motta A.B. 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. 111(3-5): p. 200-207.
- 52 Cook M. *The Anatomy of the Laboratory Mouse*, ed. Elsevier. 1965. 143 p.
- 53 Edson M.A., Nagaraja A.K., Matzuk M.M. The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation. *Endocr Rev*, 2009. 30(6): p. 624-712.
- 54 Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev*, 1996. 17(2): p. 121-155.
- 55 Niswender G.D., Juengel J.L., Silva P.J., Rollyson M.K., McIntush E.W. Mechanisms Controlling the Function and Life Span of the Corpus Luteum. *Physiol. Rev.*, 2000. 80(1): p. 1-29.
- 56 Nussey S., Whitehead S. *Endocrinology: An Integrated Approach*, ed. O. BIOS. 2001: Scientific Publishers.
- 57 Homburg R. Androgen circle of polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*, 2009. 24(7): p. 1548-1555.
- 58 Jonard S., Dewailly D. The follicular excess in polycystic ovaries, due to intra-ovarian hyperandrogenism, may be the main culprit for the follicular arrest. *Hum Reprod Update*, 2004. 10(2): p. 107-117.
- 59 Hillier S., Tetsuka M., Fraser H. Location and developmental regulation of androgen receptor in primate ovary. *Hum Reprod*, 1997. 12(1): p. 107-11.

- 60 Vendola K.A., Zhou J., Adesanya O.O., Weil S.J., Bondy C.A. Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. *The Journal of Clinical Investigation*, 1998. 101(12): p. 2622-2629.
- 61 Weil S., Vendola K., Zhou J., Bondy C.A. Androgen and Follicle-Stimulating Hormone Interactions in Primate Ovarian Follicle Development. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999. 84(8): p. 2951-2956.
- 62 The Female Reproductive System. [cited 2011 26 Agosto]; <http://nongae.gsnu.ac.kr/~cspark/teaching/chap2.html>.
- 63 Geneser, Finn. *Histología*. 3ª ed, ed. M. Panamericana. 2005.
- 64 Aplin J. The cell biological basis of human implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2000. 14(5): p. 757-64.
- 65 Denker H. Implantation: a cell biological paradox. *J Exp Zool*, 1993. 266(6): p. 541-58.
- 66 Simón C., Martín J., Pellicer A. Paracrine regulators of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2000. 14(5): p. 815-26.
- 67 Boomsma C.M., Kavelaars A., Eijkemans M.J.C., Lentjes E.G., Fauser B.C.J.M., Heijnen C.J., Macklon N.S. Endometrial secretion analysis identifies a cytokine profile predictive of pregnancy in IVF. *Human Reproduction*, 2009. 24(6): p. 1427-1435.
- 68 Simón C., Moreno C., Remohí J., Pellicer A. Cytokines and embryo implantation. *J Reprod Immunol*, 1998. 39(1-2): p. 117-31.
- 69 Lédée-Bataille N., Laprée-Delage G., Taupin J.L., Dubanchet S., Frydman R., Chaouat G. Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation. *Human Reproduction*, 2002. 17(1): p. 213-218.
- 70 Yaron Y., Botchan A., Amit A., Peyser M., David M., Lessing J. Endometrial receptivity in the light of modern assisted reproductive technologies. *Fertil Steril*, 1994. 62(2): p. 225-32.
- 71 Lessey B. The role of the endometrium during embryo implantation. *Hum Reprod*, 2000. 15(6): p. 39-50.
- 72 Jauniaux E., Farquharson R.G., Christiansen O.B., Exalto N. Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Human Reproduction*, 2006. 21(9): p. 2216-2222.
- 73 Rai R., Regan L. Recurrent miscarriage. *The Lancet*, 2006. 368(9535): p. 601-611.
- 74 Horcajadas J.A., Pellicer A., Simón C. Wide genomic analysis of human endometrial receptivity: new times, new opportunities. *Human Reproduction Update*, 2007. 13(1): p. 77-86.
- 75 Brenner R.M., West N.B., McClellan M.C. Estrogen and progesterin receptors in the reproductive tract of male and female primates. *Biology of Reproduction*, 1990. 42(1): p. 11-19.

- 76 Punyadeera C., Dassen H., Klomp J., Dunselman G., Kamps R., Dijcks F., Ederveen A., De Goeij A., Groothuis P. Oestrogen-modulated gene expression in the human endometrium. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005. 62(2): p. 239-250.
- 77 Gorski J., Welshons W., Sakai D., Hansen J., Walent J., Kassis J., Shull J., Stack G., Campen C. Evolution of a model of estrogen action. *Recent Prog Horm Res*, 1986. 42: p. 297-329.
- 78 Lessey B.A., Killam A.P., Metzger D.A., Haney A.F., Greene G.L., McCarty K.S.J. Immunohistochemical Analysis of Human Uterine Estrogen and Progesterone Receptors Throughout the Menstrual Cycle. *J Clin Endocrinol Metab*, 1988. 67(2): p. 334-340.
- 79 Press M., Udove J., Greene G. Progesterone receptor distribution in the human endometrium. Analysis using monoclonal antibodies to the human progesterone receptor. *Am J Pathol*, 1988. 131(1): p. 112-24.
- 80 Critchley H.O.D., Brenner R.M., Henderson T.A., Williams K., Nayak N.R., Slayden O.D., Millar M.R., Saunders P.T.K. Estrogen Receptor {beta}, But Not Estrogen Receptor {alpha}, Is Present in the Vascular Endothelium of the Human and Nonhuman Primate Endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. 86(3): p. 1370-1378.
- 81 Strauss J., Gurdip E. The endometrium: regulation and dysfunction. In: Yen S S C, Jaffe R B, editors. *Reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology, and clinical management*, 1991. W. B. Philadelphia, Pa: Saunders Co: p. 309-357.
- 82 Botellallusia J. *El útero: fisiología y patología*, ed. D.d.S. S.A. 1997, Madrid.
- 83 Vane J., Bakhle Y., Botting R. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1998. 38: p. 97-120.
- 84 Smith W., Dewitt W., Garavito R. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*, 2000. 69: p. 145-82.
- 85 Chandrasekharan N.V., Dai H., Roos K.L.T., Evanson N.K., Tomsik J., Elton T.S., Simmons D.L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002. 99(21): p. 13926-13931.
- 86 Smith W., Dewitt D. Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Adv Immunol*, 1996. 62: p. 167-215.
- 87 Kanaoka Y., Boyce J.A. Cysteinyl Leukotrienes and Their Receptors: Cellular Distribution and Function in Immune and Inflammatory Responses. *The Journal of Immunology*, 2004. 173(3): p. 1503-1510.
- 88 Forsberg L., Leeb L., Thorén S., Morgenstern R., Jakobsson P.-J. Human glutathione dependent prostaglandin E synthase: gene structure and regulation. *FEBS Letters*, 2000. 471(1): p. 78-82.
- 89 Suzuki-Yamamoto T., Nishizawa M., Fukui M., Okuda-Ashitaka E., Nakajima T., Ito S., Watanabe K. cDNA cloning, expression and characterization of human prostaglandin F synthase. *FEBS Letters*, 1999. 462(3): p. 335-340.

- 90 Miyata A., Hara S., Yokoyama C., Inoue H., Ullrich V., Tanabe T. Molecular Cloning and Expression of Human Prostacyclin Synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1994. 200(3): p. 1728-1734.
- 91 Narumiya S., Fitzgerald G.A. Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *The Journal of Clinical Investigation*, 2001. 108(1): p. 25-30.
- 92 Zingarelli B., Cook J.A. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a new therapeutic target in sepsis and inflammation. *Shock*, 2005. 23(5): p. 393-399.
- 93 Broughton K.S., Rule D.C., Ye Y., Zhang X., Driscoll M., Culver B. Dietary omega-3 fatty acids differentially influence ova release and ovarian cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 expression in rats. *Nutrition research (New York, N.Y.)*, 2009. 29(3): p. 197-205.
- 94 Schuler G., Teichmann U., Kowalewski M.P., Hoffmann B., Madore E., Fortier M.A., Klisch K. Expression of Cyclooxygenase-II (COX-II) and 20 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase (20 α -HSD)/Prostaglandin F-synthase (PGFS) in Bovine Placentomes: Implications for the Initiation of Parturition in Cattle. *Placenta*, 2006. 27(9): p. 1022-1029.
- 95 Duffy D.M., Seachord C.L., Dozier B.L. An Ovulatory Gonadotropin Stimulus Increases Cytosolic Phospholipase A2 Expression and Activity in Granulosa Cells of Primate Periovarian Follicles. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. 90(10): p. 5858-5865.
- 96 Hoozemans D., Schats R., Lambalk C., Homburg R., Hompes P. Human embryo implantation: current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology. *Reprod Biomed Online*, 2004. 9(6): p. 692-715.
- 97 Acosta T., Miyamoto A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Anim Reprod Sci*, 2004. 82-83(127-40).
- 98 Sirois J., Sayasith K., Brown K.A., Stock A.E., Bouchard N., Dorã© M. Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation: a 2004 account. *Human Reproduction Update*, 2004. 10(5): p. 373-385.
- 99 Roy A., Ratnam S. Biosynthesis of prostaglandins by human spermatozoa in vitro and their role in acrosome reaction and fertilization. *Mol Reprod Dev*, 1992. 33(3): p. 303-6.
- 100 Goldberg V.J., Ramwell P.W. Role of prostaglandins in reproduction. *Physiological Reviews*, 1975. 55(3): p. 325-351.
- 101 Charbonnel B. Prostaglandins and reproduction. *Sem Hop*, 1975. 51(46): p. 2793-2804.
- 102 Sales K.J., Jabbour H.N. Cyclooxygenase enzymes and prostaglandins in pathology of the endometrium. *Reproduction*, 2003. 126(5): p. 559-567.
- 103 McMaster M.T., Dey S.K., Andrews G.K. Association of monocytes and neutrophils with early events of blastocyst implantation in mice. *J Reprod Fertil*, 1993. 99(2): p. 561-569.

- 104 Espey L.L. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biology of Reproduction*, 1994. 50(2): p. 233-238.
- 105 Song H., Lim H., Paria B.C., Matsumoto H., Swift L.L., Morrow J., Bonventre J.V., Dey S.K. Cytosolic phospholipase A2alpha is crucial for 'on-time' embryo implantation that directs subsequent development. *Development*, 2002. 129(12): p. 2879-2889.
- 106 Ye X., Hama K., Contos J.J.A., Anliker B., Inoue A., Skinner M.K., Suzuki H., Amano T., Kennedy G., Arai H., Aoki J., Chun J. LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing. *Nature*, 2005. 435(7038): p. 104-108.
- 107 Mccracken J.A., Custer E.E., Lamsa J.C. Luteolysis: A Neuroendocrine-Mediated Event. *Physiol. Rev.*, 1999. 79(2): p. 263-323.
- 108 Gleeson A., Thorburn G., Cox R. Prostaglandin F concentrations in the utero-ovarian venous plasma of the sow during the late luteal phase of the oestrous cycle. *Prostaglandins*, 1974. 5(6): p. 521-9.
- 109 Akinlosotu B., Diehl J., Gimenez T. Prostaglandin E2 counteracts the effects of PGF2 alpha in indomethacin treated cycling gilts. *Prostaglandins*, 1988. 35(1): p. 81-93.
- 110 Ford S.P., Christenson L.K. Direct effects of oestradiol-17{beta} and prostaglandin E-2 in protecting pig corpora lutea from a luteolytic dose of prostaglandin F-2{alpha}. *J Reprod Fertil*, 1991. 93(1): p. 203-209.
- 111 Smith S. The role of prostaglandins in implantation. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*, 1991. 5(1): p. 73-93.
- 112 Lim H., Paria B.C., Das S.K., Dinchuk J.E., Langenbach R., Trzaskos J.M., Dey S.K. Multiple Female Reproductive Failures in Cyclooxygenase 2 Deficient Mice. *Cell*, 1997. 91(2): p. 197-208.
- 113 Dinchuk J.E., Car B.D., Focht R.J., Johnston J.J., Jaffee B.D., Covington M.B., Contel N.R., Eng V.M., Collins R.J., Czerniak P.M., Gorry S.A., Trzaskos J.M. Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature*, 1995. 378(6555): p. 406-409.
- 114 Weitlauf H. Embryonic signaling at implantation in the mouse. *Prog Clin Biol Res*, 1989. 294: p. 359-76.
- 115 Wilcox A.J., Baird D.D., Weinberg C.R. Time of Implantation of the Conceptus and Loss of Pregnancy. *New England Journal of Medicine*, 1999. 340(23): p. 1796-1799.
- 116 Brash A.R. Lipoxygenases: Occurrence, Functions, Catalysis, and Acquisition of Substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. 274(34): p. 23679-23682.
- 117 Murphy R. Biosynthesis and Metabolism. . In: Watkins WD, Peterson MB, and Fletcher JR, eds. *Prostaglandins in Clinical Practice*, 1989: p. 1-20.
- 118 Kühn H., Borngräber S. Mammalian 15-lipoxygenases. Enzymatic properties and biological implications. *Adv Exp Med Biol*, 1999. 447: p. 5-28.

- 119 Funk C. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, 2001. 294(5548): p. 1871-5.
- 120 Bennett P., Elder M., Myatt L. The effects of lipoxygenase metabolites of arachidonic acid on human myometrial contractility. *Prostaglandins*, 1987. 33(6): p. 837-44.
- 121 Faber B., Metz S., Chegini N. Immunolocalization of eicosanoid enzymes and growth factors in human myometrium and fetoplacental tissues in failed labor inductions. *Obstet Gynecol*, 1996. 88(2): p. 174-9.
- 122 Li Q., Cheon Y.-P., Kannan A., Shanker S., Bagchi I.C., Bagchi M.K. A Novel Pathway Involving Progesterone Receptor, 12/15-Lipoxygenase-derived Eicosanoids, and Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Regulates Implantation in Mice. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. 279(12): p. 11570-11581.
- 123 Yoshimoto T., Takahashi Y. Arachidonate 12-lipoxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2002. 68-69: p. 245-62.
- 124 Nosjean O., Boutin J.A. Natural ligands of PPAR[γ]: Are prostaglandin J2 derivatives really playing the part? *Cellular Signalling*, 2002. 14(7): p. 573-583.
- 125 Schafer A.I. Deficiency of Platelet Lipoxygenase Activity in Myeloproliferative Disorders. *New England Journal of Medicine*, 1982. 306(7): p. 381-386.
- 126 George J., Afek A., Shaish A., Levkovitz H., Bloom N., Cyrus T., Zhao L., Funk C.D., Sigal E., Harats D. 12/15-Lipoxygenase Gene Disruption Attenuates Atherogenesis in LDL Receptor-Deficient Mice. *Circulation*, 2001. 104(14): p. 1646-1650.
- 127 Sakashita T., Takahashi Y., Kinoshita T., Yoshimoto T. Essential involvement of 12-lipoxygenase in regiospecific and stereospecific oxidation of low density lipoprotein by macrophages. *European Journal of Biochemistry*, 1999. 265(2): p. 825-831.
- 128 Gao X., Porter A., Honn K. Involvement of the multiple tumor suppressor genes and 12-lipoxygenase in human prostate cancer. Therapeutic implications. *Adv Exp Med Biol*, 1997. 407: p. 41-53.
- 129 Nigam S., Kumar G.S., Sutherland M., Schewe T., Ikawa H., Yamasaki Y., Ueda N., Yamamoto S. Metabolic suppression of platelet-type 12-lipoxygenase in human uterine cervix with invasive carcinoma. *International Journal of Cancer*, 1999. 82(6): p. 827-831.
- 130 Gonzalez-Nunez D., Claria J., Rivera F., Poch E. Increased Levels of 12(S)-HETE in Patients With Essential Hypertension. *Hypertension*, 2001. 37(2): p. 334-338.
- 131 Nadel J.A., Conrad D.J., Ueki I.F., Schuster A., Sigal E. Immunocytochemical localization of arachidonate 15-lipoxygenase in erythrocytes, leukocytes, and airway cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 1991. 87(4): p. 1139-1145.
- 132 Sigal E., Grunberger D., Highland E., Gross C., Dixon R.A., Craik C.S. Expression of cloned human reticulocyte 15-lipoxygenase and immunological evidence that 15-lipoxygenases of different cell types are related. *Journal of Biological Chemistry*, 1990. 265(9): p. 5113-5120.

- 133 Ford-Hutchinson A. Arachidonate 15-lipoxygenase; characteristics and potential biological significance. *Eicosanoids*, 1991. 4(2): p. 65-74.
- 134 Issemann I., Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, 1990. 347(6294): p. 645-650.
- 135 Kliewer S.A., Willson T.M. The nuclear receptor PPAR[gamma]-bigger than fat. *Current Opinion in Genetics & Development*, 1998. 8(5): p. 576-581.
- 136 Göttlicher M., Demoz A., Svensson D., Tollet P., Berge R.K., Gustafsson J.-Å. Structural and metabolic requirements for activators of the peroxisome proliferator-activated receptor. *Biochemical Pharmacology*, 1993. 46(12): p. 2177-2184.
- 137 Dunaif A. Polycystic ovary syndrome. *Curr Ther Endocrinol Metab*, 1994. 5: p. 222-9.
- 138 Iuorno M.J., Nestler J.E. The polycystic ovary syndrome: treatment with insulin sensitizing agents. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 1999. 1(3): p. 127-136.
- 139 Iuorno M., Nestler J. Insulin-lowering drugs in polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 2001. 28(1): p. 153-64.
- 140 Nestler J.E., Stovall D., Akhter N., Iuorno M.J., Jakubowicz D.J. Strategies for the use of insulin-sensitizing drugs to treat infertility in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility*, 2002. 77(2): p. 209-215.
- 141 Lord J.M., Flight I.H.K., Norman R.J. Metformin in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 2003. 327(7421): p. 951-.
- 142 Baillargeon J.-P., Iuorno M.J., Nestler J.E. Insulin Sensitizers for Polycystic Ovary Syndrome. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 2003. 46(2): p. 325-340.
- 143 Seli E., Duleba A. Treatment of PCOS with metformin and other insulin-sensitizing agents. *Curr Diab Rep*, 2004. 4(1): p. 69-75.
- 144 Tang T., Lord J.M., Norman R.J., Yasmin E., Balen A.H. Insulin-sensitising drugs (metformin, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for women with polycystic ovary syndrome, oligo amenorrhoea and subfertility. *Cochrane Database Syst Rev*, 2009. 4: p. CD003053.
- 145 Barak Y., Nelson M.C., Ong E.S., Jones Y.Z., Ruiz-Lozano P., Chien K.R., Koder A., Evans R.M. PPARgamma Is Required for Placental, Cardiac, and Adipose Tissue Development. *Molecular cell*, 1999. 4(4): p. 585-595.
- 146 Hirata Y., Hayashi H., Ito S., Kikawa Y., Ishibashi M., Sudo M., Miyazaki H., Fukushima M., Narumiya S., Hayaishi O. Occurrence of 9-deoxy-delta 9, delta 12-13, 14-dihydroprostaglandin D2 in human urine. *Journal of Biological Chemistry*, 1988. 263(32): p. 16619-16625.
- 147 Giudice L.C. Endometrium in PCOS: Implantation and predisposition to endocrine CA. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2006. 20(2): p. 235-244.
- 148 Pillay O.C., Te Fong L.F.W., Crow J.C., Benjamin E., Mould T., Atiomo W., Menon P.A., Leonard A.J., Hardiman P. The association between polycystic ovaries and endometrial cancer. *Human Reproduction*, 2006. 21(4): p. 924-929.

- 149 Mazur M.T. Endometrial hyperplasia/adenocarcinoma. A conventional approach. *Annals of diagnostic pathology*, 2005. 9(3): p. 174-181.
- 150 Amant F., Moerman P., Neven P., Timmerman D., Van Limbergen E., Vergote I. Endometrial cancer. *The Lancet*, 2005. 366(9484): p. 491-505.
- 151 Hardiman P., Pillay O.S., Atiomo W. Polycystic ovary syndrome and endometrial carcinoma. *The Lancet*, 2003. 361(9371): p. 1810-1812.
- 152 Ehrmann D.A., Barnes R.B., Rosenfield R.L., Cavaghan M.K., Imperial J. Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care*, 1999. 22: p. 141 - 146.
- 153 Siiteri P. Hormonal characteristics of patients with endometrial hyperplasia and carcinoma [proceedings]. *Acta Cytol*, 1980. 24(6): p. 482-3.
- 154 Nisker J., Hammond G., Davidson B., Frumar A., Takaki N., Judd H., Siiteri P. Serum sex hormone-binding globulin capacity and the percentage of free estradiol in postmenopausal women with and without endometrial carcinoma. A new biochemical basis for the association between obesity and endometrial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol Endocrinol*, 1980. 138(6): p. 637-42.
- 155 Potischman N., Hoover R.N., Brinton L.A., Siiteri P., Dorgan J.F., Swanson C.A., Berman M.L., Mortel R., Twiggs L.B., Barrett R.J., Wilbanks G.D., Persky V., Lurain J.R. Case-Control Study of Endogenous Steroid Hormones and Endometrial Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 1996. 88(16): p. 1127-1135.
- 156 Kaaks R., Lukanova A., Kurzer M.S. Obesity, Endogenous Hormones, and Endometrial Cancer Risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2002. 11(12): p. 1531-1543.
- 157 Porter T.F., Scott J.R. Evidence-based care of recurrent miscarriage. Best practice & research. *Clinical obstetrics & gynaecology*, 2005. 19(1): p. 85-101.
- 158 Heijnen E.M.E.W., Eijkemans M.J.C., Hughes E.G., Laven J.S.E., Macklon N.S., Fauser B.C.J.M. A meta-analysis of outcomes of conventional IVF in women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction Update*, 2006. 12(1): p. 13-21.
- 159 Sengoku K., Tamate K., Takuma N., Yoshida T., Goishi K., Ishikawa M. The chromosomal normality of unfertilized oocytes from patients with polycystic ovarian syndrome. *Human Reproduction*, 1997. 12(3): p. 474-477.
- 160 Ludwig M., Finas D.F., Al-Hasani S., Diedrich K., Ortmann O. Oocyte quality and treatment outcome in intracytoplasmic sperm injection cycles of polycystic ovarian syndrome patients. *Human Reproduction*, 1999. 14(2): p. 354-358.
- 161 Duby R., Prange R. *Physiology and Endocrinology of the Estrous Cycle. Dairy Integrated Reproductive Management*. 1996: University of Massachusetts.
- 162 Lamb G., Smith M., Perry G., Atkins J., Risley M., Busch D., Patterson D. *Reproductive Endocrinology and Hormonal Control of the Estrous Cycle*. 2009: North Florida Research and Education Center, University of Florida.

- 163 Simón C., Horcajadas J.A., Velasco G., Antonio J., Pellicer A. El endometrio humano. 1º ed, ed. Panamericana. 2009.
- 164 Galletly C., Clark A., Tomlinson L., Blaney F.A group program for obese, infertile women: weight loss and improved psychological health. *J Psychosom Obstet Gynaecol*, 1996. 17: p. 125 - 128.
- 165 Huber-Buchholz M.M., Carey D.G., Norman R.J. Restoration of reproductive potential by lifestyle modification in obese polycystic ovary syndrome: role of insulin sensitivity and luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999. 84: p. 1470 - 1474.
- 166 Pasquali R., Pelusi C., Genghini S., Cacciari M., Gambineri A. Obesity and reproductive disorders in women. *Human Reproduction Update*, 2003. 9(4): p. 359-372.
- 167 Moran L.J., Noakes M., Clifton P.M., Wittert G.A., Williams G., Norman R.J. Short-term meal replacements followed by dietary macronutrient restriction enhance weight loss in polycystic ovary syndrome. *Am J Clin Nutr*, 2006. 84: p. 77 - 87.
- 168 Karimzadeh M.A., Javedani M. An assessment of lifestyle modification versus medical treatment with clomiphene citrate, metformin, and clomiphene citrate+metformin in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility*, 2010. 94(1): p. 216-220.
- 169 Poehlman E.T., Dvorak R.V., Denino W.F., Brochu M., Ades P.A. Effects of resistance training and endurance training on insulin sensitivity in nonobese, young women: a controlled randomized trial. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. 85: p. 2463 - 2468.
- 170 Bruni V., Dei M., Pontello V., Vangelisti P. The Management of Polycystic Ovary Syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2003. 997(1): p. 307-321.
- 171 Cheang K., Nestler J. Should insulin-sensitizing drugs be used in the treatment of polycystic ovary syndrome? *Reprod Biomed Online*, 2004. 8(4): p. 440-7.
- 172 Krysiak R., Okopień B., Gdula-Dymek A., Herman Z. Update on the management of polycystic ovary syndrome. *Pharmacol Rep*, 2006. 58(5): p. 614-25.
- 173 Group T.E.A.-S.P.C.W. Consensus on infertility treatment related to polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*, 2008. 23(3): p. 462-477.
- 174 Coughlan C., Fitzgerald J., Milne P., Wingfield M. Is it safe to prescribe clomiphene citrate without ultrasound monitoring facilities? *J Obstet Gynaecol*, 2010. 30(4): p. 393-6.
- 175 Homburg R. Clomiphene citrate-end of an era? a mini-review. *Human Reproduction*, 2005. 20(8): p. 2043-2051.
- 176 Velazquez E.M., Mendoza S., Hamer T., Sosa F., Glueck C.J. Metformin therapy in polycystic ovary syndrome reduces hyperinsulinemia, insulin resistance, hyperandrogenemia, and systolic blood pressure, while facilitating normal menses and pregnancy. *Metabolism*, 1994. 43(5): p. 647-654.

- 177 Nestler J.E. Metformin for the Treatment of the Polycystic Ovary Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 2008. 358(1): p. 47-54.
- 178 Baillargeon J.-P., Nestler J.E. Polycystic Ovary Syndrome: A Syndrome of Ovarian Hypersensitivity to Insulin? *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. 91(1): p. 22-24.
- 179 Fedorcak P., Dale P., Storeng R., Abyholm T., Tanbo T. The effect of 500 metformin on ovarian stimulation and in vitro fertilization in insulin-resistant 21 women with polycystic ovary syndrome: an open-label randomized cross-over trial. *Gynecol Endocrinol* 2003. 17: p. 207-14.
- 180 Harborne L., Fleming R., Lyall H., Sattar N., Norman J. Metformin or Antiandrogen in the Treatment of Hirsutism in Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. 88(9): p. 4116-4123.
- 181 Nestler J.E., Jakubowicz D.J. Decreases in Ovarian Cytochrome P450c17alpha Activity and Serum Free Testosterone after Reduction of Insulin Secretion in Polycystic Ovary Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 1996. 335(9): p. 617-623.
- 182 Tosca L., Solnais P., Ferre P., Fougelle F., Dupont J. Metformin-Induced Stimulation of Adenosine 5' Monophosphate-Activated Protein Kinase (PRKA) Impairs Progesterone Secretion in Rat Granulosa Cells. *Biol Reprod*, 2006. 75(3): p. 342-351.
- 183 Attia G.R., Rainey W.E., Carr B.R. Metformin directly inhibits androgen production in human thecal cells. *Fertility and Sterility*, 2001. 76(3): p. 517-524.
- 184 Tosca L., Crochet S., Ferre P., Fougelle F., Tesseraud S., Dupont J. AMP-activated protein kinase activation modulates progesterone secretion in granulosa cells from hen preovulatory follicles. *J Endocrinol*, 2006. 190(1): p. 85-97.
- 185 Solano M., V V.S., Mr M.W., Motta A. Dehydroepiandrosterone and metformin regulate proliferation of murine T lymphocytes. *Clin Exp Immunol*, 2008. 153(2): p. 289-96.
- 186 Bonnefont-Rousselot D., Raji B., Walrand S., Gard[Egrave]S-Albert M., Jore D., Legrand A., Peynet J., Vasson M.P. An intracellular modulation of free radical production could contribute to the beneficial effects of metformin towards oxidative stress. *Metabolism*, 2003. 52(5): p. 586-589.
- 187 Moll E., Van Der Veen F., Van Wely M. The role of metformin in polycystic ovary syndrome: a systematic review. *Human Reproduction Update*, 2007. 13(6): p. 527-537.
- 188 Diamanti-Kandarakis E., Christakou C.D., Kandarakis E., Economou F.N. Metformin: an old medication of new fashion: evolving new molecular mechanisms and clinical implications in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol*, 2010. 162(2): p. 193-212.
- 189 Palomba S., Russo T., Orio F., Falbo A., Manguso F., Cascella T., Tolino A., Carmina E., Colao A., Zullo F. Uterine effects of metformin administration in anovulatory women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*, 2006. 21(2): p. 457-465.
- 190 Jakubowicz D.J., Essah P.A., Seppala M., Jakubowicz S., Baillargeon J.-P., Koistinen R., Nestler J.E. Reduced Serum Glycodelin and Insulin-Like Growth

- Factor-Binding Protein-1 in Women with Polycystic Ovary Syndrome during First Trimester of Pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. 89(2): p. 833-839.
- 191 Vanky E., Salvesen K.Å., Heimstad R., Fougner K.J., Romundstad P., Carlsen S.M. Metformin reduces pregnancy complications without affecting androgen levels in pregnant polycystic ovary syndrome women: results of a randomized study. *Human Reproduction*, 2004. 19(8): p. 1734-1740.
- 192 Fleming R., Hopkinson Z.E., Wallace A.M., Greer I.A., Sattar N. Ovarian Function and Metabolic Factors in Women with Oligomenorrhea Treated with Metformin in a Randomized Double Blind Placebo-Controlled Trial. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. 87(2): p. 569-574.
- 193 Peters A. Using thiazolidinediones: rosiglitazone and pioglitazone in clinical practice. *Am J Manag Care* 2001. 7 (3 Suppl): S87-95; quiz S96-7.
- 194 Shimabukuro M., Zhou Y.-T., Lee Y., Unger R.H. Troglitazone Lowers Islet Fat and Restores Beta Cell Function of Zucker Diabetic Fatty Rats. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. 273(6): p. 3547-3550.
- 195 Buckingham R.E., Al-Barazanji K.A., Toseland C.D., Slaughter M., Connor S.C., West A., Bond B., Turner N.C., Clapham J.C. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, rosiglitazone, protects against nephropathy and pancreatic islet abnormalities in Zucker fatty rats. *Diabetes*, 1998. 47(8): p. 1326-1334.
- 196 Willson T.M., Cobb J.E., Cowan D.J., Wiethe R.W., Correa I.D., Prakash S.R., Beck K.D., Moore L.B., Kliewer S.A., Lehmann J.M. The Structure-Activity Relationship between Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma Agonism and the Antihyperglycemic Activity of Thiazolidinediones. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1996. 39(3): p. 665-668.
- 197 Yamasaki Y., Kawamori R., Wasada T., Sato A., Omori Y., Eguchi H., Tominaga M., Sasaki H., Ikeda M., Kubota M., Ishida Y., Hozumi T., Baba S., Uehara M., Shichiri M., Kaneko T., Ad-4833 Glucose Clamp Study Group J. Pioglitazone (AD-4833) Ameliorates Insulin Resistance in Patients with NIDDM. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 1997. 183(3): p. 173-183.
- 198 Cominacini L., Garbin U., Fratta-Pasini A., Campagnola M., Davoli A., Foot E., Sighieri G., Sironi A., Cascio V.L., Ferrannini E. Troglitazone reduces LDL oxidation and lowers plasma E-selectin concentration in NIDDM patients. *Diabetes*, 1998. 47(1): p. 130-3.
- 199 Tack C.J., Smits P., Demacker P.N., Stalenhoef A.F. Troglitazone decreases the proportion of small, dense LDL and increases the resistance of LDL to oxidation in obese subjects. *Diabetes Care*, 1998. 21(5): p. 796-799.
- 200 Hirano T., Yoshino G., Kazumi T. Troglitazone and Small Low-Density Lipoprotein in Type 2 Diabetes. *Annals of Internal Medicine*, 1998. 129(2): p. 162-163.
- 201 Gasic S., Bodenbun Y., Nagamani M., Green A., Urban R.J. Troglitazone Inhibits Progesterone Production in Porcine Granulosa Cells. *Endocrinology*, 1998. 139(12): p. 4962-4966.
- 202 Mu Y.-M., Yanase T., Nishi Y., Waseda N., Oda T., Tanaka A., Takayanagi R., Nawata H. Insulin Sensitizer, Troglitazone, Directly Inhibits Aromatase

- Activity in Human Ovarian Granulosa Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000. 271(3): p. 710-713.
- 203 Brettenthaler N., De Geyter C., Huber P.R., Keller U. Effect of the Insulin Sensitizer Pioglitazone on Insulin Resistance, Hyperandrogenism, and Ovulatory Dysfunction in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. 89(8): p. 3835-3840.
- 204 Dereli D., Dereli T., Bayraktar F., Ozgen A.G., Yilmaz C. Endocrine and Metabolic Effects of Rosiglitazone in Non-obese Women with Polycystic Ovary Disease. *Endocrine Journal*, 2005. 52(3): p. 299-308.
- 205 Ortega-Gonzalez C., Luna S., Hernandez L., Crespo G., Aguayo P., Arteaga-Troncoso G., Parra A. Responses of Serum Androgen and Insulin Resistance to Metformin and Pioglitazone in Obese, Insulin-Resistant Women with Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. 90(3): p. 1360-1365.
- 206 Legro R.S., Barnhart H.X., Schlaff W.D., Carr B.R., Diamond M.P., Carson S.A., Steinkampf M.P., Coutifaris C., McGovern P.G., Cataldo N.A., Gosman G.G., Nestler J.E., Giudice L.C., Ewens K.G., Spielman R.S., Leppert P.C., Myers E.R. For the Reproductive Medicine Network. Ovulatory Response to Treatment of Polycystic Ovary Syndrome is Associated with a Polymorphism in the STK11 Gene. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007: p. jc.2007-1736.
- 207 Legro R.S., Zaino R.J., Demers L.M., Kunselman A.R., Gnatuk C.L., Williams N.I., Dodson W.C. The effects of metformin and rosiglitazone, alone and in combination, on the ovary and endometrium in polycystic ovary syndrome. *American journal of obstetrics and gynecology*, 2007. 196(4): p. 402.e1-402.e11.
- 208 Glueck C.J., Moreira A., Goldenberg N., Sieve L., Wang P. Pioglitazone and metformin in obese women with polycystic ovary syndrome not optimally responsive to metformin. *Human Reproduction*, 2003. 18(8): p. 1618-1625.
- 209 Okon M.A., Laird S.M., Tuckerman E.M., Li T.-C. Serum Androgen Levels in Women who Have Recurrent Miscarriages and their Correlation with Markers of Endometrial Function. Supported by a research grant from the Special Trustees of the former United Sheffield Hospitals, Royal Hallamshire Hospital, Sheffield, Yorkshire, United Kingdom. *Fertility and sterility*, 1998. 69(4): p. 682-690.
- 210 Tuckerman E.M., Okon M.A., Li T.-C., Laird S.M. Do androgens have a direct effect on endometrial function? An in vitro study. *Fertility and Sterility*, 2000. 74(4): p. 771-779.
- 211 Sir-Petermann T., Maliqueo M., Angel B., Lara H.E., Páez-Bravo F., Recabarren S.E. Maternal serum androgens in pregnant women with polycystic ovarian syndrome: possible implications in prenatal androgenization. *Human Reproduction*, 2002. 17(10): p. 2573-2579.
- 212 Kolodziejczyk B., Duleba A.J., Spaczynski R.Z., Pawelczyk L. Metformin therapy decreases hyperandrogenism and hyperinsulinemia in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility*, 2000. 73(6): p. 1149-1154.
- 213 Grant P. The effects of high- and medium-dose metformin therapy on cardiovascular risk factors in patients with type II diabetes. *Diabetes Care*, 1996. 19(1): p. 64-6.
- 214 Baillargeon J.-P., Jakubowicz D.J., Iuorno M.J., Jakubowicz S., Nestler J.E. Effects of metformin and rosiglitazone, alone and in combination, in

- nonobese women with polycystic ovary syndrome and normal indices of insulin sensitivity. *Fertility and sterility*, 2004. 82(4): p. 893-902.
- 215 Motta A., Estevez A., Franchi A., Perez-Martinez S., Farina M., Ribeiro M., Lasserre A., Gimeno M. Regulation of lipid peroxidation by nitric oxide and PGF 2α during luteal regression in rats. *Reproduction*, 2001. 121(4): p. 631-637.
- 216 Scully R., Bonfiglio T., Kurman R., Silverberg S., Wilkinson E. *Histological Typing of Female Genital Tract Tumours (International Histological Classification of Tumours)*. 2^o ed. 1994. 13-18.
- 217 Gunin A.G., Mashin I.N., Zakharov D.A. Proliferation, mitosis orientation and morphogenetic changes in the uterus of mice following chronic treatment with both estrogen and glucocorticoid hormones. *J Endocrinol*, 2001. 169(1): p. 23-31.
- 218 Salter M., Knowles R.G., Moncada S. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca $^{2+}$ -dependent and Ca $^{2+}$ -independent nitric oxide synthases. *FEBS Letters*, 1991. 291(1): p. 145-149.
- 219 Misra H.P., Fridovich I. The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem.*, 1972. 247(10): p. 3170-3175.
- 220 Chance B. *Special methods: Catalase*. Glick, R. Interscience. New York ed. 1954. 408-424.
- 221 Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem*, 1969. 27(3): p. 502-22.
- 222 Bradford M.A. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976. 72: p. 248-54.
- 223 Perfumo P. Papel de la insulino resistencia en la génesis de la poliquistosis ovárica. *Revista de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva*, 2003. X(2): p. 17-26.
- 224 Moreira S., Soares E., Tomaz G., Maranhão T., Azevedo G. Polycystic ovary syndrome: a psychosocial approach. *Acta Med Port*, 2010. 23(2): p. 237-42.
- 225 Sagle M., Bishop K., Ridley N., Alexander F., Michel M., Bonney R., Beard R., Franks S. Recurrent early miscarriage and polycystic ovaries. *BMJ*, 1988. 297(6655): p. 1027-8.
- 226 Tulppala M., Stenman U., Cacciato B., Ylikorkala O. Polycystic ovaries and levels of gonadotrophins and androgens in recurrent miscarriage: prospective study in 50 women. *Br J Obstet Gynaecol*, 1993. 100(4)(4): p. 348-52.
- 227 Palomba S., Orio F., Jr., Falbo A., Russo T., Tolino A., Zullo F. Clomiphene Citrate Versus Metformin as First-Line Approach for the Treatment of Anovulation in Infertile Patients with Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. 92(9): p. 3498-3503.
- 228 Neveu N., Granger L., St-Michel P., Lavoie H.L.N.B. Comparison of clomiphene citrate, metformin, or the combination of both for first-line ovulation induction

- and achievement of pregnancy in 154 women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility*, 2007. 87(1): p. 113-120.
- 229 Legro R.S., Barnhart H.X., Schlaff W.D., Carr B.R., Diamond M.P., Carson S.A., Steinkampf M.P., Coutifaris C., Mcgovern P.G., Cataldo N.A., Gosman G.G., Nestler J.E., Giudice L.C., Leppert P.C., Myers E.R. Clomiphene, Metformin, or Both for Infertility in the Polycystic Ovary Syndrome. *N Engl J Med*, 2007. 356(6): p. 551-566.
- 230 Aytan H., Caliskan A.C., Demirturk F., Aytan P., Koseoglu D.R. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone reduces the size of experimental endometriosis in the rat model. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 2007. 47(4): p. 321-325.
- 231 Sepilian V., Nagamani M. Effects of Rosiglitazone in Obese Women with Polycystic Ovary Syndrome and Severe Insulin Resistance. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. 90(1): p. 60-65.
- 232 Deshpande R., Chang M., Chapman J., Michael S. Alteration of cytokine production in follicular cystic ovaries induced in mice by neonatal estradiol injection. *Am J Reprod Immunol*, 2000. 44(2): p. 80-8.
- 233 West C., Foster D.L., Evans N.P., Robinson J., Padmanabhan V. Intra-follicular activin availability is altered in prenatally-androgenized lambs. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2001. 185(1-2): p. 51-59.
- 234 Manneras L., Cajander S., Holmang A., Seleskovic Z., Lystig T., Lonn M., Stener-Victorin E. A New Rat Model Exhibiting Both Ovarian and Metabolic Characteristics of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrinology*, 2007. 148(8): p. 3781-3791.
- 235 Anderson E., Lee G.Y. The polycystic ovarian (PCO) condition: apoptosis and epithelialization of the ovarian antral follicles are aspects of cystogenesis in the dehydroepiandrosterone (DHEA)-treated rat model. *Tissue and Cell*, 1997. 29(2): p. 171-189.
- 236 Anderson E., Lee G.Y., O'Brien K. 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. *The Anatomical Record*, 1997. 249(1): p. 44-53.
- 237 Honma H., Endo T., Henmi H., Nagasawa K., Baba T., Yamazaki K., Kitajima Y., Hayashi T., Manase K., Saito T. Altered expression of Fas/Fas ligand/caspase 8 and membrane type 1-matrix metalloproteinase in atretic follicles within dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovaries in rats. *Apoptosis*, 2006. 11(9): p. 1525-1533.
- 238 Zhu J.-Q., Zhu L., Liang X.-W., Xing F.-Q., Schatten H., Sun Q.-Y. Demethylation of LHR in dehydroepiandrosterone-induced mouse model of polycystic ovary syndrome. *Molecular Human Reproduction*, 2010. 16(4): p. 260-266.
- 239 Wozniak S., Gee L., Wachtel M., Frezza E. Adipose Tissue: The New Endocrine Organ? A Review Article. *Digestive Diseases and Sciences*, 2009. 54(9): p. 1847-1856.
- 240 Geer E., Shen W. Gender differences in insulin resistance, body composition, and energy balance. *Gend Med*, 2009. 6(1): p. 60-75.

- 241 Elbers J.M.H., Giltay E.J., Teerlink T., Scheffer P.G., Asscheman H., Seidell J.C., Gooren L.J.G. Effects of sex steroids on components of the insulin resistance syndrome in transsexual subjects. *Clinical Endocrinology*, 2003. 58(5): p. 562-571.
- 242 Martínez-Bermejo E., Luque-Ramírez M., Escobar-Morreale H. Obesity and the polycystic ovary syndrome. *Minerva Endocrinol*, 2007. 32(3): p. 129-40.
- 243 Eisner J., Dumesic D., Kemnitz J., Colman R., Abbott D. Increased adiposity in female rhesus monkeys exposed to androgen excess during early gestation. *Obes Res*, 2003. 11(2): p. 279-86.
- 244 Aghahosseini M., Aleyaseen A., Safdarian L., Moddaress-Hashemi S., Mofid B., Kashani L. Metformin 2,500 mg/day in the treatment of obese women with polycystic ovary syndrome and its effect on weight, hormones, and lipid profile. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 2010. 282(6): p. 691-694.
- 245 Ladson G., Dodson W.C., Sweet S.D., Archibong A.E., Kunselman A.R., Demers L.M., Williams N.I., Coney P., Legro R.S. The effects of metformin with lifestyle therapy in polycystic ovary syndrome: a randomized double-blind study. *Fertility and sterility*, 2010. 95(3): p. 1059-1066.e7.
- 246 Oppelt P.G., Mueller A., Jentsch K., Kronawitter D., Reissmann C., Dittrich R., Beckmann M.W., Cupisti S. The Effect of Metformin Treatment for 2 Years without Caloric Restriction on Endocrine and Metabolic Parameters in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2010. 118(EFirst): p. 633,637.
- 247 Otta C.F., Wior M., Iraci G., Kaplan R., Torres D., Gaido M., Wyse E. Clinical, metabolic, and endocrine parameters in response to metformin and lifestyle intervention in women with polycystic ovary syndrome: A randomized, double-blind, and placebo control trial. *Gynecol Endocrinol*, 2009. 8: p. 1-6.
- 248 Otta C.F., Wior M., Iraci G.S., Kaplan R., Torres D., Gaido M.I., Wyse E.P. Clinical, metabolic, and endocrine parameters in response to metformin and lifestyle intervention in women with polycystic ovary syndrome: A randomized, double-blind, and placebo control trial. *Gynecological Endocrinology*, 2010. 26(3): p. 173-178.
- 249 Kodaman P.H., Aten R.F., Behrman H.R. Lipid hydroperoxides evoke antigonadotropic and antisteroidogenic activity in rat luteal cells. *Endocrinology*, 1994. 135(6): p. 2723-2730.
- 250 Groothuis P.G., Dassen H.H.N.M., Romano A., Punyadeera C. Estrogen and the endometrium: lessons learned from gene expression profiling in rodents and human. *Human Reproduction Update*, 2007. 13(4): p. 405-417.
- 251 Agarwal A., Durani S., Setty B. Dose dependent modulation of receptor dynamics and uterine growth in immature rat by estradiol: importance of an additional nuclear binding at 24 hr for long-term (72 hr) uterine growth. *Endokrinologie*, 1982. 79(2): p. 235-41.
- 252 Cheng S., Macdonald B., Clark B., Pollard J. Cell growth and cell proliferation may be dissociated in the mouse uterine luminal epithelium treated with female sex steroids. *Exp Cell Res*, 1985. 160(2): p. 459-70.

- 253 Ma W.-G., Song H., Das S.K., Paria B.C., Dey S.K. Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003. 100(5): p. 2963-2968.
- 254 Finn C.A., Pope M., Milligan S.R. Control of uterine stromal mitosis in relation to uterine sensitivity and decidualization in mice. *J Reprod Fertil*, 1995. 103(1): p. 153-158.
- 255 Milligan S.R., Cohen P.E., Finn C.A. The minimum requirements for oestradiol to induce uterine sensitivity for implantation and decidualization in mice. *Human Reproduction*, 1995. 10(6): p. 1502-1506.
- 256 Franks S., Mason H., Willis D. Follicular dynamics in the polycystic ovary syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2000. 163(1-2): p. 49-52.
- 257 Vandermolen D.T., Ratts V.S., Evans W.S., Stovall D.W., Kauma S.W., Nestler J.E. Metformin increases the ovulatory rate and pregnancy rate from clomiphene citrate in patients with polycystic ovary syndrome who are resistant to clomiphene citrate alone. *Fertility and sterility*, 2001. 75(2): p. 310-315.
- 258 Kazerooni T., Dehghan-Kooshkghazi M. Effects of metformin therapy on hyperandrogenism in women with polycystic ovarian syndrome. *Gynecol Endocrinol*, 2003. 17(1): p. 51-6.
- 259 Weerakiet S., Tingthanatikul Y., Sophonsritsuk A., Choktanasiri W., Wansumrith S., Rojanasakul A. Efficacy of metformin on ovulation induction in Asian women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol*, 2004. 19(4): p. 202-7.
- 260 Papaioannou S., Tzafettas J. Anovulation with or without PCO, hyperandrogenaemia and hyperinsulinaemia as promoters of endometrial and breast cancer. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*. 24(1): p. 19-27.
- 261 Hackenberg R., Hannig K., Beck S., Schmidt-Rhode P., Scholz A., Schulz K. Androgen-like and anti-androgen-like effects of antiprogestins in human mammary cancer cells. *Eur J Cancer*, 1996. 32A(4): p. 696-701.
- 262 Doualla-Bell F., Guay J.M., Bourgoin S., Fortier M.A. Prostaglandin G/H Synthase (PGHS)-2 Expression in Bovine Myometrium: Influence of Steroid Hormones and PGHS Inhibitors. *Biol Reprod*, 1998. 59(6): p. 1433-1438.
- 263 Finn C. Implantation, menstruation and inflammation. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 1986. 61(4): p. 313-28.
- 264 Kelly R.W., King A.E., Critchley H.O.D. Inflammatory mediators and endometrial function-focus on the perivascular cell. *Journal of reproductive immunology*, 2002. 57(1): p. 81-93.
- 265 Boerboom D., Brown K.A., Vaillancourt D., Poitras P., Goff A.K., Watanabe K., Doré M., Sirois J. Expression of Key Prostaglandin Synthases in Equine Endometrium During Late Diestrus and Early Pregnancy. *Biology of Reproduction*, 2004. 70(2): p. 391-399.
- 266 Arosh J.A., Banu S.K., Chapdelaine P., Madore E., Sirois J., Fortier M.A. Prostaglandin Biosynthesis, Transport, and Signaling in Corpus Luteum: A Basis for Autoregulation of Luteal Function *Endocrinology*, 2004. 145(5): p. 2551-2560.

- 267 Zhi Y., Liu R., Song M., Tian Y., Long J., Tu W., Guo R. Cyclooxygenase-2 promotes angiogenesis by increasing vascular endothelial growth factor and predicts prognosis in gallbladder carcinoma. *World J Gastroenterol*, 2005. 11(24): p. 3724-8.
- 268 Li G., Dong B., Butz D.E., Park Y., Pariza M.W., Cook M.E. NF- κ B independent inhibition of lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase by a conjugated linoleic acid cognate, conjugated nonadecadienoic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2006. 1761(9): p. 969-972.
- 269 Ohno S., Ohno Y., Suzuki N., Soma G.-I., Inoue M. Cyclooxygenase-2 Expression Correlates with Apoptosis and Angiogenesis in Endometrial Cancer Tissue. *Anticancer Research*, 2007. 27(6A): p. 3765-3770.
- 270 Wang Z., Tamura K., Yoshie M., Tamura H., Imakawa K., Kogo H. Prostaglandin F_{2a}-Induced Functional Regression of the Corpus Luteum and Apoptosis in Rodents. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2003. 92: p. 19-27.
- 271 Garcia-Gil M., Bertini F., Pesi R., Voccoli V., Tozzi M., Camici M. 5'-Amino-4-imidazolecarboxamide riboside induces apoptosis in human neuroblastoma cells via the mitochondrial pathway. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2006. 25(9-11): p. 1265-70.
- 272 Ota K., Nakamura J., Li W., Kozakae M., Watarai A., Nakamura N., Yasuda Y., Nakashima E., Naruse K., Watabe K., Kato K., Oiso Y., Hamada Y. Metformin prevents methylglyoxal-induced apoptosis of mouse Schwann cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007. 357(1): p. 270-275.
- 273 Sugino N., Karube-Harada A., Taketani T., Sakata A., Nakamura Y. Withdrawal of Ovarian Steroids Stimulates Prostaglandin F_{2alpha}; Production Through Nuclear Factor- κ B Activation via Oxygen Radicals in Human Endometrial Stromal Cells: Potential Relevance to Menstruation. *The Journal of Reproduction and Development*, 2004. 50(2): p. 215-225.
- 274 Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A., Freeman B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990. 87(4): p. 1620-1624.
- 275 Wink D.A., Cook J.A., Pacelli R., Degraff W., Gamson J., Liebmann J., Krishna M.C., Mitchell J.B. The Effect of Various Nitric Oxide-Donor Agents on Hydrogen Peroxide-Mediated Toxicity: A Direct Correlation between Nitric Oxide Formation and Protection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1996. 331(2): p. 241-248.
- 276 Brüne B. The intimate relation between nitric oxide and superoxide in apoptosis and cell survival. *Antioxid Redox Signal*, 2005. 7(3-4): p. 497-507.
- 277 Youssef J., Thibeault D., Rezaiekhlig M., Mabry S., Norberg M., Truong W. Influence of inhaled nitric oxide and hyperoxia on Na,K-ATPase expression and lung edema in newborn piglets. *Biol Neonate*, 1999. 75(3): p. 199-209.
- 278 Tosca L., Chabrolle C., Uzbekova S., Dupont J.L. Effects of Metformin on Bovine Granulosa Cells Steroidogenesis: Possible Involvement of Adenosine 5' Monophosphate-Activated Protein Kinase (AMPK). *Biology of Reproduction*, 2007. 76(3): p. 368-378.

- 279 Buzzai M., Jones R.G., Amaravadi R.K., Lum J.J., Deberardinis R.J., Zhao F., Viollet B., Thompson C.B. Systemic Treatment with the Antidiabetic Drug Metformin Selectively Impairs p53-Deficient Tumor Cell Growth. *Cancer Research*, 2007. 67(14): p. 6745-6752.
- 280 Pan Q.R., Li W.H., Wang H., Sun Q., Xiao X.H., Brock B., Schmitz O. Glucose, Metformin, and AICAR Regulate the Expression of G Protein-coupled Receptor Members in INS-1 β Cell. *Horm Metab Res*, 2009. 41(11): p. 799,804.
- 281 Prabhakar P., Doble M. Synergistic effect of phytochemicals in combination with hypoglycemic drugs on glucose uptake in myotubes. *Phytomedicine*, 2009. 16(12): p. 1119-26.
- 282 Legro R.S. Pregnancy Considerations in Women With Polycystic Ovary Syndrome. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 2007. 50(1): p. 295-304
10.1097/GRF.0b013e31803057ed.
- 283 Subbaramaiah K., Lin D.T., Hart J.C., Dannenberg A.J. PPAR γ ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of AP-1 and CBP/p300. *Journal of Biological Chemistry*, 2001.
- 284 Sung B., Park S., Yu B.P., Chung H.Y. Amelioration of age-related inflammation and oxidative stress by PPAR γ activator: Suppression of NF- κ B by 2,4-thiazolidinedione. *Experimental Gerontology*, 2006. 41(6): p. 590-599.
- 285 Ockner R. Integration of metabolism, energetics and signal transduction: unifying foundations in cell growth and death, cancer, atherosclerosis and Alzheimer disease, ed. N.Y. Kluwer Academic/Plenum publishers. 2004.
- 286 Wang C., Fu M., D'amico M., Albanese C., Zhou J.-N., Brownlee M., Lisanti M.P., Chatterjee V.K.K., Lazar M.A., Pestell R.G. Inhibition of Cellular Proliferation through κ B Kinase-Independent and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ -Dependent Repression of Cyclin D1. *Mol. Cell. Biol.*, 2001. 21(9): p. 3057-3070.
- 287 Nakahata N., Abe M., Nakanishi H. PGI₂ and delta 12PGI₂ inhibit cell growth accompanied with inhibition of phosphoinositide turnover in human astrocytoma cells. *Prostaglandins*, 1990. 40(4): p. 405-16.
- 288 Sander V.A., Facorro G.B., Piehl L., Rubin De Celis E., Motta A.B. Effect of DHEA and metformin on corpus luteum in mice. *Reproduction*, 2009. 138(3): p. 571-579.
- 289 Nagy L., Tontonoz P., Alvarez J.G.A., Chen H., Evans R.M. Oxidized LDL Regulates Macrophage Gene Expression through Ligand Activation of PPAR γ . *Cell*, 1998. 93(2): p. 229-240.
- 290 Huang J.T., Welch J.S., Ricote M., Binder C.J., Willson T.M., Kelly C., Witztum J.L., Funk C.D., Conrad D., Glass C.K. Interleukin-4-dependent production of PPAR- γ ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature*, 1999. 400(6742): p. 378-382.
- 291 Schild R.L., Schaiff W.T., Carlson M.G., Cronbach E.J., Nelson D.M., Sadovsky Y. The Activity of PPAR γ in Primary Human Trophoblasts Is Enhanced by Oxidized Lipids. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. 87(3): p. 1105-1110.

- 292 Cheon Y.-P., Li Q., Xu X., Demayo F.J., Bagchi I.C., Bagchi M.K. A Genomic Approach to Identify Novel Progesterone Receptor Regulated Pathways in the Uterus during Implantation. *Mol Endocrinol*, 2002. 16(12): p. 2853-2871.
- 293 Chen Q., Sun X., Chen J., Cheng L., Wang J., Wang Y., Sun Z. Direct rosiglitazone action on steroidogenesis and proinflammatory factor production in human granulosa-lutein cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2009. 7(1): p. 147.
- 294 Jawerbaum A., Capobianco E., Pustovrh C., White V., Baier M., Salzberg S., Pesaresi M., Gonzalez E. Influence of peroxisome proliferator-activated receptor γ activation by its endogenous ligand 15-deoxy 12,14 prostaglandin J2 on nitric oxide production in term placental tissues from diabetic women. *Molecular Human Reproduction*, 2004. 10(9): p. 671-676.
- 295 Kitamura Y., Kakimura J.-I., Matsuoka Y., Yasuyuki N., Gebicke-Haerter P.J., Taniguchi T. Activators of peroxisome proliferator-activated receptor- $[\gamma]$ (PPAR $[\gamma]$) inhibit inducible nitric oxide synthase expression but increase heme oxygenase-1 expression in rat glial cells. *Neuroscience Letters*, 1999. 262(2): p. 129-132.
- 296 Mastrocola R., Aragno M., Betteto S., Brignardello E., Catalano M.G., Danni O., Boccuzzi G. Pro-oxidant effect of dehydroepiandrosterone in rats is mediated by PPAR activation. *Life Sciences*, 2003. 73(3): p. 289-299.
- 297 Petrova T.V., Akama K.T., Van Eldik L.J. Cyclopentenone prostaglandins suppress activation of microglia: Down-regulation of inducible nitric-oxide synthase by 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999. 96(8): p. 4668-4673.
- 298 Ren Y., Sun C., Sun Y., Tan H., Wu Y., Cui B., Wu Z. PPAR γ protects cardiomyocytes against oxidative stress and apoptosis via Bcl-2 upregulation. *Vascular Pharmacology*, 2009. 51(2-3): p. 169-174.