



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**Programación fetal y esteroidogénesis ovárica: rol de los
receptores nucleares activados por proliferadores
peroxisomales gama**

**TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD
DE BUENOS AIRES EN EL ÁREA DE QUÍMICA BIOLÓGICA**

GISELLE ADRIANA ABRUZZESE

Directora de tesis: Dra. Alicia Beatriz Motta

Consejera de estudios: Dra. Ceciclia Varone

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

Buenos Aires, 2019

Programación fetal y esteroidogénesis ovárica: rol de los receptores nucleares activados por proliferadores peroxisomales gama

Resumen

El Síndrome del Ovario Poliquístico (SOP) es una de las principales causas de infertilidad femenina y está asociado a varias disfunciones metabólicas. La etiología de SOP se desconoce. Actualmente se postula un origen por programación fetal mediada por exceso androgénico. Entre los factores asociados a su etiopatogenia, se encuentra el receptor activado por proliferadores de peroxisomas gama (PPARg), el cual es un sensor metabólico involucrado en la funcionalidad lipídica y reproductiva. PPARg actúa como factor de transcripción y se ha demostrado como regulador de la expresión de la adipoproteína quimerina (asociada al desarrollo de trastornos metabólicos).

En este trabajo, estudiamos los efectos de la hiperandrogenización prenatal (HP) sobre el sistema reproductivo y metabólico, y el rol de PPARg y quimerina sobre la funcionalidad ovárica en un modelo murino. Por otro lado, evaluamos el riesgo cardiovascular y el valor de quimerina como marcador metabólico en pacientes con SOP argentinas.

Nuestros resultados revelan que la HP afecta el metabolismo lipídico sistémico y hepático, y la funcionalidad ovárica, involucrando una desregulación de PPARg y quimerina, y de la esteroidogénesis. Asimismo, conlleva a la expresión de dos fenotipos caracterizados por su ciclo estral: uno ovulatorio irregular y otro anovulatorio. Dichos efectos se detectan desde la pubertad tardía y persisten y se agravan a largo plazo, siendo mayores en el fenotipo anovulatorio.

En cuanto a las pacientes con SOP determinamos el valor de corte de dos marcadores de riesgo cardiovascular. Encontramos que quimerina está incrementada en SOP y correlaciona con marcadores metabólicos.

En conclusión, los resultados de este trabajo revelan que la HP conlleva efectos a largo plazo involucrando al sistema PPARg. Por otro lado, en cuanto a los pacientes con SOP, estos resultados resaltan la importancia del estudio y determinación de marcadores de riesgo metabólico en la población local.

Palabras Claves: Programación fetal, exceso androgénico, Síndrome de ovario poliquístico, quimerina, PPARg, marcadores metabólicos, esteroidogénesis ovárica, metabolismo lipídico.

Fetal programming and ovarian steroidogenesis: role of nuclear receptors activated by peroxisome proliferator gamma

Abstract

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is one of the main causes of women infertility. It is related to several metabolic disorders. PCOS etiology remains unknown. Current theories emphasize intrauterine origins, by fetal programming, caused by androgen excess. It has been reported that the nuclear receptor activated by peroxisome proliferator gamma (PPAR γ), may be involved in PCOS etiopathogeny. PPAR γ is a metabolic fuel sensor, involved in lipid metabolism and in reproductive tissues functions. PPAR γ acts as a transcription factor and it has been reported that it may modulate chemerin expression, an adipokine related to several metabolic disorders.

In this thesis, we studied the effects of fetal programming, caused by androgen excess, on reproductive and metabolic status; and the role of the fuel sensors, PPAR γ and chemerin, on ovarian tissue in a murine model. Likewise, we also evaluated cardiovascular risk on Argentine PCOS patients and the potential use of chemerin as a metabolic alterations biomarker in PCOS.

Our results showed that prenatal hyperandrogenism affects lipid profile, hepatic lipid metabolism and also ovarian functions. We found that androgen excess leads to two different phenotypes according to the estrous cycle: 1) an irregular ovulatory phenotype and 2) an anovulatory phenotype. Furthermore, in both of the phenotypes, PPAR γ and chemerin were altered and ovarian steroidogenesis was affected. Prenatal hyperandrogenism caused long-term effects, being the anovulatory phenotype the most affected one.

Regarding PCOS patients we determined a cut off value for two different markers of cardiovascular risk. Moreover, we found that the adipokine chemerin was increased in PCOS patients and it correlated with metabolic parameters.

In conclusion, our results show that prenatal hyperandrogenism leads to long-term effects that involved a deregulation of PPAR γ system. Even more, regarding PCOS Argentine patients, these results highlight the importance of studying local populations and assessing metabolic risk biomarkers.

Key words: fetal programming, androgen excess, Polycystic ovary syndrome, chemerin, PPAR γ , metabolic risk biomarkers, ovarian steroidogenesis, lipid metabolism.

Agradecimientos

Esta tesis no hubiese sido posible de no haber ocurrido como un trabajo en conjunto y en equipo, colaborativo. Fueron muchas las personas que participaron en el desarrollo de este trabajo, no sólo los que estuvieron activamente involucrados en el proyecto sino también los que estuvieron para dar una mano, una sonrisa, una palabra de aliento, aportando ideas, perspectivas y haciendo esas preguntas que nos dejan pensando y nos ayudan a planear, deconstruir y darle vuelta a lo que, como nos gusta decirle, estudiamos. A todos ellos, gracias.

Gracias a Alicia, por dejarme formar parte de su grupo y dejarme ser libre, en tiempos, en proyectos, y en el intercambio de ideas en el labo. Por siempre fomentar que crezcamos profesionalmente. Por aguantar mis insistencias y dejarse convencer con los propuestas. Gracias por alentarme y empujarme a seguir en este camino de la ciencia.

A Flower y a Sil, por estar siempre para bancar los trapos y por todo lo compartido: los mates, las catarsis, las risas, las cervezas, las dudas, los planes, los proyectos, los experimentos de sábados, domingos y feriados, y las charlas. Gracias también a Lean, por ayudarme en los primeros pasos en el labo, por las charlas, por los proyectos compartidos. Gracias a Majó, Aimé y Marie, que si bien empezaron hace poquito, ya dejaron su marca. ¡Gracias a todo el equipo por los buenos momentos compartidos!.

Gracias a Glori, por la buena predisposición desde el primer contacto que establecimos. Por compartir sus ideas, su entusiasmo, y su super buena onda. Gracias por la confianza y por compartir sus muestras también conmigo. Muchísimas gracias por dejarme trabajar junto a vos.

Tengo que agradecer, y muchísimo, al equipo de endocrinología del Hospital Durand, principalmente a Mabel Graffigna, Susana Belli, Juan Gamez, Oscar Levalle, Patricia Otero, Eduardo Mormandi, Cecilia Gorla y Jessica Pringer. Por sumarse y comprometerse con el proyecto de pacientes con SOP junto con nosotros. Especialmente a Mabel, Juan y Oscar quienes no sólo estuvieron muy comprometidos con el proyecto, sino que se sumaron a modificarlo y mejorarlo. Gracias por las charlas en las que me daban la perspectiva clínica, social y del paciente. Gracias también a Gustavo Lioy, del Hospital Posadas, por sumarse también al proyecto de SOP. Gracias a todas las mujeres que se sumaron a participar. Y mil gracias a Mari, una gran persona y un gran equipo desde ya hace muchos años, por haberme hecho el contacto, por la confianza, y por sumarse a seguir trabajando juntas y de otras maneras.

Gracias a la gente del IMBECU de Mendoza, que me recibieron con los brazos abiertos en mi estadía allí. A Pauli, a quien conocí en un congreso unos días y me dejó una marca enorme. Gracias por la calidez, por la bienvenida y por toda la buena onda con que me recibiste. Gracias, pero miles,

a Fiore, a quien conocí en la corta pasantía, y terminó siendo mi mesías en el camino de algunos experimentos y una gran compañera de trabajo y de charlas.

A Diana, Caro, Gastón, Leo, Nacho, Edu, Stefa, Vir y Chile, que si bien no trabajan en el mismo tema me ayudaron muchísimo a darle perspectiva a mi trabajo. Quiero agradecerles por planear experimentos conmigo, por ayudarme a darles otra perspectiva y a entender los resultados y organismos como son, complejos, desde un punto de vista menos reduccionista, más evolutivo y desde las interacciones. Por aguantar mis crisis, por las charlas, por las risas, las anécdotas, los vinos y las plazas. Por las excelentes horas de trabajo en docencia que pasamos juntas y especialmente por las horas invertidas, y super disfrutadas, de los proyectos paralelos compartidos. Gracias por ser un gran equipo. Especialmente quiero agradecer al Chile por dedicar su tiempo a explicarme estadística, que no todo es cuestión de un p-valor y que la estadística no es tan horrible como yo pensaba.

A mis amigas, las pibas: Juli, Luchi, Vale, Nati, Lis, Barbi, Agus, las que siempre están ¡y para todo!, que se preocupan por entender qué es lo que hago en el labo y que no me odian cuando les hablo de moleculitas. Gracias por su alegría y buena onda, por todo lo compartido y por compartir.

Gracias a mi familia, por estar siempre, por interesarse y emocionarse cuando les cuento que dio un experimento, que salió un *paper*, una charla, o cualquiera de esas cosas que "haces raras". Gracias por el apoyo, por el cariño, por la incondicionalidad.

Gracias a Víctor, por todo el amor. Gracias por ser mi compañero y dejarme ser la suya. Gracias por las sonrisas, por la compañía, por todas las aventuras vividas (y las que vendrán), por las charlas, por ponerle onda cuando estoy en superada, por tener siempre el chiste adecuado para sacar una sonrisa, por el apoyo, por los abrazos y, no menor, por la ayuda con todos los dibujitos.

Gracias al CEFyBO y toda su gente. Por toda la buena onda y excelente predisposición, por estar siempre dispuestos a dar una mano, a colaborar, por los after-labs, las charlas de pasillos, los mates, los consejos. Y un particular gracias a los chiques del piso 17.

Especialmente gracias a la FCEyN-UBA, y a la Universidad de Buenos Aires, por permitirme ser parte de ella, como alumna, como tutora, como docente, como comunidad. Porque no sólo es el lugar donde estudié la carrera que elegí, sino también un segundo hogar, que se hizo querer, que me permitió conocer gente hermosa, un lugar del que siempre tendré los mejores recuerdos.

Esta tesis ha sido posible gracias a:

- La Beca Interna Doctoral otorgada por el Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) en el tema: "Reprogramación fetal y esteroidogénesis ovárica: rol de los receptores nucleares activados por proliferadores peroxisomales gama".
- Al financiamiento de CONICET, ANPCyT y de la Universidad de Buenos Aires.

" Una esperanza creía en los tipos fisonómicos, tales como los ñatos, los de cara de pescado, los de gran toma de aire, los cetrinos y los cejudos, los de cara intelectual, los de estilo peluquero, etcétera. Dispuesta a clasificar definitivamente estos grupos, empezó por hacer grandes listas de conocidos y los dividió en los grupos citados más arriba. Tomó entonces el primer grupo, formado por ocho ñatos, y vio con sorpresa que en realidad estos muchachos se subdividían en tres grupos(...).Apenas los separó en sus nuevos grupos (...)se dio cuenta de que el primer subgrupo no era parejo(...).Haciéndolo a un lado con ayuda de un buen sándwich de anchoa y huevo duro, organizó el subgrupo de los dos carpinchos, y se disponía a inscribirlo en su libreta de trabajos científicos cuando uno de los carpinchos miró para un lado y el otro carpincho miró hacia el lado opuesto(...).Así fue como se le disolvió el subgrupo, y del resto no hablemos porque los demás sujetos habían pasado del mazagrán a la caña quemada, y en lo único que se parecían a esa altura de las cosas era en su firme voluntad de seguir bebiendo a expensas de la esperanza."

Fragmento de Su fe en las Ciencias, Historias de Cronopios y de Famas, Julio Cortázar.

*A todos los que creen y colaboran (aún cuando
no lo sepan) con la educación pública, gratuita y de calidad.*

Los resultados de este trabajo de tesis se encuentran parcialmente publicados en:

1. Metformin improves ovarian insulin signaling alterations caused by fetal programming. Journal of Endocrinology. **2019** Jan; doi: 10.1530/JOE-18-0520.
María F. Heber, Silvana R. Ferreira, **Giselle A. Abruzzese**, T. Raíces, Omar Pedro Pignataro, Margarita Vega, Alicia B. Motta.
2. Lipid Accumulation Product (LAP) and Visceral Adiposity Index (VAI) as Markers of Insulin Resistance and Metabolic Associated Disturbances in Young Argentine Women with Polycystic Ovary Syndrome. Hormones and Metabolic Research. **2017** Jan;49(1):23-29. doi: 10.1055/s-0042-113463
Giselle A. Abruzzese, Gloria E. Cerrone, Juan Gamez, Mabel N. Graffigna, Susana Belli, Eduardo Mormandi, Patricia Otero, Oscar Levalle, Alicia B. Motta.
3. Prenatal hyperandrogenism induces alterations that affect liver lipid metabolism. Journal of Endocrinology. **2016** Jul;230(1):67-79. doi: 10.1530/JOE-15-0471.
Giselle A. Abruzzese, Maria F. Heber, Silvana R. Ferreira, Leandro M. Velez, Roxana Reynoso, Omar P. Pignataro, Alicia B. Motta

Contenido

Abreviaturas utilizadas.....	1
I. Introducción.....	6
Síndrome de ovario poliquístico	7
Alteraciones metabólicas y riesgo cardiovascular asociado a SOP	10
Programación del desarrollo.....	12
Rol de los andrógenos en hembras y mujeres y su acción en la programación del desarrollo	13
Programación del desarrollo por exceso androgénico: modelos animales de SOP	16
Hiperandrogenización prenatal en roedores: modelo para el estudio de SOP	18
Regulación metabólica: el rol del hígado y su relación con alteraciones metabólicas asociadas a hiperandrogenismo y SOP	21
Lipogénesis hepática	22
SOP y su relación con el hígado graso	24
Funcionalidad ovárica	26
Foliculogénesis.....	26
Esteroidogénesis.....	29
Sensores energéticos y regulación de las funciones reproductivas	32
Los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs): el rol de PPARg en la funcionalidad ovárica	32
Las adipoquinas: el caso de quemerina.....	35
II. Hipótesis de trabajo y objetivos.....	39
Hipótesis	40
Objetivo general	40
Objetivos específicos	40
III. Metodología.....	41
A-Modelo Animal.....	42
Establecimiento de la regularidad del ciclo estral.....	44
Obtención de Tejidos.....	46
Estudios histológicos	46
Cuantificación de lípidos hepáticos por técnica de SUDAN IV	47
Determinación de RNA mensajero en tejidos	48

Determinación de niveles proteicos en tejidos	52
Análisis de parámetros relacionados con el balance oxidativo en tejido hepático	54
Análisis de interacción proteica por co-IP	55
Determinación de colesterol y ésteres de colesterol en ovario	56
Determinación de triglicéridos en hígado	57
Determinaciones séricas.....	57
Determinación del perfil lipídico	60
Análisis estadístico.....	62
B- Estudios en población de pacientes con SOP local	63
Reclutamiento y selección de pacientes y población control	63
Fenotipificación clínica	64
Determinación de marcadores de riesgo cardiovascular (RCV) y establecimiento de valores de corte.....	65
Determinación de quemerina sérica	67
Análisis estadístico.....	67
IV. Capítulo 1: Efectos de la hiperandrogenización prenatal: caracterización de las camadas y efectos sobre el balance metabólico.	69
Resultados	70
Parámetros por camada	70
Curva de ganancia de peso o crecimiento.....	72
Perfil metabólico	73
Comienzo de la adultez (60 días).....	73
Perfil lipídico	73
Marcadores de daño hepático.....	75
Mediadores de la vía lipogénica hepática a 60 días	79
Etapa adulta (90 días)	81
Perfil metabólico.....	81
Marcadores de daño hepático.....	82
Mediadores de la vía lipogénica hepática a 90 días	84
Discusión.....	86
Resumen visual del capítulo 1	91
V. Capítulo 2: Efectos de la hiperandrogenización prenatal sobre la funcionalidad ovárica en la transición a la edad adulta (60 días).	93

Resultados	94
Evaluación histológica y morfológica del ovario	94
Evaluación de los niveles de hormonas circulantes	97
Esteroidogénesis ovárica	99
Sensores metabólico-energéticos reguladores de la esteroidogénesis	100
Discusión.....	104
Resumen visual del capítulo 2	111
 VI. Capítulo 3: Efectos de la hiperandrogenización prenatal sobre la regulación de la esteroidogénesis ovárica en edad adulta.	112
Resultados	113
Evaluación de los niveles de hormonas circulantes	113
Morfología ovárica	115
Mediadores del tráfico de colesterol en el ovario.....	116
Esteroidogénesis ovárica	118
Discusión.....	120
Resumen visual del capítulo 3	124
 VII. Capítulo 4: Efectos de la hiperandrogenización prenatal sobre el sistema de sensores energéticos PPAR γ y quemerina en edad adulta.	125
Resultados	126
Expresión de PPAR γ y su co-activador, PGC1 α	126
Formación del complejo PPAR γ /PGC1 α	128
Expresión de Quemerina y su receptor, CMKLR1.....	128
Discusión.....	130
Resumen visual del capítulo 4	134
 VIII. Capítulo 5: Alteraciones metabólicas y quemerina como biomarcador en una población local de mujeres con SOP.	135
Resultados	136
Caracterización metabólica de una población local de SOP y determinación de LAP y VAI como posibles marcadores de RCV	136
Quemerina como marcador de riesgo metabólico	143
Discusión.....	146
 IX. Conclusiones	152

Parte A: modelo animal de hiperandrogenización prenatal.....	153
Resumen visual final parte A	155
Parte B: estudio de alteraciones metabólicas en una población local de pacientes con SOP	156
Resumen visual final parte B	157
X. Referencias.....	158

Abreviaturas utilizadas

15d-PGJ2	15-Deoxi 12,14 Prostaglandina J2
15-HETE	15 Hidroxieicosatetraenoico
17BHS	17-Beta-Hidroxiesteroide Deshidrogenasa
3BHS	3-Beta-Hidroxiesteroide Deshidrogenasa
3TC	3 Tipos celulares
ACAT1	Enzima acetil-Coenzima A acetiltransferasa-1
ACC1	Acetil-CoA Carboxilasa 1
ACC2	Acetil-CoA-Carboxilasa 2
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ALT	Alanina aminotransferasa
ANOVA	Análisis de la varianza
AMPK	Proteína quinasa activada por adenina de monofosfato
AR	Receptor de andrógenos
ARN	Ácido ribonucleico
AST	Aspartato animotransferasa
ATP III	Panel III del tratamiento adulto
CC	Circunferencia de cintura
CCRL2	Receptor similar a la c-c quimiocina 2

CG	Célula de la granulosa
ChREBP	Factor de transcripción de respuesta a carbohidratos
CL	Cuerpo lúteo
CMKLR1	Receptor de quimiocina 1
CT	Célula de la teca
Ct	Ciclo umbral
CT	Colesterol total
CYP17A1	Enzima Citocromo P450 17A1
CYP19A1	Aromatasa
DBD	Dominio de unión a ADN
D.E.	Desvío estándar
DHEA	Dihidroepiandrostenediona
DHT	Dihidrotestosterona
DNTP	Desoxitibonucleotidos
DOHaD	Orígenes del desarrollo de la salud y enfermedad
DTNB	5,5-Ditiobis-2 nitro benzoico
E2	17-B-estradiol
ECV	Enfermedades cardiovasculares
EHGNA	Enfermedad de hígado graso no alcohólico
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
EtOH	Etanol

F Pa	Folículo preantral
FA	Folículo antral
FAS	Ácido graso sintasa
FSH	Hormona folículo estimulante
FSH-R	Receptor de FSH
GGT	Gama glutamil transpeptidasa
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas
GPR1	Receptor acoplado a proteína G 1
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación
GSSG	Glutación oxidado
GWAS	Estudio de asociación genómica
HA	Fenotipo hiperandrogénico
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HMGCR	3-Hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima a reductasa
HOMA-IR	Índice homeostático de insulino resistencia
HP	Hiperandrogenizado prenatalmente
IMC	Índice de masa corporal
IR	Insulino resistencia
LAP	Producto de acumulación lipídica
LBD-Dim	Dominio de unión a ligando y dimerización

LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDL-R	Receptor de LDL
LH	Hormona luteinizante
LH-R	Receptor de LH
MAPK	Proteína quinasa mitogénica activada
MDA	Malondialdehído
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NCoR	Co-Represor de receptores nucleares
NHA	Fenotipo normoandrogénico
P4	Progesterona
PAD	Presión arterial diastólica
PAS	Presión arterial sistólica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGC1a	Co-activador de Pparg 1-alfa
PPAR	Receptor activado por proliferadores peroxisomales
PPARg	Receptor activado por proliferadores peroxisomales gama
PPRE	Secuencia de respuesta a los PPARs
PSMB2	Subunidad beta 2 del proteasoma
Q	Quiste
RCV	Riesgo cardiovascular
RIA	Radioinmunoensayo

RPL32	Proteína ribosomal L32
RXR	Receptor X retinoide
SCD1	Esteaoril-coA desaturasa 1
SHBG	Globulina transportadora de hormonas sexuales
SM	Síndrome metabólico
SOP	Síndrome de ovario poliquístico
SR-B1	Receptor scavenger 1
Srebp	Proteína de unión a elemento regulador de esteroides
StAR	Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda
T	Testosterona
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARs	Especies reactivas de TBA
TCA	Ácido tricloroacético
TG	Triglicéridos
TNB	5-Tio-2 nitro benzoato
TZDs	Tiazoldinenionas
VAI	Índice de adiposidad visceral
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo

I. Introducción

I.Introducción

Síndrome de ovario poliquístico

El Síndrome de ovario poliquístico (SOP) es una patología heterogénea que afecta a mujeres jóvenes, en edad reproductiva, conduciendo a alteraciones endócrinas, tanto desde el punto de vista reproductivo como metabólico (Franks, 1995). La heterogeneidad de la patología condujo a la necesidad de establecer consensos internacionales para aunar criterios de diagnóstico y tratamiento. Existen tres criterios diferentes: *National Institute of Child Health and Human Disease* (NIH) (1990) (Azziz, 2005), Rotterdam (*European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) y *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM)) (2003) (Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group, 2004) y *Androgen Excess and PCOS Society* (2006)(Azziz et al., 2006). Los cuales en conjunto toman como pacientes con SOP aquellas que presentan señales de hiperandrogenismo clínico (alopecia androgénica, hirsutismo, acné) y/o bioquímico (alteraciones en los niveles de andrógenos circulantes, siendo el principal marcador la testosterona) y alteraciones ováricas. El criterio de Rotterdam es el más inclusivo considerando que el diagnóstico se establece en aquellas mujeres que presenten al menos dos de los siguientes parámetros (Azziz, 2004; Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group, 2004):

- oligo- o anovulación (ciclos menstruales mayores a 35 días o amenorrea);
- hiperandrogenismo clínico o bioquímico;
- ovarios poliquísticos por ecografía (volumen ovárico mayor o igual a 10 cm³ y/o al menos un ovario con 12 o más folículos de 2 a 9 mm de diámetro).

De acuerdo a la combinación de dichos parámetros, se pueden observar 4 fenotipos distintos de pacientes con SOP (Fig. 1.1), existiendo la posibilidad de una manifestación del síndrome en ausencia de hiperandrogenismo, fenotipo normoandrogénico (NHA), siempre y cuando se presente disfunción ovulatoria y morfología de ovarios poliquísticos. Este fenotipo queda contemplado sólo bajo el diagnóstico por el criterio de Rotterdam (2003), ya que los otros consensos exigen la presencia de hiperandrogenismo para el diagnóstico de SOP.

El síndrome presenta una alta incidencia, que varía alrededor de entre 5 y 20 % dependiendo del criterio utilizado de mujeres que padecen SOP (Sirmans y Pate, 2013). La

aparición de SOP se encuentra frecuentemente asociada con diversos trastornos metabólicos que se manifiestan en las pacientes desde edades tempranas, como son: hiperinsulinemia, síndrome de insulino resistencia (IR), riesgo cardiovascular (RCV) incrementado, desbalance en el metabolismo lipídico y diabetes tipo 2 (Franks, 1995; Asunción et al., 2000; Abbott et al., 2002). Es por ello que es importante su correcto diagnóstico así como también el establecimiento del riesgo metabólico asociado en las mujeres con SOP.

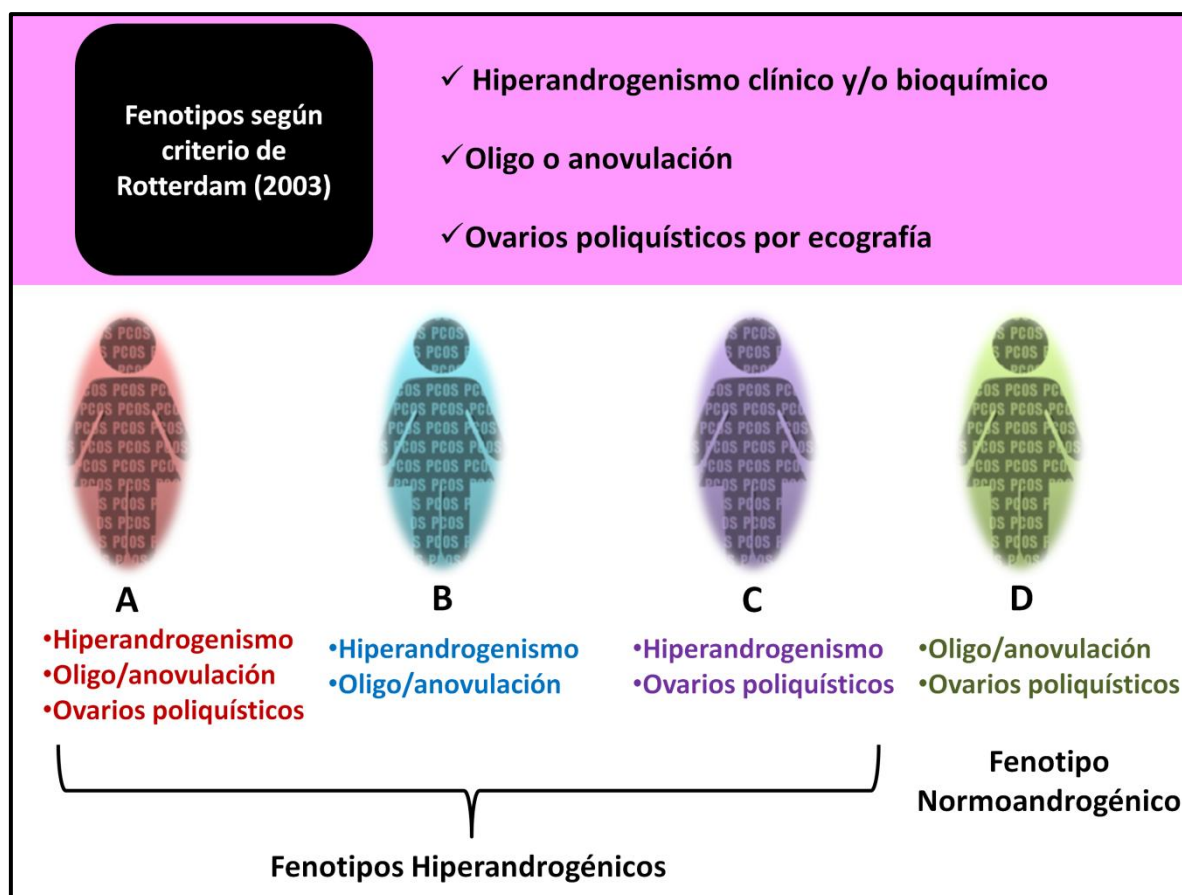


Figura 1. 1: Fenotipos SOP establecidos según el criterio de Rotterdam (2003).

Por otro lado, desde el punto de vista reproductivo, SOP es una de las principales causas de sub-fertilidad e infertilidad femenina, presente entre un 70 a 80% de las pacientes (Melo et al., 2015). Entre las manifestaciones reproductivas y obstétricas se incluyen además complicaciones del embarazo, alta incidencia de abortos, preeclampsia y diabetes gestacional (Boomsma et al., 2006; Kjerulff et al., 2011).

Las mujeres con SOP presentan un alto número de folículos arrestados en estadios tempranos y medios del desarrollo, ó sea, fallan en continuar con su maduración folicular

(Hsueh, 1986; Erickson et al., 1992; Mason et al., 1994). Este arresto folicular impide la selección de un folículo dominante. Sin un folículo dominante, capaz de liberar al oocito en respuesta al incremento de hormona luteinizante (LH), no se produce la ovulación ni el proceso normal 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 (Franks et al. 2008). Dadas estas alteraciones en el desarrollo folicular y debido a los desórdenes hormonales presentes (principalmente al hiperandrogenismo), un gran porcentaje de estas pacientes requieren de tratamientos de reproducción asistida. Se ha demostrado que las mujeres con SOP constituyen alrededor de un 90% de las consultantes en clínicas de reproducción asistidas por infertilidad asociada a anovulación (Kjøtrød et al., 2011). Si bien, en general, son buenas respondedoras a las terapias hormonales típicas de dichos tratamientos y aunque se logra el reclutamiento de oocitos, de igual forma, suelen tener problemas en cuanto a la mala calidad o alteraciones de los oocitos reclutados, en los embriones formados y asimismo fallas posteriores en el embarazo (Liu et al., 2019).

Actualmente se postula que la etiología de SOP es multifactorial (Fig. 1.2) (Filippou y Homburg, 2017). Entra las causas, en los últimos años, se ha enfatizado la posibilidad de un origen intrauterino, durante la gestación y dado por programación fetal por un exceso de andrógenos (Abbott et al., 2002). Asimismo se sabe que habría una predisposición génica (considerándose SOP una patología de base multigénica) y contribuirían también al desarrollo de SOP el estilo de vida, la alimentación y la contaminación ambiental (Franks, 1995; Filippou y Homburg, 2017).

En los últimos años se han realizado varios estudios de asociación genómica (GWAS, por sus siglas en inglés: *Genome Wide Association Study*) (Chen et al., 2011; Shi et al., 2012; Hayes et al., 2015) en los cuales se han establecido diversos genes candidatos para SOP. Dichos genes sólo explican parte de la heredabilidad del síndrome, lo que ha llevado a destacar la importancia de los roles del ambiente y de la contribución epigenética al desarrollo de SOP. Sumado a estos hallazgos, Abbott y colaboradores (2017) han demostrado recientemente la existencia de una población natural de monos hiperandrogénicos que presentan características tipo SOP (Abbott et al., 2017). Esto sugiere que el síndrome podría tener un origen ancestral entre humanos y monos rhesus (*Macaca mulatta*) y que las características de SOP pueden afectar, naturalmente, a otras especies más allá de los humanos, asimismo resaltan la importancia de los andrógenos en la biología femenina. Asimismo, en condiciones de laboratorio se ha demostrado que la exposición gestacional de hembras a andrógenos induce

características tipo SOP neuroendocrinas, metabólicas y reproductivas en la vida adulta (Abbott et al., 2017). Todos estos resultados en conjunto, sumado al hecho de que rhesus comparte con humanos alrededor de un 90% del genoma, son consistentes con la hipótesis que SOP no solo está determinado por componentes genéticos sino también por componentes epigenéticos, donde los andrógenos durante el desarrollo jugarían un papel importante.

Por lo que, en resumen, se postula que la combinación de todos estos factores contribuyen a la manifestación del síndrome en sus diversos fenotipos y, a la aparición de las patologías asociadas al mismo (diabetes, IR, síndrome metabólico, riesgo cardiovascular, entre otras).

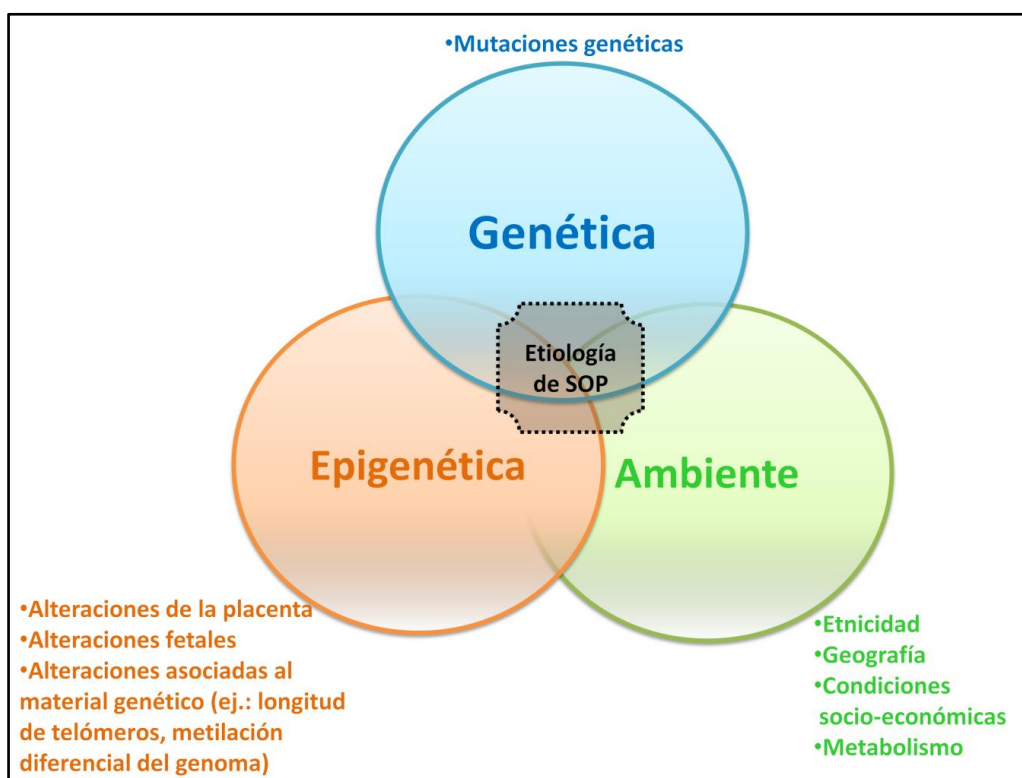


Figura 1.2: factores contribuyentes a la etiología y desarrollo de SOP

Alteraciones metabólicas y riesgo cardiovascular asociado a SOP

SOP está asociado a distintas alteraciones metabólicas, como hemos mencionado anteriormente. Entre ellas, la IR es una de las principales, estando presente en un 50% a 70% en pacientes con SOP (Dunaif, 1997; Sirmans y Pate, 2013) independientemente de si las mismas presentan, o no, obesidad. Asimismo, también se ha demostrado que las pacientes con SOP presentan un mayor índice de prevalencia de síndrome metabólico (SM) (Moran et al., 2010) y alrededor de un 30% de las pacientes presentan una tolerancia a la glucosa alterada,

mientras que, alrededor de un 10% presentan diabetes tipo 2 (Ehrmann et al., 1999; Legro et al., 1999; Moran et al., 2010; Sirmans y Pate, 2013). Sumado a todas estas alteraciones metabólicas, entre un 50% a un 80% de las pacientes con SOP (dependiendo de la población de estudio) presentan sobrepeso u obesidad (Torchen, 2017), la cual se sabe que contribuye a las alteraciones metabólicas antes descriptas.

En conjunto, todas estas alteraciones conllevan a un riesgo cardiovascular incrementado (Fig. 1.3), llevando a las pacientes con SOP a ser consideradas entonces, como población con alto riesgo de alteraciones metabólicas (Cussons et al., 2008).

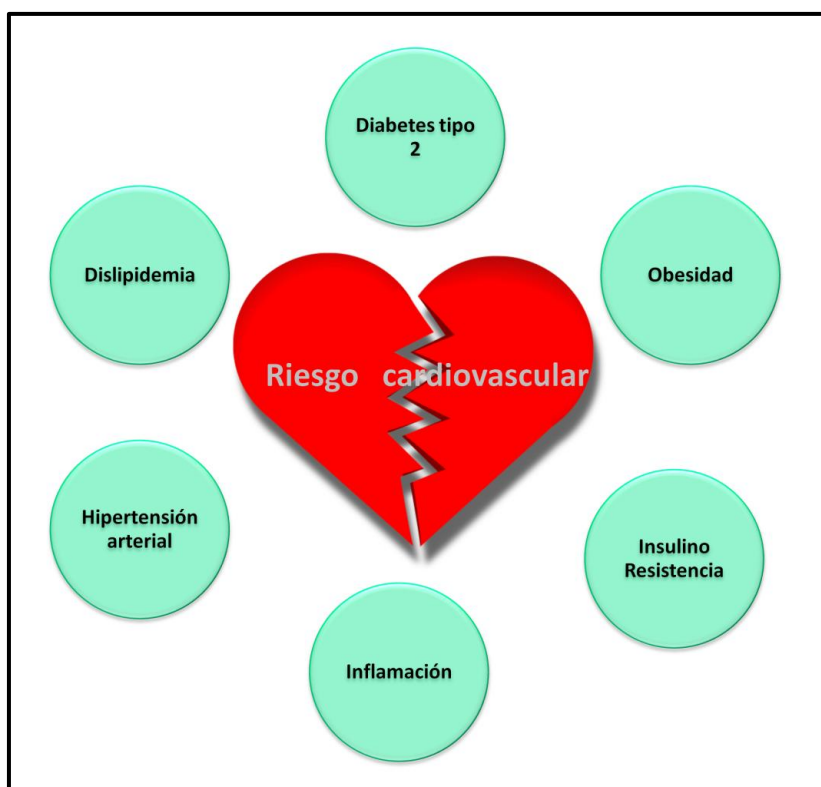


Figura 1.3: Factores de riesgo cardiovascular presentes en pacientes con SOP.

En América del Sur las enfermedades cardiovasculares y las patologías metabólicas son consideradas una de las principales causas de muerte (Rubinstein et al., 2015). En este contexto, es importante el estudio de SOP en el cono Sur de América ya que estas pacientes presentan incluso en edades tempranas un alto riesgo cardiovascular y de patologías asociadas. Sin embargo, existen pocos estudios de SOP en esta región. Asimismo, teniendo en cuenta que el trasfondo genético (*genetic background*), la etnicidad y factores ambientales contribuyen al desarrollo de SOP, es importante tener en cuenta dichos factores a la hora de abordar estudios en poblaciones heterogéneas, de diversidad étnica y con complejas estructuras sociales y económicas, como son las latinoamericanas.

En particular, es de destacar que, incluso dentro de América del Sur, cada población puede presentar distintos riesgos metabólicos dados por diferentes factores. En cuanto a esto, Ladrón de Guevara y colaboradores (2014) realizaron un estudio comparativo entre dos poblaciones de pacientes con SOP, una chilena y otra argentina de la provincia de Córdoba. Dicho estudio demostró que las alteraciones metabólicas y componentes del síndrome metabólico que presentan dichas poblaciones es diferente estando afectado no sólo por la particular composición genética y étnica de las poblaciones, sino también por cuestiones económicas y de estado nutricional. Estos resultados resaltan así la importancia de poder conocer y estudiar las poblaciones locales con el fin de poder prevenir alteraciones metabólicas en patologías complejas como es SOP.

Programación del desarrollo

Ciertas etapas del desarrollo actúan como ventanas de susceptibilidad, en las cuales el ambiente tiene un gran efecto e influencia sobre los organismos en desarrollo y puede actuar provocando cambios y condicionando la vida adulta y el estado de salud (Lucas, 1991).

El concepto de programación del desarrollo refiere a procesos en los cuales diferentes estímulos o insultos inducen cambios permanentes en la estructura y función de los organismos en desarrollo. Estos pueden deberse a cambios epigenéticos, adaptaciones fisiológicas o cambios estables en la expresión de los genes (Barouki et al., 2012; Cruz et al., 2014; Saffery y Novakovic, 2014) teniendo en cuenta la noción de plasticidad del desarrollo (fenómeno que permite a un organismo que se está desarrollando cambiar su estructura y funciones en respuesta a efectos ambientales). En base a lo anterior es que surge la hipótesis de "Orígenes del desarrollo de la salud y enfermedad" (DOHaD, por sus siglas en inglés: *Developmental Origins of Health and Disease*). Dicha hipótesis está basada tanto en modelos animales como en evidencia epidemiológica de patologías multifactoriales y complejas como la obesidad, la diabetes, SOP, y los desórdenes neuronales (Gluckman et al., 2010); y describe cómo experiencias en la vida temprana influyen el desarrollo y la salud y el riesgo de presentar enfermedades en la vida adulta (Hanson y Gluckman, 2014). La idea de programación fue propuesta por Lucas (1991) y adquirió un gran desarrollo con Barker (Barker, 1995, 2007), siendo también conocida como "hipótesis de Barker". Este desarrollo surge luego de la emergencia de estudios epidemiológicos de la hambruna holandesa entre los años 1944 y 1945, que mostraron que la malnutrición materna durante la gestación correlaciona con un aumento en el riesgo cardiovascular y la aparición de enfermedades metabólicas en la

progenie (Almond y Currie, 2011). Hoy en día se conoce que las ventanas de susceptibilidad exceden a la vida prenatal e involucran también las primeras etapas de vida y, que diferentes factores como son: el estilo de vida, la dieta, los contaminantes ambientales, las intervenciones médicas y farmacéuticas y las hormonas, entre otros, pueden afectar a los organismos alterando su desarrollo (Hanson y Gluckman, 2014) (Figura 1.3).

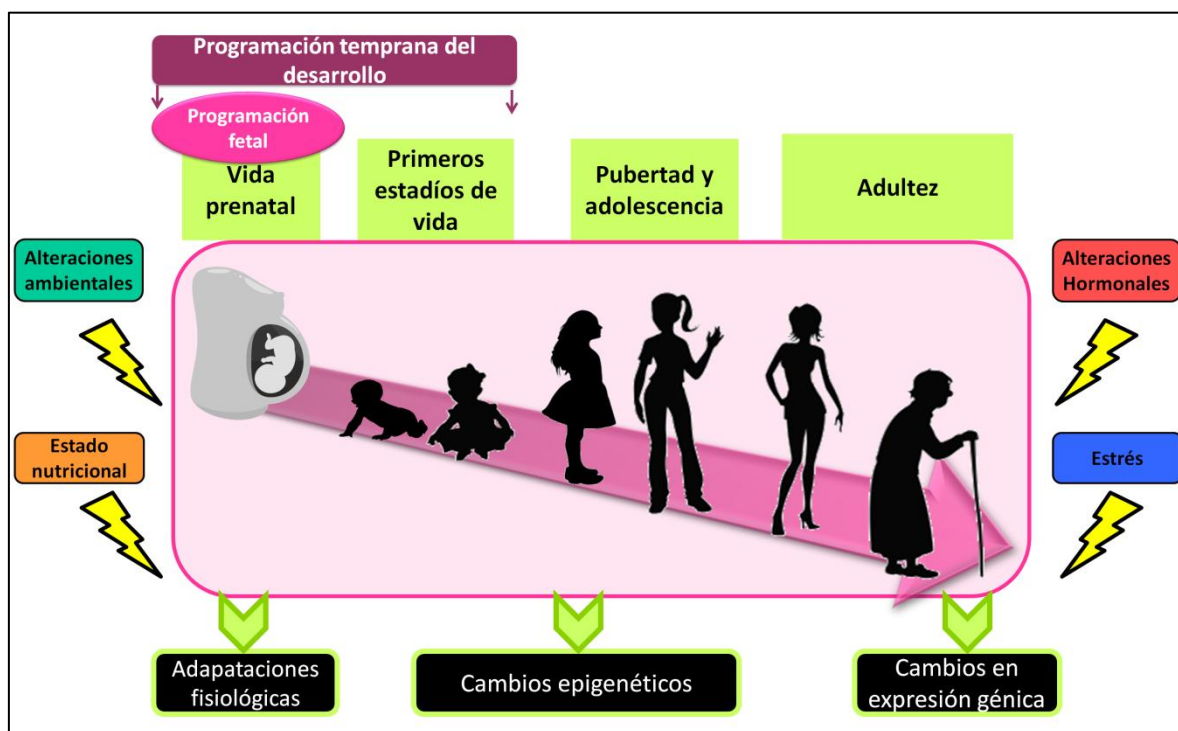


Figura 1.3: Ventanas de susceptibilidad de programación temprana del desarrollo en mujeres. Modificada de Abruzzese et al. 2018 (Abruzzese et al., 2018).

Rol de los andrógenos en hembras y mujeres y su acción en la programación del desarrollo

Como mencionamos anteriormente, un desbalance hormonal durante las primeras etapas de vida puede inducir programación. En particular, los esteroides son moléculas lipofílicas que participan en la regulación y establecimiento del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal en el caso de los esteroides gonadales como son la testosterona (T), el 17-B-estradiol (E_2) y el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, en el caso de los glucocorticoides. Debido al carácter lipofílico de estos compuestos, la mayoría puede cruzar tanto la barrera hematoencefálica como la placenta durante la vida prenatal (Abramovich y Wade, 1969). Los esteroides gonadales y los glucocorticoides son derivados del colesterol y sintetizados principalmente por las gónadas y glándulas adrenales durante la gestación y también por la unidad feto placentaria.

La T es el principal andrógeno, la cual ejerce sus acciones principalmente vía el receptor de andrógenos (AR, por sus siglas en inglés), pero así mismo también tiene efectos biológicos mediante sus metabolitos activos como son el E2 (producto de la acción de la enzima aromatasa CYP19A1) y la dihidrotestosterona (DHT) (producto de la acción de la enzima 5-alfa-reductasa). La DHT puede unirse también al AR, teniendo una acción aún más potente que la testosterona; el E2 actúa mediante sus propios receptores estrogénicos (Sotomayor-Zarate et al., 2014). En mujeres y hembras de distintas especies, los andrógenos son producidos en los ovarios y en las glándulas adrenales. Los andrógenos más importantes son la Testosterona y la androstenediona, pero también se produce dehidroepiandrostenediona (DHEA) y DHEA-sulfato, los cuales son andrógenos más débiles en su acción (Davison y Davis, 2003).

En hembras de distintas especies y en mujeres, los andrógenos juegan un rol importante en la regulación de la fertilidad y otras funciones. Si bien se ha considerado que los mismos pueden tener una función perjudicial o dispensable en la foliculogénesis normal y en las funciones ováricas, en los últimos años se ha demostrado que pueden tener efectos positivos (Pan et al., 2015). En la vida post-natal los andrógenos juegan un rol esencial en la reproducción femenina, no sólo como precursores de estrógenos sino también por sus roles claves en el desarrollo folicular (Lebbe y Woodruff, 2013). Sin embargo, alteraciones en los niveles de andrógenos están asociados a distintos estados patológicos como son SOP, cáncer de endometrio y endometriosis (Simitsidellis et al., 2018).

La testosterona es importante en el desarrollo del cerebro de mamíferos (Hines, 2006). Si bien los niveles de testosterona en hembras durante la vida fetal son mayores que en adultas, siempre los niveles de testosterona de fetos machos son mayores que los de hembras durante el desarrollo temprano (Foecking et al., 2008). Los andrógenos juegan un papel importante en la vida prenatal y en el periodo perinatal, siendo fundamentales no solo para el desarrollo del cerebro, sino también en la diferenciación sexual, pudiendo afectar el crecimiento y diferenciación de diversos tejidos (Brooks, 1975; Foecking et al., 2008; Arnold, 2009). Ambos sexos biológicos expresan AR, pero durante el desarrollo existe una ausencia de andrógenos en hembras que llevan a la formación y desarrollo de características genitales femeninas (Hiort, 2013). Es importante destacar que, si bien los andrógenos, y otras hormonas, pueden actuar directamente por vía genómica, también pueden hacerlo indirectamente, modificando el desarrollo placentario, el metabolismo fetal y la producción de factores de crecimiento y de otras hormonas por la unidad feto-placentaria (Fowden, 2003; Fowden y Forhead, 2004).

Durante la vida prenatal, las hormonas presentes en la circulación fetal varían con el desarrollo y en respuesta a estímulos nutricionales y ambientales. Dichas hormonas pueden tener cuatro orígenes distintos: a) podrían ser secretadas por las propias glándulas fetales; b) derivarían de los tejidos útero-placentarios que son secretados tanto a la circulación umbilical como a la circulación uterina; c) pasarían desde la madre por difusión transplacentaria, estando reguladas por la permeabilidad de la barrera placentaria (la cual es especie-dependiente) y del gradiente materno-fetal; d) derivarían de precursores que son metabolizados en el feto o en la placenta (Sibley et al., 1997).

En 1959, Phoenix y colaboradores (Phoenix et al., 1959) mostraron que el tratamiento prenatal de cobayos hembras (*Cavia porcellus*) con T tenía efectos a largo plazo tanto en el comportamiento como en ciertas características reproductivas. Asimismo la exposición prenatal a T de hembras empezó a relacionarse a distintas alteraciones, entre ellas SOP. A partir de ese momento, diferentes estudios en animales han mostrado que durante la etapa embrionaria tardía y la perinatal existe una ventana de susceptibilidad a andrógenos que pueden afectar las funciones de los órganos sexuales, la estructura cerebral y el comportamiento. También se ha visto que la pubertad es otra ventana susceptible a la acción de andrógenos (aunque también de estrógenos) que pueden modificar la composición del cuerpo afectando el desarrollo muscular, pero sin afectar a los genitales (Hiort, 2013).

Los primeros indicios clínicos que vincularon un posible rol de una exposición excesiva de andrógenos en la vida fetal que llevaba al desarrollo de SOP derivaron de observaciones en mujeres con hiperplasia adrenal congénita con déficit de la 21-hidroxilasa. Dichas pacientes si bien fueron adecuadamente tratadas y por ende presentaron una normalización de sus andrógenos, durante su vida adulta, desarrollaron rasgos típicos del SOP tales como: anovulación, hipersecreción de LH, resistencia a la insulina y aspecto poliquístico de los ovarios (Barnes et al., 1994). Esto llevó a proponer que el exceso de andrógenos durante la vida fetal, ya sea de origen ovárico o adrenal, podría constituir un "insulto" hormonal que llevaría al desarrollo del SOP en la vida postnatal. Estudios recientes han mostrado que madres con SOP (que presentan hiperandrogenemia) pueden dar a luz niños y niñas que muestran tanto alteraciones reproductivas como metabólicas (Sir-Petermann et al., 2006; Maliqueo et al., 2009; Crisosto et al., 2017). Sin embargo, alteraciones reproductivas se han demostrado, hasta el momento, sólo en hijas de mujeres con SOP, quienes presentan exceso de folículos, altos niveles de LH y de T al fin de la pubertad (Sir-Petermann et al., 2009). Más aún, en un estudio controlado en el que madres con SOP son tratadas con metformina (un antihiper glucemiante) durante el embarazo y otro grupo no, se ha visto que las pacientes tratadas mejoran su perfil

hormonal y los parámetros metabólicos durante su embarazo. Además sus hijas no presentan los marcadores asociados a alteraciones ováricas por programación que sí se observan en el grupo de embarazadas con SOP no tratado (Crisosto et al., 2012). La noción de programación en SOP ha llevado no sólo a su abordaje desde el estudio de diversos modelos animales, sino que ha puesto en relevancia el rol de los andrógenos en el desarrollo, y también ha contribuido a que se realice un mayor cuidado y seguimiento de los embarazos de estas mujeres, con el fin de prevenir la perpetuación del síndrome y sus alteraciones asociadas.

Es importante entonces resaltar que los andrógenos pueden, o no, tener efectos negativos sobre las mujeres y hembras, lo que depende del momento de su síntesis y de los niveles de los mismos. Es por ello que la regulación de la síntesis de andrógenos y su señalización está estrictamente regulada durante el desarrollo (y a lo largo de la vida) y, que alteraciones en los niveles androgénicos durante la vida prenatal y perinatal pueden conducir a consecuencias a largo plazo afectando el metabolismo y la reproducción.

Programación del desarrollo por exceso androgénico: modelos animales de SOP

Diversos modelos animales han mostrado que el tratamiento prenatal de andrógenos conlleva al desarrollo de características tipo SOP. En la mayoría, el último periodo de la preñez parecería ser el más importante como ventana susceptible de programación por andrógenos (Figura 1.4). La exposición a andrógenos prenatales puede conducir a la formación de características de ovarios poliquísticos en ratas (Demissie et al., 2008; Amalfi et al., 2012; Heber et al., 2013), ratones (Sullivan y Moenter, 2004), monos (Eisner et al., 2000; Abbott et al., 2009) y ovejas (Manikkam et al., 2006). La programación fetal generada por exposición prenatal a andrógenos también está asociada a hiperinsulinemia, dislipidemia, insulino resistencia, síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares, todas características que se encuentran con alta incidencia en mujeres con SOP (Demissie et al., 2008; Roland et al., 2010; Heber et al., 2013). El hiperandrogenismo lleva a cambios reproductivos en las hembras durante la vida puberal y adulta, causando alteraciones en el desarrollo folicular, en la esteroidogénesis ovárica, en las funciones uterinas y en el comportamiento. Asimismo, el exceso de andrógenos lleva también a alteraciones metabólicas y afecta al hígado, al tejido adiposo y otros tejidos y órganos (Demissie et al., 2008; Sotomayor-Zárate et al., 2011; Amalfi et al., 2012; Veiga-Lopez et al., 2013, 2016; Yan et al., 2013) .

El hecho de que diversos modelos animales no repliquen correctamente todas las características de SOP humano hace difícil entender la patogenia del mismo. Al día de hoy no existiría un modelo por excelencia de SOP. Por ello, los diversos modelos animales colaboran en la comprensión de diferentes aspectos del síndrome.

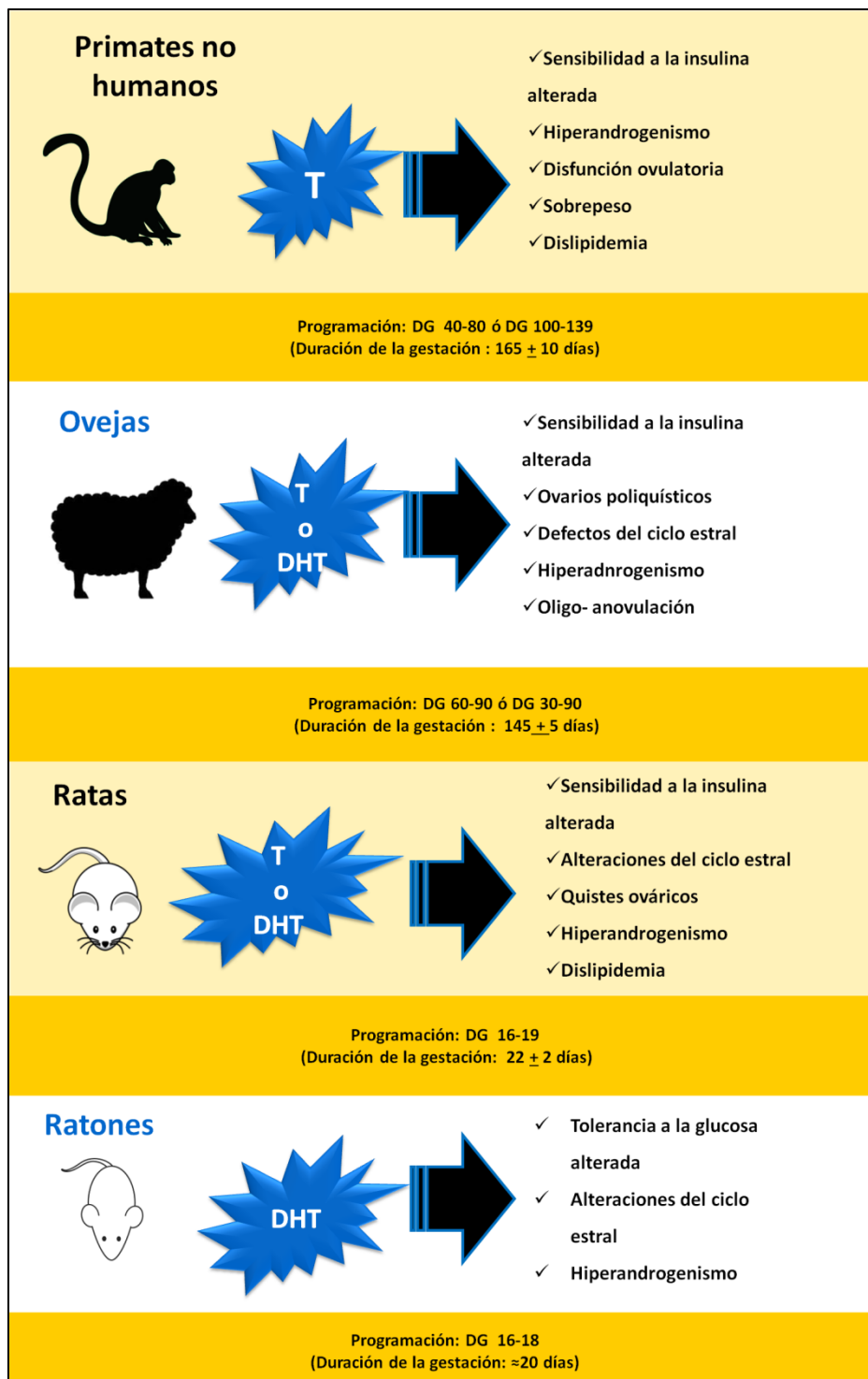


Figura 1.4: modelos de programación fetal por andrógenos que inducen características tipo SOP (modificado de (Abruzzese et al., 2018)).

Hiperandrogenización prenatal en roedores: modelo para el estudio de SOP

Si bien el modelo de primates no humanos es el más aceptado, por su alta similitud a humanos, otros modelos se han desarrollado para el estudio de SOP y las consecuencias del androgenismo prenatal, debido a las problemáticas que involucran el cuidado de monos para el trabajo en condiciones experimentales.

Los modelos en roedores para el estudio de patologías multifactoriales, como SOP, son preferibles respecto de otros modelos, debido a que tienen un trasfondo genético (*genetic background*) estable, son fáciles de manipular y mantener, presentan ciclos reproductivos y de vida cortos (Tehrani et al., 2014). Debido a estas características permiten, además, estudiar los efectos a largo plazo, de la programación fetal, incluso por varias generaciones.

En roedores, no sólo se han desarrollado modelos de SOP por programación prenatal, sino también por programación perinatal (Walters et al., 2012). Asimismo, se han desarrollado modelos en donde la inducción de SOP hormonal ocurre en etapas puberales y prepuberales (Motta, 2010; Walters et al., 2012; Cornejo et al., 2016; Paixão et al., 2017). Sin embargo, los modelos prenatales, debido a que inducen cambios y alteraciones durante la diferenciación y maduración de los tejidos y órganos, llevan a alteraciones a largo plazo e incluso permanentes (Abbott et al., 2007; Padmanabhan et al., 2014), por lo que en los últimos años se ha focalizado el estudio en dichos modelos.

Si bien varios de los modelos de programación fetal por andrógenos en roedores han podido replicar varias de las características metabólicas y reproductivas de SOP, hay discrepancias entre las características inducidas por los distintos modelos. La diversidad de modelos se debe a las variaciones en la dosis aplicada del andrógeno, en el andrógeno utilizado (usualmente T o DHT) y en el momento de aplicación. La mayoría de los modelos, en que dosis altas de andrógenos son usadas, inducen defeminización, con ausencia de apertura vaginal, e incluso, en ciertos casos, conducen a pseudohermafroditismo (Wolf, 2002; Demissie et al., 2008; Amalfi et al., 2012; Walters et al., 2012; Heber et al., 2013; Tehrani et al., 2014; Yan et al., 2014).

El desarrollo sexual en los mamíferos es producto de diversos procesos: a) la determinación del sexo, b) la diferenciación del sexo y c) la diferenciación sexual del cerebro. Los cromosomas sexuales determinan el sexo cromosómico que mediante una serie de señales (que involucran procesos hormonales, genéticos y celulares) conllevan a la determinación del sexo y establecimiento del sexo fenotípico. La diferenciación de las gónadas ocurre, tanto en humanos como en roedores, en la gestación temprana. La diferenciación sexual sólo puede ocurrir cuando la gónada fetal comienza a secretar hormonas claves durante una ventana temporal crítica de la gestación temprana. No obstante, para que la diferenciación sexual sea completa es necesario que el cerebro de dicho individuo también sea masculino o femenino. Es decir, que se establecen diferencias estructurales y funcionales permanentes en ciertas áreas del cerebro que le permiten el ordenamiento de una cierta identidad sexual en cuanto a las funciones neuroendocrinas y comportamentales (McCarthy y McCarthy, 2011).

Estos mecanismos de feminización o masculinización ocurren durante un período crítico de la gestación tardía (y se extiende en roedores a la vida postnatal temprana) (Fig. 1.5). En los roedores, se han registrado dos picos de testosterona, el primero entre los días gestacionales 16 a 19 (Weisz y Ward, 1980; Foecking et al., 2008; McCarthy y McCarthy, 2011) y el segundo, comienza en las primeras 2 horas luego del nacimiento y se extiende por algunos días en la vida postnatal (Corbier et al., 1978; Foecking et al., 2008). En las hembras, los niveles circulantes de testosterona prenatales y perinatales son mucho menores en comparación a los hallados en los machos (Baum et al., 1991; Hotchkiss et al., 2007). Mientras que en machos, los testículos fetales serían la fuente principal de testosterona, en las hembras no se conoce con certeza cuál es su origen. No existe evidencia de que el ovario en desarrollo pueda ser una fuente de andrógenos y se postula que principalmente tendrían un origen materno-placentario (Baum et al., 1991; Hotchkiss et al., 2007). Sin embargo, también se ha demostrado que los fetos masculinos adyacentes pueden contribuir a los niveles androgénicos de las hembras en desarrollo (Ryan y Vandenberg, 2002; Hotchkiss et al., 2007).

Como mencionamos anteriormente, es en dicha ventana del desarrollo que se determina el cerebro como masculino o femenino. Las diferencias en la secreción de gonadotrofinas se establecen durante la vida fetal y perinatal, siendo la secreción testicular de andrógenos la que modula el cerebro masculino en desarrollo haciéndolo incapaz de producir picos pre-ovulatorios de gonadotrofinas en la adultez. Mientras que, en ausencia de andrógenos, el cerebro femenino en desarrollo adquiere la habilidad de sostener secreciones cíclicas de gonadotrofinas durante la adultez (Foecking et al., 2008). Debido a esto, se

considera que el camino, por defecto, del desarrollo de neuronas que controlan los pulsos de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) es femenino y que la acción prenatal de andrógenos conduciría a una defeminización del cerebro que involucra la acción de los andrógenos durante los días 16 a 19 del desarrollo (Foecking et al., 2008).

Los modelos de programación fetal por andrógenos en roedores, aprovechan dicha ventana del desarrollo, donde se produce el pico de andrógenos que modula el sistema neuroendocrino. Es por ello que, los modelos de androgenización prenatal se basan en la administración de andrógenos entre los días 16 a 19 y utilizan esteroides libres (ya sea testosterona o DHT) debido a la corta vida que presentan y a que son metabolizados rápidamente, pudiendo, de esa forma, limitarse sus efectos a dichos días del desarrollo (James et al., 1969; Foecking et al., 2008).

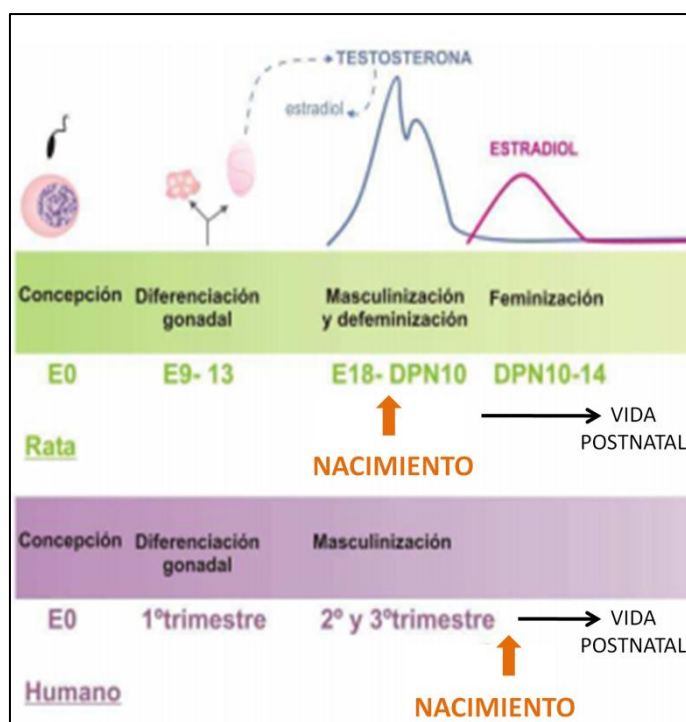


Figura 1.5: Diferenciación sexual en rata y humanos. E= día correspondiente a la vida embrionaria. DPN= día correspondiente a la vida postnatal. Modificado de (McCarthy y McCarthy, 2011).

Regulación metabólica: el rol del hígado y su relación con alteraciones metabólicas asociadas a hiperandrogenismo y SOP

El hígado es un órgano clave en la regulación de diversos procesos metabólicos y actúa como modulador en el balance energético. Es el principal tejido regulador del balance de glucosa, y la lipogénesis hepática se encuentra íntimamente relacionada con su metabolismo, dado que el hígado puede convertir el exceso de hidratos de carbono en reservas lipídicas (Browning y Horton, 2004). Está involucrado en la síntesis, transporte y almacenamiento de lípidos (Paschos y Paletas, 2009).

El funcionamiento del hígado puede ser modificado por otros órganos y sistemas, incluyendo al inmune, inflamatorio, neuronal y endocrino (Macut et al., 2017). En particular, el hígado y el sistema reproductivo interactúan de una forma bidireccional. Por un lado, los esteroides sexuales pueden influenciar el metabolismo y funcionalidad hepática y se sabe que pueden contribuir al desarrollo y establecimiento de desórdenes funcionales y estructurales del hígado. Por otro lado, la funcionalidad hepática repercute en el eje reproductivo, regulando el transporte y la biodisponibilidad de los esteroides sexuales mediante la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG, por sus siglas en inglés: *sex hormone binding globulin*), sintetizada en el hígado (Grossmann et al., 2018). El hígado censa el estado metabólico del organismo y es capaz de adaptar la homeostasis energética de forma sexo-dependiente. Este dimorfismo depende del entorno hormonal, dado por los esteroides sexuales, y posiblemente estaría relacionado al costo metabólico que implica la reproducción (Grossmann et al., 2018).

En los últimos años, se ha despertado un gran interés en el estudio de la funcionalidad hepática en SOP y contextos androgénicos, dado que además de estar asociado al eje reproductivo, las funciones de este tejido involucran la regulación del metabolismo lipídico y de la glucosa, procesos que se encuentran alterados en SOP (Paschos y Paletas, 2009; Vassilatou, 2014).

Lipogénesis hepática

Los ácidos grasos que pueden ser incorporados en los triglicéridos hepáticos provienen de la circulación o son sintetizados a partir de la glucosa, en un proceso llamado "lipogénesis *de novo*" (Kawano y Cohen, 2013). En la lipogénesis *de novo*, el exceso de carbohidratos consumido que excede al almacenamiento de glucógeno hepático, es convertido en ciertos compuestos lipídicos para su almacenamiento (Strable y Ntambi, 2010).

En la lipogénesis *de novo* (Fig. 1.6), la glucosa es convertida a acetil-CoA mediante la glucólisis y la oxidación del piruvato. El Acetil-CoA es, luego convertido a malonil-CoA mediante la acetil-CoA carboxilasa, que presenta dos isoformas distintas (ACC1 y ACC2, codificadas por los genes *Acaca* y *Acacb*, respectivamente). Estas dos isoformas presentan funciones distintas. ACC1 se encuentra en citoplasma, mientras que ACC2 se encuentra en la membrana mitocondrial. Si bien ambas producen malonil-CoA, el destino del mismo depende de la isoforma involucrada en su síntesis. Por un lado, el malonil-CoA producto de ACC1, participa en la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga siendo utilizado por la ácido graso sintasa (FAS, por sus siglas en inglés: *fatty acid synthase*). Por otro lado, el malonil-CoA sintetizado por ACC2 participa en la inhibición de la oxidación de ácidos grasos (Wakil y Abu-Elheiga, 2009). Luego, de la síntesis de malonil-CoA, el mismo es utilizado como sustrato de la enzima FAS que cataliza la formación del ácido palmítico. Este ácido graso, puede ser luego elongado por acción enzimática y desaturado por acción de la esteaoril-CoA desaturasa 1 (SCD1, por sus siglas en inglés: *steaoryl-CoA desaturase 1*), llevando a la formación de ácidos grasos monoinsaturados, que se encuentran entre los principales constituyentes de los triglicéridos hepáticos (Kawano y Cohen, 2013).

La lipogénesis está controlada principalmente a nivel transcripcional (Ferré y Foulfelle, 2010). Tanto la glucosa como la insulina son requeridas para la activación de la lipogénesis. De esta forma, una dieta alta en carbohidratos estimula la vía lipogénica, dado que conlleva a un aumento de glucosa e insulina en plasma. Por el contrario, la inanición inhibe la lipogénesis (Foulfelle y Ferré, 2002; Ferré y Foulfelle, 2010). La glucosa regula transcripcionalmente al factor de transcripción de respuesta a carbohidratos (ChREBP, por sus siglas en inglés: *carbohydrate response element binding protein*), mientras que, la insulina promueve la transcripción del factor de transcripción perteneciente a la familia de proteínas de unión a elementos de regulación por esteroides (SREBP, por sus siglas en inglés: *sterol regulatory element binding protein*). Particularmente a la isoforma 1c (SREBP1c). A su vez, estos factores de transcripción pueden promover la transcripción de los genes de las enzimas de la vía

lipogénica, mencionadas anteriormente (Browning y Horton, 2004; Ferré y Foufelle, 2010; Kawano y Cohen, 2013).

Además de las enzimas lipogénicas y los factores de transcripción mencionados, un tercer factor de transcripción juega un rol importante en la regulación del metabolismo lipídico hepático. Este factor es el receptor activado por proliferadores peroxisomales gama (PPAR γ , por sus siglas en inglés: *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*). PPAR γ es un miembro de la súper familia de receptores nucleares, que en cuanto a sus funciones en el metabolismo lipídico, participa en la diferenciación de los adipocitos, y puede regular numerosos genes adipogénicos y lipogénicos importantes en el almacenamiento de ácidos grasos, en la síntesis de lípidos y en el metabolismo de la glucosa (Smith, 2002; He et al., 2003; Browning y Horton, 2004; Zhang et al., 2016). Este factor no sólo participa en la regulación lipídica, sino que también actúa en la regulación de otros procesos metabólicos y reproductivos, los cuales ampliaremos más adelante.

En condiciones normales, PPAR γ tiene una baja expresión en el hígado (Browning y Horton, 2004). Sin embargo, en modelos animales que presentan resistencia a la insulina y alteraciones en la lipogénesis y con presencia de esteatosis (acumulación de triglicéridos), se ha encontrado que los niveles de PPAR γ están aumentados (Ables, 2012). Por otro lado, se ha demostrado en modelos animales en los que se elimina el gen de PPAR γ en hígado que, en este contexto, se atenúa el desarrollo de esteatosis, independientemente de la presencia de hiperinsulinemia o hiperglicemia (Browning y Horton, 2004; Zhang et al., 2016). Asimismo, se ha demostrado que SREBP1c puede regular a PPAR γ , tanto directamente, a nivel transcripcional, como indirectamente, modulando la producción de un ligando de este factor (Kim et al., 1998; Fajas et al., 1999; Browning y Horton, 2004).

Alteraciones en esta vía, o en sus mediadores, podría llevar al desarrollo de una acumulación lipídica en el hígado y a otros trastornos asociados.

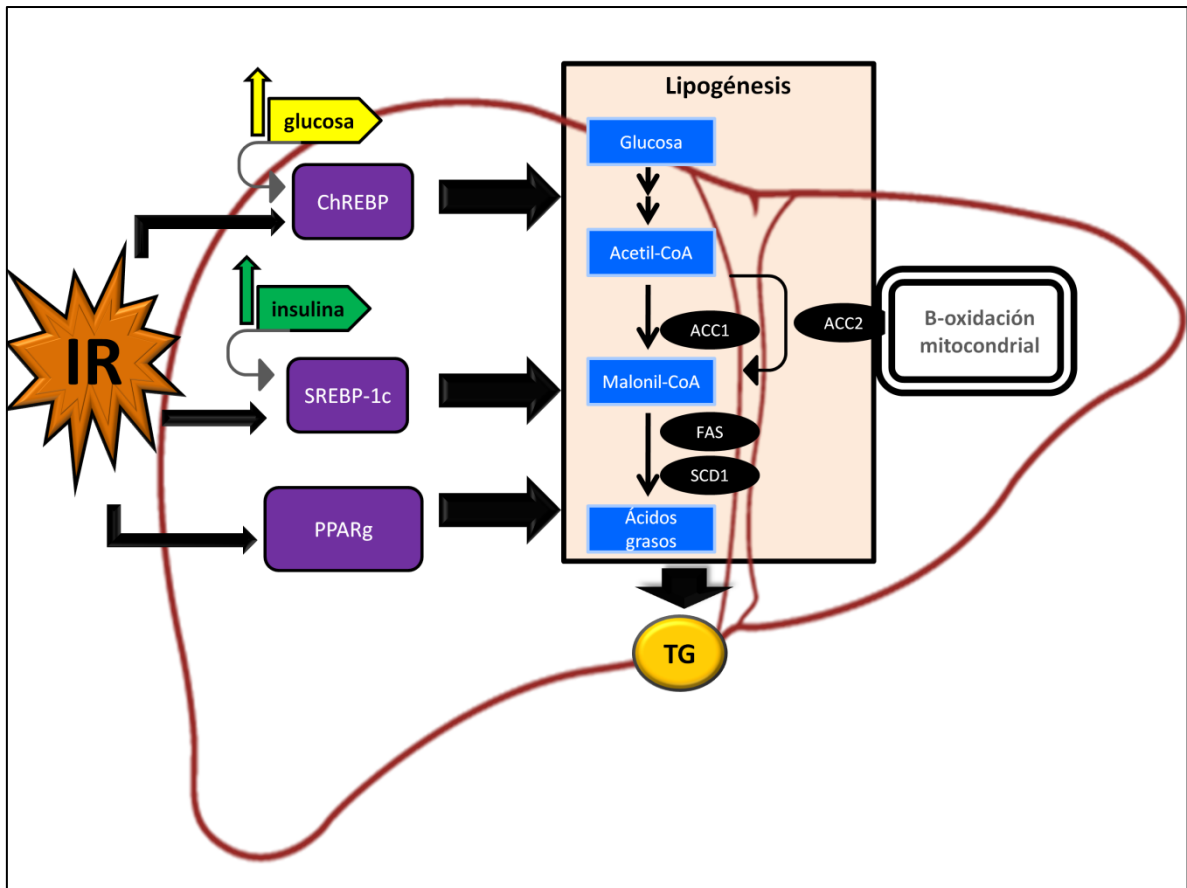


Figura 1.6: Factores y enzimas involucradas en la lipogénesis hepática. Tomado y modificado de (Abruzzese et al., 2016).

SOP y su relación con el hígado graso

En condiciones fisiológicas en el hígado existe un equilibrio entre la importación y exportación de ácidos grasos y entre la lipólisis y lipogénesis. Cuando estos equilibrios se perturban, o cuando la lipogénesis está alterada, o aumenta el flujo de ácidos grasos hacia el hígado puede entonces llevarse a la acumulación hepática de gotas lipídicas llevando a esteatosis e incluso al desarrollo de la enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA) (Browning y Horton, 2004; den Boer et al., 2004; Kawano y Cohen, 2013).

EHGNA presenta una alta prevalencia en la población general (alrededor del 20% a 30%) (Clark, 2006; Vassilatou, 2014). Esta patología se presenta en un amplio espectro que va desde la esteatosis hasta la esteatohepatitis, que implica el desarrollo de procesos inflamatorios severos y puede llevar al desarrollo de fibrosis o incluso de cirrosis (Browning y Horton, 2004; Clark, 2006). EHGNA se reconoce como una patología multifactorial, pero su etiopatogenia no se conoce con certeza. Actualmente, se postulan dos hipótesis de su origen,

una conocida como hipótesis de "dos-hits" y otra que implica un origen por múltiples causas que se darían simultáneamente (Marino y Jornayvaz, 2015). En la hipótesis de "dos-hits" principalmente la IR y alteraciones en el metabolismo lipídico inducirían esteatosis y, secundariamente, otros factores como el estrés oxidativo, la inflamación y la contribución de ciertas adipocinas hepáticas, entre otros, estarían involucrados en el desarrollo de cuadros más complejos de EHGNA. (Day y James, 1998; Adams et al., 2005; Lin et al., 2014). Por otro lado, la hipótesis multicausal toma en cuenta todos los factores contemplados por la hipótesis de "dos-hits" pero también resalta la contribución de otros, como las hormonas y factores provenientes del tejido adiposo y del intestino, y sobretodo, destaca el hecho de que todos los factores contemplados actuarían más bien paralelamente y en simultáneo en el desarrollo de EHGNA y todo su espectro (Tilg y Moschen, 2010; Marino y Jornayvaz, 2015).

EHGNA está asociada a la presencia de obesidad, diabetes tipo 2 y dislipidemia (Adams et al., 2005; Vassilatou, 2014). Dado que estas alteraciones metabólicas también se presentan con una alta frecuencia en pacientes con SOP, es que en los últimos años se ha empezado a considerar a la población SOP como pacientes en riesgo del desarrollo de EHGNA. Es importante destacar que, tanto SOP como EHGNA están asociadas a la presencia de IR y de componentes del SM (Schwimmer et al., 2005; Gambarin-Gelwan et al., 2007; Vassilatou, 2014). Incluso, se ha sugerido que EHGNA sería una manifestación hepática del SM (Kotronen y Yki-Järvinen, 2008). Si bien EHGNA se presenta con baja frecuencia en mujeres premenopáusicas, en el caso de mujeres con SOP jóvenes sí se ha detectado una alta prevalencia de esta alteración hepática (Vassilatou, 2014). Asimismo, dado que las pacientes con SOP con fenotipos hiperandrogénicos presentan una mayor prevalencia de EHGNA que las que poseen el fenotipo normoandrogénico, es que se ha sugerido que los andrógenos podrían contribuir al desarrollo de esta patología (Vassilatou et al., 2010; Vassilatou, 2014). Asimismo se sabe que los andrógenos pueden promover un ambiente pro-apoptótico y regular al receptor de colesterol tipo LDL, los cuales pueden afectar al tejido hepático llevando al desarrollo de esteatosis y de EHGNA en su espectro amplio (Tan et al., 2010; Baranova et al., 2013; Marino y Jornayvaz, 2015).

A pesar de la relación existente entre estas patologías, aún se desconoce si SOP, y la hiperandrogenemia asociada, serían un factor independiente en el desarrollo de EHGNA o si la presencia de IR es la causa clave en la relación entre ambas (Gambarin-Gelwan et al., 2007; Marino y Jornayvaz, 2015).

Funcionalidad ovárica

El ovario de vertebrados es un órgano muy dinámico que tiene la responsabilidad de proporcionar y mantener un número óptimo de gametas maduras y viables que aseguren la propagación de la especie (Johnson, 2003). No sólo se encarga de la producción y liberación de oocitos, sino que también es la fuente mayoritaria de hormonas sexuales, que regulan múltiples funciones biológicas (incluyendo el propio mantenimiento y regulación de la reproducción). Estas funciones del ovario están controladas tanto por señales endocrinas, como también por factores locales (Demeestere et al., 2005; Barnett et al., 2006). Muchos de los factores que regulan la funcionalidad ovárica y los mediadores que regulan la esteroidogénesis y la foliculogénesis están conservados evolutivamente entre especies (incluyendo a roedores y humanos) (Chaffin y Vandervoort, 2013). Estos dos procesos, foliculogénesis y esteroidogénesis, están asociados. Mediante la esteroidogénesis ovárica se producen progestágenos, andrógenos y estrógenos, que actúan regulando el crecimiento folicular, la reproducción y manteniendo la fertilidad. Asimismo, cada tipo de distinto de población folicular responde diferencialmente a la acción de los esteroides producidos (Drummond, 2006).

Foliculogénesis

En la mayoría de las hembras de mamíferos, la formación de gametas (ovogénesis), comienza en la vida intrauterina, quedando determinado en esta etapa el número definitivo de células germinales.

Durante la embriogénesis, las células germinales primordiales, se forman en territorios alejados de las crestas gonadales (sitio donde se desarrollarán las gónadas) y conforme avanza el desarrollo migran hacia las mismas y al llegar allí, se diferencian en oogonias (Molyneaux et al., 2001). Esto ocurre durante la gestación temprana en humanos (alrededor de las semanas 6-7) y en la gestación media o tardía en otras especies, como es el caso de los roedores (Mcgee y Hsueh, 2000). Una vez en las crestas gonadales, las células germinales y las células somáticas, derivadas del mesénquima de la cresta gonadal, proliferan por mitosis. Una vez que la mitosis de las células germinales se completa, comienza la división meiótica, en la cual estas células quedan arrestadas en diplotene de profase I. En ese momento, dichas células germinales son rodeadas por las células somáticas, llamadas células de la pre granulosa, llevando a la formación de los folículos primordiales, proceso que viene acompañado de una pérdida dramática de células germinales (Forabosco et al., 1991; Pepling y Spradling, 2001).

Este proceso en humanos, comienza en la gestación media y continua hasta el momento del nacimiento. En cambio, en las ratas, la mayoría de los oocitos están "desnudos" al momento del nacimiento y la formación de folículos primordiales se produce al tercer día de vida (Rajah et al., 1992; Mcgee y Hsueh, 2000).

Cada folículo primordial contiene un oocito arrestado en profase y rodeado por células aplanadas denominadas células pre granulosas las cuales se diferenciarán en células de la granulosa (CG). Estos folículos primordiales constituyen la reserva ovárica quiescente (Mcgee y Hsueh, 2000). Es a partir de esta reserva ovárica que los folículos serán reclutados hacia el conjunto de folículos en crecimiento, pasando por diversos estadios, y los oocitos que contienen retomarán la meiosis llevando, finalmente, a la ovulación.

Una vez en la pubertad, el ovario adquiere sensibilidad a las gonadotrofinas hipofisarias y se establece un ciclo ovárico productor de gametas. Tanto en humanos como en ratas, el crecimiento folicular incluye dos períodos diferentes: uno independiente de gonadotrofinas y otro dependiente de las mismas (Demeestere et al., 2005) (Fig. 1.7).

El primer período del desarrollo folicular, independiente de gonadotrofinas, comprende los primeros pasos de la foliculogénesis involucrando el desarrollo desde los folículos primordiales, pasando por los primarios hacia los secundarios. En este período intervienen señales locales y requiere una compleja interacción entre el oocito y las células somáticas, entre ellos se encuentran los esteroides sexuales (E_2 y T) (Hsueh et al., 2015). Si bien se considera que es un período independiente de la acción de las gonadotrofinas, se sabe que la hormona folículo estimulante (FSH) tiene un efecto estimulador sobre la foliculogénesis, y podría actuar reduciendo la atresia folicular y regulando la calidad folicular y oocitaria (Hsueh et al., 2015; Dewailly et al., 2016). Sin embargo, se considera que su acción no sería directa ya que los folículos primordiales no expresan receptores de gonadotrofinas (Mcgee y Hsueh, 2000). Esta primera etapa de la foliculogénesis involucra diversos cambios morfológicos en la estructura de los folículos. Primero, la transición desde un folículo primordial hacia un folículo primario se caracteriza por un cambio morfológico en las células de la granulosa, que pasan de su forma aplanada a una cuboidal. En el paso subsiguiente, en la formación del folículo secundario, el oocito crece junto con las capas de células de la granulosa, y se forma una capa de células de la teca, la cual es externa a las células de la granulosa, y se encuentra separada por la membrana basal (Eppig, 2001; Edson et al., 2009).

En el segundo período del desarrollo folicular, dependiente de gonadotrofinas, lo folículos adquieren una cavidad con fluido conocida como antro o cavidad antral, dando lugar

al folículo antral. El antro define dos poblaciones de células de la granulosa: las células del cúmulo (adyacentes al oocito) y las murales, que rodean la pared folicular y son las mayores productoras de esteroides (Edson et al., 2009). En esta etapa la FSH actúa sobre las células de la granulosa, regulando su supervivencia, proliferación, la producción de hormonas sexuales y también puede modular la expresión del receptor de LH (Edson et al., 2009). La mayor parte de los folículos antrales degenera y sufre atresia folicular, mientras que sólo una subpoblación continua el desarrollo hasta el estadio preovulatorio, formando el folículo preovulatorio o de Graaf (Fauser y Van Heusden, 1997; McGee y Hsueh, 2000). En los folículos preovulatorios las células de la granulosa, murales y del cúmulo, responden a FSH y LH de forma diferencial, esto los hace receptivos a la secreción de LH, particularmente al pico preovulatorio, lo que lleva a una cascada de eventos que culmina en la ovulación (en el caso de primates) y de varios folículos dominantes (en el caso de roedores). Entre estos eventos se incluyen: la reanudación de la meiosis del oocito, la expansión del cúmulo, la ruptura del folículo y de la pared ovárica y la liberación del oocito maduro en complejo con el cúmulo (Boots y Jungheim, 2015). En este proceso intervienen las gonadotrofinas, las hormonas sexuales, citoquinas y otros factores paracrinós y autocrinos (Johnson, 2003; Conti et al., 2012). En cada ciclo ovulatorio, bajo control de gonadotrofinas, un folículo de Graaf dominante ovula, liberando a un oocito maduro, mientras que sus células de la teca y granulosa darán formación al cuerpo lúteo (McGee y Hsueh, 2000; Edson et al., 2009; Boots y Jungheim, 2015).

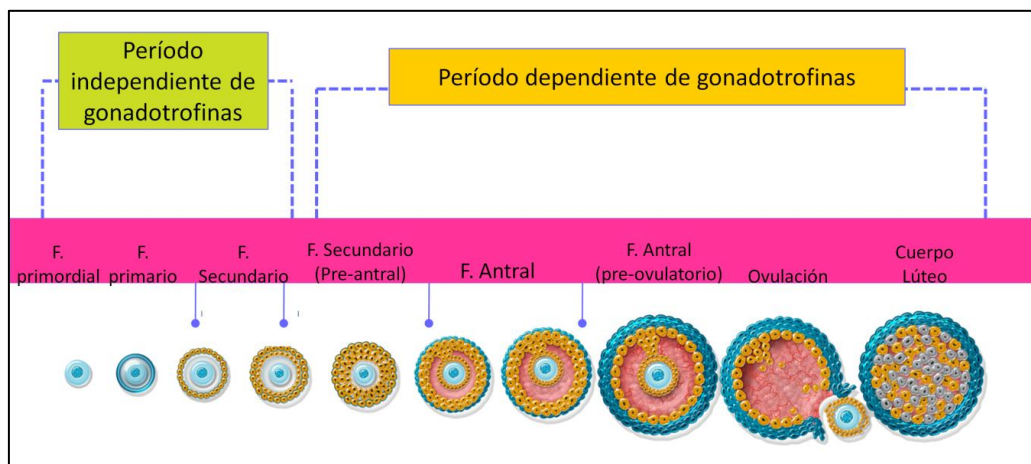


Figura 1.7: Esquema de la foliculogénesis ovárica en la vida postnatal, a partir de la pubertad. En los primeros estadios de la foliculogénesis existiría, principalmente, un control paracrina, mientras que, a partir del desarrollo de folículos pre-antrales, comenzaría el período dependiente de gonadotrofinas y se podría apreciar un control endocrino de la foliculogénesis en el cual a su vez participarían también señales paracrinós y autocrinos. Tomado y modificado de (AnshLabs: <https://www.anshlabs.com/folliculogenesis/>).

Esteroidogénesis

La esteroidogénesis ocurre de manera paralela, y regula, al proceso de maduración folicular a lo largo del ciclo estral, en roedores, y menstrual, en humanos y primates (Fig. 1.8).

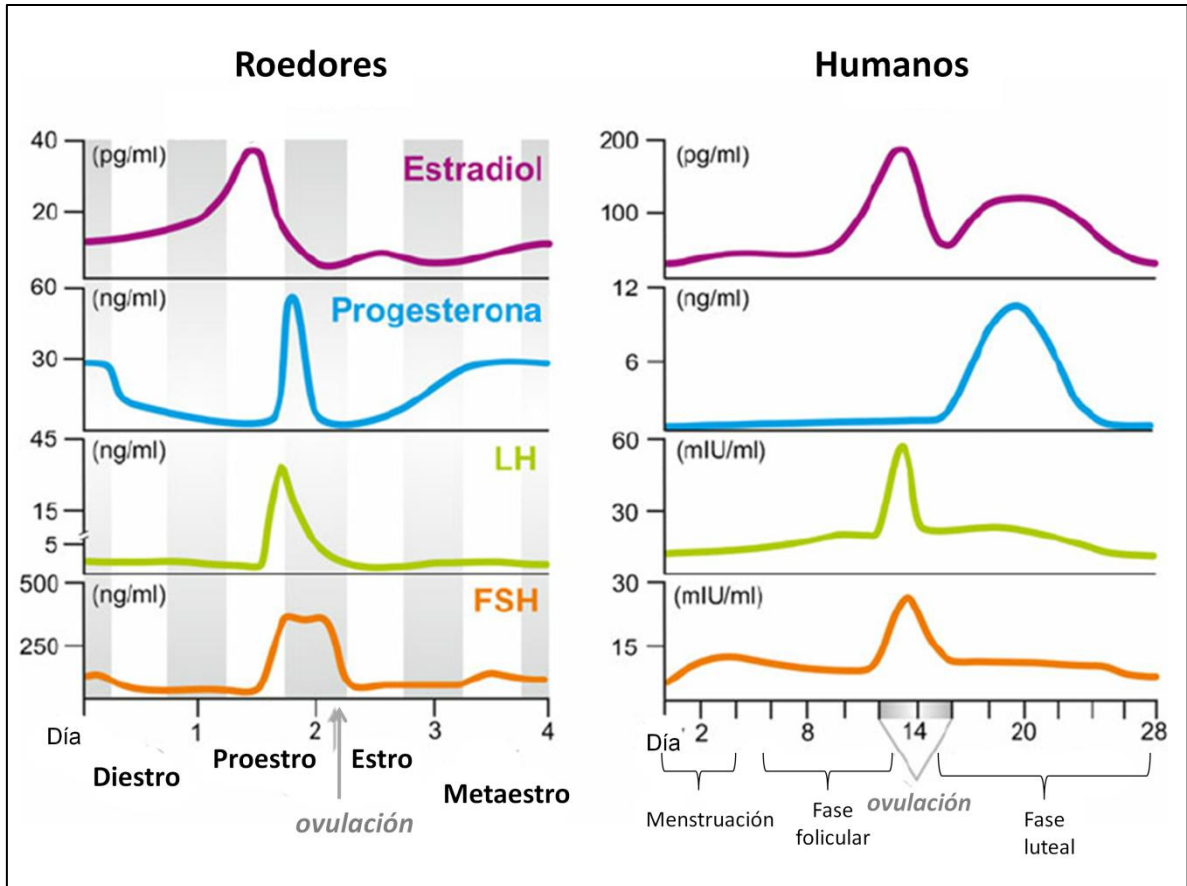


Figura 1.8: Esquema comparativo entre el ciclo reproductivo de los roedores (de aproximadamente 4 días) y el ciclo menstrual humano (de aproximadamente 28 días). Se muestran las fluctuaciones promedio de las hormonas circulantes: 17-beta-estradiol, progesterona, hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) en una rata hembra (izquierda) frente a una humana (derecha). Tomado y modificado de (Donner y Lowry, 2013).

Es un proceso complejo que involucra la acción de múltiples enzimas, mediante el cual se sintetizan hormonas esteroideas a partir de colesterol (Miller y Auchus, 2011). Las células esteroidogénicas pueden aprovechar el colesterol a partir de 4 fuentes diferentes: a) por la síntesis *de novo* en el retículo endoplasmático; b) mediante ésteres de colesterol almacenado como gotas lipídicas; c) a partir del colesterol HDL proveniente de circulación mediante, internalizado mediante el receptor de HDL, receptor scavenger B1 (SR-B1, por sus siglas en

inglés: *scavenger receptor B1*); d) mediante el colesterol LDL proveniente de circulación que es endocitado por el receptor de LDL (LDL-R) (Miller y Bose, 2011).

Si bien las células esteroidogénicas tienen la capacidad de sintetizar colesterol *de novo*, la alta demanda del mismo para la síntesis de esteroides requiere el uso del colesterol proveniente de la circulación el cual debe ser eficientemente transportado e importado para su utilización por el ovario (Gwynne y Strauss, 1982).

La síntesis *de novo* de colesterol tiene lugar, principalmente, en el retículo endoplasmático liso y es un proceso que involucra muchas enzimas. El paso límite en este proceso está dado por la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A reductasa (HMGCR), la cual actúa transformando el HMG-CoA a mevalonato, precursor del colesterol (Xu et al., 2010).

Por otro lado, el tráfico intracelular de colesterol requiere la acción de los receptores LDL-R y SR-B1. El colesterol LDL es endocitado mediante su receptor (LDL-R), y puede ser almacenado en su forma esterificada o convertido a las formas libres de colesterol para ser utilizado en la esteroidogénesis. Por otro lado, las partículas de colesterol HDL, también son una fuente de materia prima para la síntesis de esteroides, que ingresan a los folículos por SR-B1. La estimulación ovárica con gonadotrofinas promueve la expresión de ambos receptores y facilita la internalización del colesterol para su uso en la esteroidogénesis (Connelly y Williams, 2003; Miller y Bose, 2011).

Tanto el colesterol que ingresa a las células, como el que es sintetizado, puede ser esterificado en el retículo endoplasmático mediante la acción de la enzima Acetil-coenzima A acetiltransferasa-1 (ACAT1, hoy en día también llamada SOAT1). Dichos ésteres son formados en el retículo endoplasmático y se almacenan como gotas lipídicas (Miller y Bose, 2011; Miller, 2017).

A partir del colesterol biodisponible y su transporte desde el citoplasma a la mitocondria, por acción de la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR, por sus siglas en inglés: *Steroidogenic acute regulatory protein*). Una vez en la mitocondria ocurren los primeros pasos enzimáticos que conllevan a la síntesis de esteroides, donde el primer mediador es la pregnenolona (Miller y Bose, 2011). La pregnenolona, es transportada nuevamente al citoplasma, donde puede ser transformada a progesterona (P4), mediante la acción de la enzima 3-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3BHSD). Por otro lado, la pregnenolona también puede sufrir la acción consecutiva de las enzimas citocromo P450 17A1 (CYP17A1) y 3BHSD y llevar a la formación de 17-hidroxiprogesterona y DHEA, para luego formar androstenediona, los cuales son andrógenos. Estos pueden ser transformados a T

mediante la acción de la enzima 17-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17BHSD). Finalmente, por acción de la aromatasa (o CYP19A1, citocromo p450) los andrógenos se aromatizan a estrógenos (Fig. 1.9) (Esteves y Alviggi, 2015).

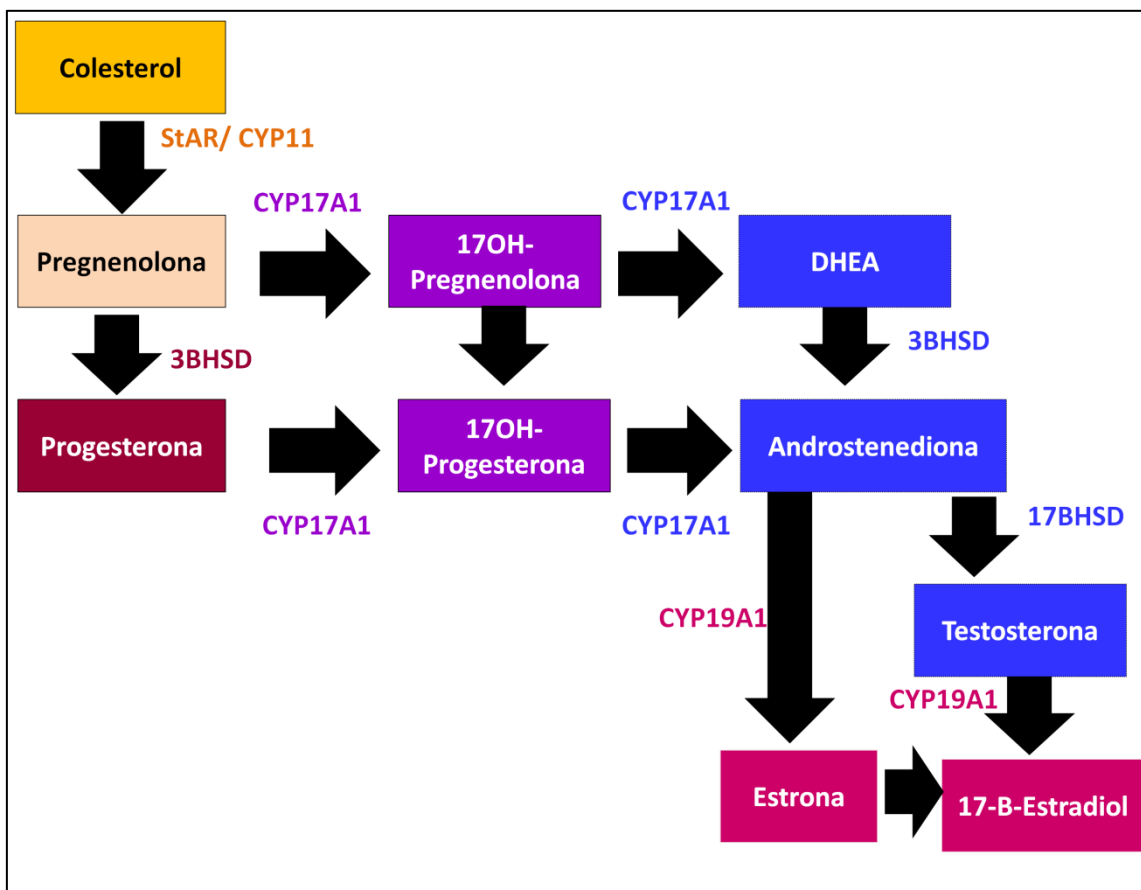


Figura 1.9: Esquema de la esteroidogénesis ovárica.

La esteroidogénesis en folículos preantrales y antrales tempranos no se conoce con certeza, aunque se sabe que en dichos folículos los factores autocrinos y paracrinos cumplirían una acción preponderante en la modulación de la esteroidogénesis (Esteves y Alviggi, 2015). En cambio, el caso de los folículos antrales se encuentra más estudiado. Y se postula que la esteroidogénesis ocurriría según el modelo de "dos células, dos gonadotrofinas" en la mayoría de los mamíferos (incluyendo humanos y roedores) (Jamnongjit y Hammes, 2006; Dewailly et al., 2016). Según este modelo los andrógenos son sintetizados a partir del colesterol en las células de la teca al ser estimuladas por LH, que expresan principalmente el receptor de esta gonadotrofina, y seguidamente, los andrógenos son convertidos a estrógenos en las células de la granulosa que expresan mayoritariamente, pero no exclusivamente, el receptor de FSH y

son estimuladas por esta gonadotrofina (Esteves y Alviggi, 2015). Durante el crecimiento folicular, las células de la granulosa no se encuentran muy vascularizadas. Esto limita la disponibilidad de colesterol proveniente de circulación y también de oxígeno, lo que conlleva, a que la esteroidogénesis en dichas células, sea reducida. A medida que el folículo crece, y en el momento previo a la ovulación, ocurre la luteinización de las células de la granulosa. En dicho proceso, aumenta la vasculatura y junto con ello la capacidad de síntesis de esteroides de dichas células, que van a producir principalmente progesterona (Wood y Strauss, 2002). Esta producción de progesterona tiene un rol clave durante la maduración final del oocito y especialmente en el proceso de ovulación, facilitando la ruptura folicular (Conneely et al., 2002).

Es importante resaltar que, si bien la regulación de la esteroidogénesis involucra la acción endocrina de las gonadotrofinas, también, depende del estado metabólico. Es así que diversas moléculas, que actúan como mediadores del metabolismo energético también están involucradas en la regulación de la reproducción (Walker y Gore, 2011).

Sensores energéticos y regulación de las funciones reproductivas

La fertilidad femenina y el estado metabólico - energético están íntimamente relacionados. Las patologías que involucran disfunciones ováricas suelen involucrar anormalidades metabólicas (Torre et al., 2014). La reproducción es un proceso costoso desde el punto de vista metabólico y los mecanismos que controlan el balance energético están íntimamente asociados a las funciones reproductivas y su regulación (Mircea et al., 2007). En este contexto, diversos sensores y mediadores energéticos, como son las adipoquinas y el factor de transcripción maestro PPAR γ , jugarían un rol muy importante modulando las funciones ováricas (Mircea et al., 2007; Dupont et al., 2008, 2012; Reverchon et al., 2014b).

Los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs): el rol de PPAR γ en la funcionalidad ovárica

Los receptores activados por el proliferadores peroxisomales (PPARs, por sus siglas en inglés: *peroxisome proliferator activated receptors*) son una familia de receptores nucleares que se presentan en tres isoformas: alfa, beta y gama, codificadas por distintos genes. Actúan, como factores de transcripción, regulando la expresión de diversas moléculas, estando involucrados en la regulación de múltiples vías como son: el metabolismo lipídico, la

homeostasis de la glucosa y la insulina, procesos inflamatorios, el desarrollo embrionario, las funciones placentarias y también las funciones reproductivas (Issemann y Green, 1990; Komar, 2005; Minge et al., 2008a; Jawerbaum y Capobianco, 2011; Tyagi et al., 2011; Vélez et al., 2013).

La estructura de los PPARs contiene los dominios clásicos que pueden encontrarse en otros receptores nucleares. En el extremo N-terminal presentan los dominios de activación independiente de ligando (AF-1) y de unión a ADN (DBD, por sus siglas en inglés: *DNA binding domain*), mientras que en el extremo C-terminal se encuentran los dominios de unión a ligando y dimerización (LBD-Dim, por sus siglas en inglés: *ligand binding domain-dimerization*) y de activación dependiente de ligando (AF-2) (Komar, 2005) (Fig. 1.10).

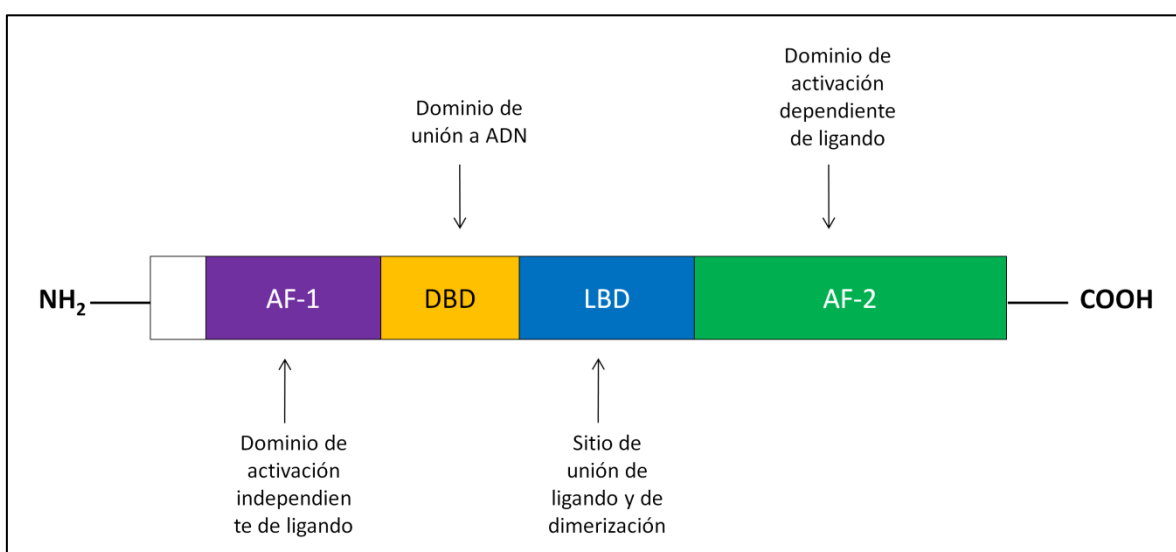


Figura 1.10: Estructura general de los PPARs. Tomado y modificado de (Vélez et al., 2013)

Los PPARs pueden unirse al ADN a través de una secuencia específica en el ADN, que contiene la secuencia de bases " AGGTCA-N-AGGTCA ", denominada secuencia de respuesta a los PPARs (PPRE, por sus siglas en inglés: *PPAR response element*). La unión de los PPARs a los PPRE es a través de la formación de heterodímeros con el receptor del ácido 9-cis-retinoico, Receptor X retinoide (RXR). Una vez formado el complejo PPAR/RXR se puede activar la unión de ligandos que inducen cambios conformacionales en el heterodímero y permiten la disociación de co-represores y el reclutamiento de co-activadores, lo que permitiría así, la unión a la secuencia PPRE de los genes blanco de los PPARs (Komar, 2005; Matsuda et al., 2013; Vélez et al., 2013) (Fig. 1.11).

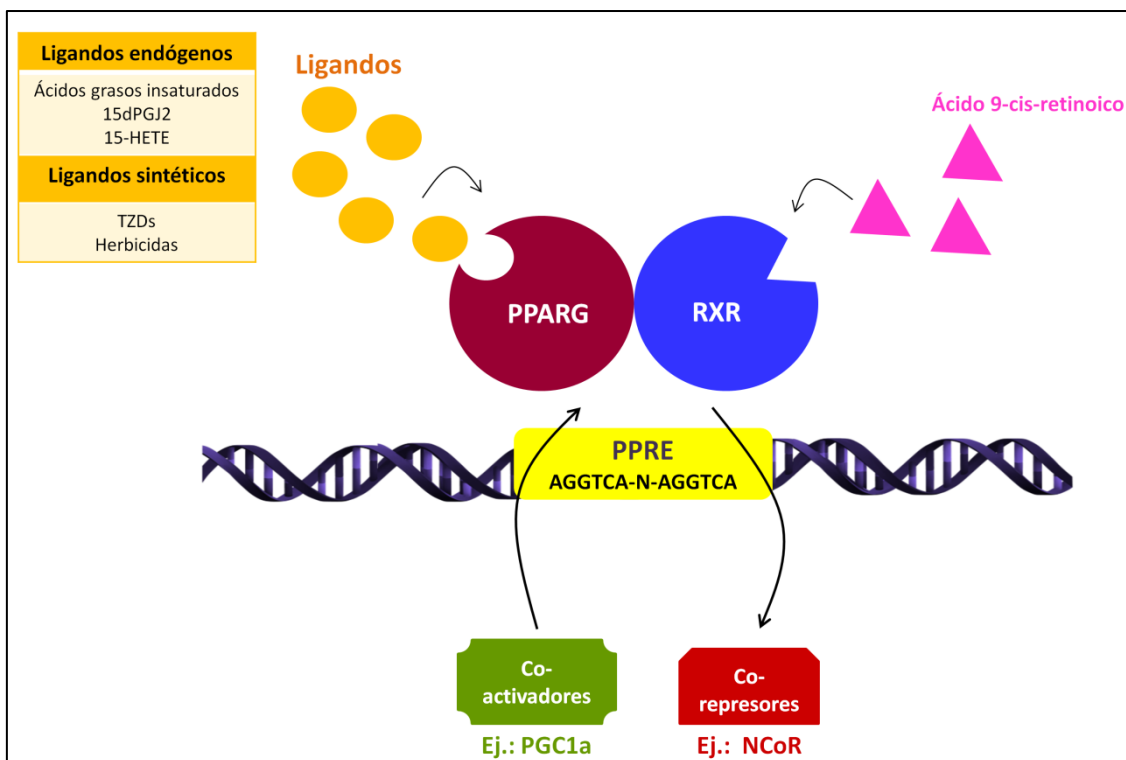


Figura 1.11: Esquema de unión de PPARs al ADN y su heterodimerización con el receptor RXR. Se indica la secuencia de ADN target de PPARs, también llamada elementos PPRE. En la figura se ejemplifica con el caso de PPARG, para el cual se conoce que los ligandos pueden ser tanto endógenos (como los ácidos grasos insaturados, la 15-deoxi12, 14 prostaglandina J2 (15d-PGJ2), el ácido 15-hidroxiieicosatetraenoico (15-HETE), entre otros) o exógenos como son las tiazolidinonas (TZDs), que incluyen a la rosiglitazona y pioglitazona, y los herbicidas, entre otros. Entre los co-activadores de PPARG se conoce, al co-activador co-activador de PPARG 1-alfa, PGC1α; y entre sus represores se encuentra el co-represor de receptores nucleares, NCoR.

Los PPARs están expresados en diferentes compartimentos del sistema reproductor: hipotálamo, pituitaria, ovario, útero y testículos. Se ha descrito que las tres isoformas están presentes en los ovarios de diferentes especies (incluyendo humanos y roedores), pero PPARG es la isoforma que ha sido principalmente asociada a la fertilidad femenina y asimismo se ha demostrado que podría tener un rol en la patogénesis de las alteraciones ováricas asociadas a SOP (Froment et al., 2006; Vitti et al., 2016).

PPARG presenta dos isoformas que son producto de variantes de *splicing*: PPARG1 y PPARG2. Se sabe que ambas isoformas están presentes en el ovario, siendo PPARG1, la más abundante. La activación de PPARG regula la síntesis de las hormonas esteroideas en células de la granulosa y la proliferación celular (Komar et al., 2001; Froment et al., 2006; Velez et al., 2015), y se conoce que alteraciones en PPARG, llevan a subfertilidad femenina (Cui et al.,

2002). La expresión de PPAR γ no es estable a lo largo del ciclo folicular. Su expresión aumenta junto con el desarrollo de los folículos desde el estadio primordial hasta la formación del folículo pre-ovulatorio y disminuye luego del pico de LH (Komar, 2005). Lo que sugiere que tiene una expresión que acompaña al ciclo de la foliculogénesis.

En mujeres con SOP, el tratamiento con ligandos exógenos de PPAR γ (como son la pioglitazona y rosiglitazona) se ha utilizado para inducir la ovulación y mejorar los síntomas reproductivos del síndrome (aunque también los metabólicos) (Ehrmann, 2005; Aroda et al., 2009; Mohsen, 2012). Se ha observado que, la activación de PPAR γ aumenta los niveles de SHBG y disminuye los andrógenos circulantes, regula el metabolismo lipídico, de insulina y los niveles de LH, aumentando la tasa de ovulación y de embarazo (Dunaif et al., 1996; Brettenthaler et al., 2004; Seli y Duleba, 2004). En pacientes con SOP con IR, la expresión génica del co-activador de PPAR γ 1-alfa (PGC1 α , por sus siglas en inglés: *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) se encuentra alterada (Skov et al., 2007) mientras que la administración de glitazonas normaliza la expresión de PGC1 α en estos pacientes junto con una mejora en la respuesta metabólica a la insulina (Skov et al., 2008).

Debido a que PPAR γ no sólo puede modular las hormonas esteroideogénicas, sino también modula el metabolismo de la glucosa, la insulina y los lípidos, se considera que la acción de PPAR γ sobre la reproducción sería doble. Por un lado habría una acción directa sobre el ovario en cuanto a la regulación de la esteroideogénesis y la proliferación celular, y por otro, habría una acción indirecta, que involucraría la sensibilización de la insulina (Froment et al., 2006).

Las adipoquinas: el caso de quemerina

Las adipoquinas son citoquinas secretadas principalmente, pero no exclusivamente, por el tejido adiposo. Están involucradas en diversos procesos como son: la diferenciación de los adipocitos, la regulación del metabolismo de la insulina y la glucosa, los procesos inflamatorios y la angiogénesis (Reverchon et al., 2014b). Asimismo, se ha descrito que varias adipoquinas mantienen una compleja interacción con PPAR γ . Donde algunas, como es el caso de adiponectina, estarían reguladas por PPAR γ dado que presentan en su promotor elementos PPRE (Bharati et al., 2016). Mientras que otras, como leptina, son susceptibles a la acción de estos receptores nucleares (Considine, 2001; Dupont et al., 2008; Martos-Moreno et al., 2010; Elias y Purohit, 2013).

Actualmente, se sabe que alteraciones en el tejido adiposo pueden afectar el desarrollo, la maduración sexual y la fertilidad y que el sobrepeso y la obesidad afectan negativamente la fertilidad y los procesos reproductivos en mamíferos. En este contexto, es que en los últimos años se empezaron a considerar nuevos roles de las adipoquinas como reguladoras de las funciones reproductivas (Budak et al., 2006; Reverchon et al., 2014b).

Diversas adipoquinas regulan las funciones reproductivas a lo largo de todo el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Mitchell et al., 2005; Reverchon et al., 2014b). Se ha propuesto que existirían 4 niveles donde las adipoquinas actúan modulando las funciones reproductivas: a) en el hipotálamo e hipófisis; b) en el ovario y en el tracto reproductivo; c) en el oocito y el embrión; d) en la preñez y embarazo.

Particularmente, en el ovario hay producción local de adipoquinas, las cuales se conoce que ejercen funciones paracrinas y autocrinas pudiendo afectar así, directamente las funciones ováricas (Bharati et al., 2016). Y se ha descrito que pacientes con SOP, que muestran alteraciones reproductivas, tienen un perfil alterado de adipoquinas, independientemente de si presentan, o no, sobrepeso u obesidad. Esto ha llevado a proponer a las adipoquinas como mediadores de la patogenia de SOP (Chen et al., 2013; Reverchon et al., 2014b).

Se ha descrito que numerosas adipoquinas son producidas en el ovario y que presentan además receptores, lo que posibilita una vía de acción en este tejido. Entre ellas se cuentan: adiponectina, leptina, visfatina, resistina, ometina y quemerina (Dupont et al., 2012, 2015; Reverchon et al., 2014b). Entre ellas, quemerina ha llamado especial atención en el estudio de las funciones reproductivas y metabólicas y se ha postulado que podría tener un rol en la patogenia de SOP.

Quemerina

En particular, la quemerina es una adipoquina que se descubrió hace pocos años, en la década de 1990, y fue asociada a la función de la piel y el desarrollo de psoriasis. Ejerce su acción mediante su unión a sus receptores. Al día de hoy se han descrito tres receptores distintos, del tipo acoplados a proteína G: Receptor tipo quimiocina 1 (CMKLR1, por sus siglas en inglés: *Chemokine like receptor 1*, también conocido como ChemR23), el receptor acoplado a la proteína G (GPR1, por sus siglas en inglés: *G protein-coupled receptor 1*) y el receptor similar a la C-C quimiocina 2 (CCRL2, por sus siglas en inglés: *C-C chemokine receptor type 2*). Cada uno de estos receptores señalaría actuando y afectando vías diferentes. De los tres, CMKLR1 sería el principal, y se postula que CCRL2 no tendría una señalización propia, sino que actuaría regulando la biodisponibilidad de quemerina para su acción por los otros receptores

(Mattern et al., 2014; Reverchon et al., 2014b). El descubrimiento de los receptores de quemerina y la asociación de la misma con diversas patologías han llevado a poner en relevancia sus posibles múltiples funciones (Ferland y Watts, 2015).

Al día de hoy, diversos estudios han asociado a quemerina a obesidad, EHGNA y al síndrome metabólico. Y se ha descrito que esta adipoquina puede actuar promoviendo la adipogénesis y regulando la inmunidad y el metabolismo de la glucosa (Goralski et al., 2007; Tan et al., 2009; Bondue et al., 2011; Wang et al., 2012b). Particularmente, algunos estudios sugieren que las mujeres con SOP poseen altos niveles séricos de quemerina (Ademoglu et al., 2014; Wang et al., 2014). Asimismo, se ha demostrado que la metformina, utilizada en el tratamiento de SOP, revierte la IR y disminuye los niveles de quemerina (Tan et al., 2009).

En relación a PPAR γ , recientemente, se ha demostrado la presencia de una secuencia PPRE dentro del promotor de quemerina (Muruganandan et al., 2011) y se ha demostrado que el tratamiento de ratones con rosiglitazona (ligando sintético de PPAR γ) regula los niveles de quemerina circulante (Muruganandan et al., 2011). Lo que sugiere una relación entre PPAR γ y esta adipoquina.

Tanto quemerina como su principal receptor, CMKLR1, están presentes en ovario humano, de rata y ratón (Goralski et al., 2007; Cash et al., 2008; Bondue et al., 2011; Wang et al., 2012b). Diversos estudios sugieren que puede regular la síntesis de esteroides, particularmente de progesterona, en células de la granulosa y modularía también la angiogénesis y proliferación celular, actuando como regulador de factores de crecimiento ováricos (Reverchon et al., 2012, 2014b; Wang et al., 2012b; Kim et al., 2013) (Fig. 1.12).

A partir del hallazgo de quemerina, han surgido diversos estudios focalizados en comprender la regulación de la misma en las funciones reproductivas y su posible rol en la integración con el metabolismo. Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales la quemerina regula o interviene en el desarrollo folicular, y su rol en alteraciones reproductivas como SOP, aún no se han dilucidado por completo.

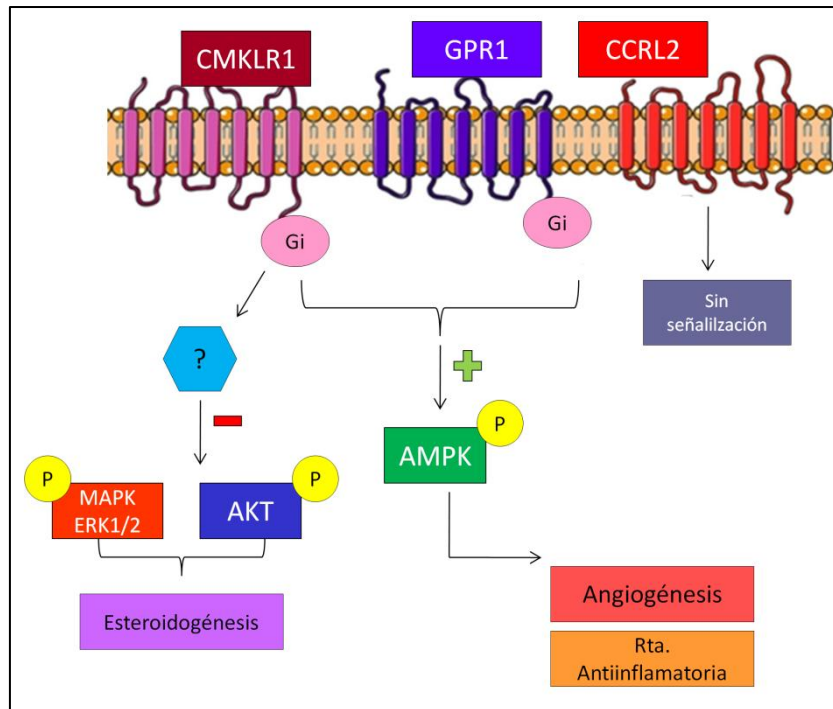


Figura 1.12: Esquema de las posibles vías de acción, propuestas hasta el momento, de quemerina en el ovario. Se propone que quemerina actuaría, tanto por la vía de CMKLR1 como por GPR1 (hasta el momento no se conoce una señalización asociada a CCL2), por distintas vías de señalización que incluyen a las rutas de transducción de señales de distintas quinasas como: las MAP quinasas (MAPK/ERK1/2), la proteína serina/treonina quinasa (AKT) y a la proteína quinasa activada por AMP (AMPK). Es importante resaltar que estas quinasas también actúan en las vías de la glucosa e insulina intraovárica. A través de dichas vías podría regular, activando (+) o inhibiendo (-), diferentes procesos biológicos como la angiogénesis, la inflamación y la esteroidogénesis. Tomado y modificado de (Reverchon et al., 2014b).

II. Hipótesis de trabajo y objetivos

II.Hipótesis de trabajo y objetivos

Hipótesis

A- La hiperandrogenización prenatal induce programación fetal que afecta a PPARg alterando el balance metabólico y la reproducción y desregula la esteroidogénesis ovárica mediante un mecanismo que involucra la vía de quemerina y PPARg.

B- Quemerina, debido a su rol metabólico y sus implicancias reproductivas, podría resultar un buen biomarcador de alteraciones metabólicas en pacientes con SOP.

Objetivo general

Contribuir al estudio del mecanismo de acción de los receptores nucleares activados por agentes proliferadores peroxisomales gama (PPARg), específicamente al conocimiento de su rol en el metabolismo lipídico y la esteroidogénesis ovárica, así como la relación entre ambos.

Asimismo nos proponemos estudiar a quemerina como marcador de riesgo metabólico en pacientes con SOP de población local.

Objetivos específicos

1- Estudiar el efecto de la hiperandrogenización prenatal sobre el balance metabólico en ratas de 60 (transición de la pubertad a la adultez) y 90 días(etapa adulta).

2-Evaluar el efecto de la hiperandrogenización prenatal sobre el balance de la vía lipogénica en el hígado en ratas de 60 días (transición de la pubertad a la adultez) y 90 días (etapa adulta).

3-Analizar el efecto de la hiperandrogenización prenatal sobre la funcionalidad ovárica desde los 60 días de edad.

4- Establecer el alcance de la hiperandrogenización prenatal sobre la esteroidogénesis y la funcionalidad ovárica en la vida adulta.

5- Evaluar, en edad adulta, el efecto de la hiperandrogenización prenatal sobre la activación de las vías de la adipoquina quemerina y de PPARg como sensores energéticos.

6-Estudiar en la población local de mujeres con SOP las alteraciones metabólicas presentes y establecer a quemerina como posible biomarcador de las mismas.

III. Metodología

III. Metodología

A-Modelo Animal

Se utilizaron ratas hembras y machos de 2 meses de edad de la cepa Sprague-Dawley. Se pusieron en apareo las hembras, 5 con 1 macho por jaula, y se determinó la preñez por la presencia de espermatozoides en el extendido vaginal. Se consideró día 0 de preñez el día de aparición de espermatozoides en el extendido vaginal. El nacimiento de las crías en las condiciones del Bioterio del CEFyBO (CONICET-Fmed, UBA) ocurre en el día 21 de gestación. Los animales tuvieron acceso *ad libitum* a alimento (Purina Regular Chow) y agua con un foto período de 12 hs luz, 12 hs oscuridad a 24 °C. 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.

Durante los días 16 a 19 de preñez los animales se dividieron en dos grupos. A un grupo se le administró una dosis diaria de 1mg de testosterona libre (Sustanon 250, Organon) disuelta en 100ul de aceite vegetal. Se trabajó con las crías hembras, las cuales llamaremos grupo hiperandrogenizado prenatalmente (HP). Otro grupo recibió sólo aceite vegetal (vehículo), el cual fue inyectado en los mismos días de gestación. Las crías hembras de este último grupo constituyen el grupo control de trabajo (Figura 3.1). Este procedimiento se repitió en 3 ocasiones diferentes con el objetivo de determinar un n=25 de camadas totales por cada tratamiento.

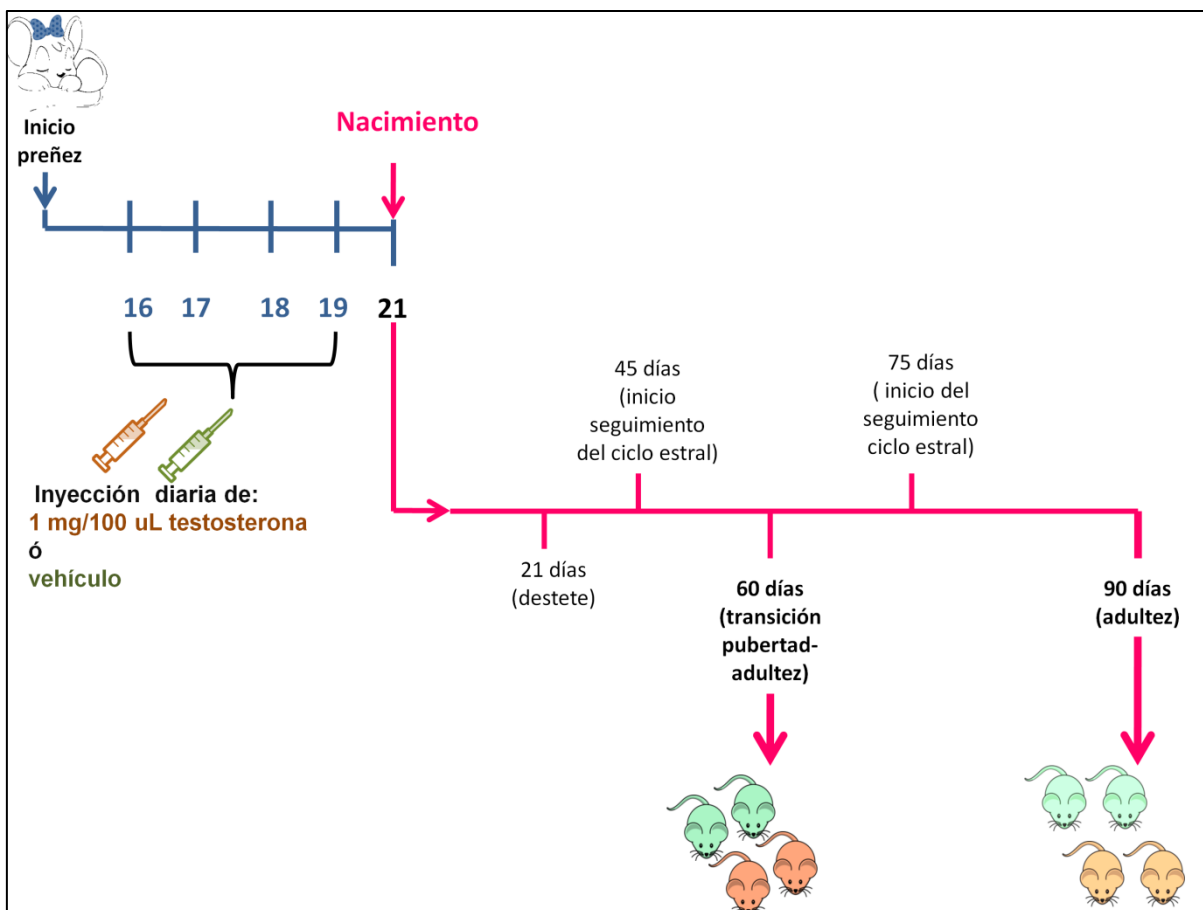


Figura 3.1: Esquema del modelo utilizado. Se indica en azul el esquema temporal de la preñez, durante la cual entre los días 16 a 19 se aplica un tratamiento de androgenización o con vehículo. En rosa se observa el esquema temporal en la vida postnatal de las crías. Las edades de eutanasia rason los días 60 (transición entre etapa puberal adultez) y 90 (adultez). En naranja se indica el grupo HP, descendientes hembras de ratas tratadas con testosterona. En verde se indica el grupo control, correspondiente a las crías de ratas tratadas con vehículo.

Al momento del destete (21 días) se mantuvieron sólo las crías hembras, siendo los machos descartados. Las mismas fueron pesadas desde el día 21 cada 7 días hasta el momento del sacrificio para construir la curva de crecimiento y ganancia de peso.

Un grupo de crías HP y control, fue sacrificada a los 60 días (etapa de transición entre la pubertad y la adultez) (Spear, 2000; McCutcheon y Marinelli, 2009; Sengupta, 2013) y otro grupo de crías se mantuvo hasta los 90 días de edad (etapa adulta).

En resumen, los grupos experimentales fueron los siguientes:

* **Grupo Hiperandrogenizado prenatalmente (HP):** Crías de animales inyectados subcutáneamente con testosterona libre (Dosis: 1mg disuelta en 100ul de aceite vegetal) durante los días 16, 17, 18 y 19 de gestación.

* **Grupo Control:** Crías de animales inyectados subcutáneamente con 100ul de vehículo durante los días 16, 17, 18 y 19 de gestación.

Determinación del ciclo estral y establecimiento de fenotipos

Para la determinación del ciclo estral de los animales se tomaron muestras por extendido vaginal que fueron observadas al microscopio de luz pudiendo determinarse el estadio del ciclo siendo éste: Proestro, Estro, Metaestro y Diestro, de acuerdo al contenido de células presentes en dicha muestra (Figura 3.2), teniendo en cuenta los siguientes parámetros :

En el **estadio Proestro** el extendido vaginal se caracteriza por el predominio de células epiteliales redondas nucleadas, con ausencia, o muy pocos leucocitos, también pueden aparecer escasas células cornificadas.

El **estadio Estro** se caracteriza por la presencia de numerosos colgajos de células epiteliales queratinizadas con citoplasma granular, total ausencia de leucocitos y unas muy pocas células nucleadas.

El **estadio Metaestro (o Diestro I)** presenta predominio de células de tipo leucocitaria y pocas células epiteliales cornificadas, por último en el **estadio Diestro (o Diestro II)** se observan fundamentalmente leucocitos, muy pocas células queratinizadas y a veces células nucleadas.

El ciclo estral se evaluó en la vida postnatal, desde el día 45 al 60 de vida, y desde el día 75 al 90.

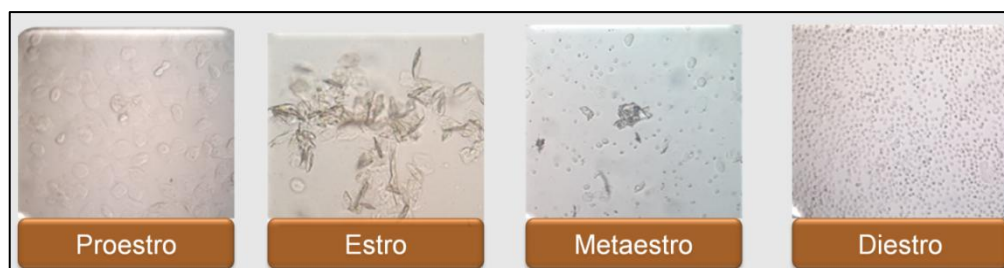


Figura 3.2: Detalle de los tipos celulares que se pueden apreciar en cada uno de los estadios típicos, en ratas controles, al visualizar los extendidos vaginales a microscopio óptico.

Establecimiento de la regularidad del ciclo estral

Los animales se clasificaron según la regularidad o no del ciclo (Karim et al., 2003) (Figura 3.3) en:

-Animales ovulatorios regulares: el ciclo estral tiene una duración entre 4 y 6 días, donde se ve una correcta progresión de Proestro, Estro, Metaestro, Diestro. Se puede observar el pasaje de dos estros consecutivos a los largo del período evaluado de 15 días.

-Animales ovulatorios irregulares: El ciclo estral tiene una duración mayor a 4-6 días y/o no se observa una correcta progresión a lo largo del mismo de Proestro, Estro, Metaestro, Diestro. Se puede observar el pasaje de dos estros consecutivos a los largo del período evaluado de 15 días.

-Animales anovulatorios: Los animales permanecen en los estadios de Metaestro y/o Diestro o una combinación de los mismos donde se ven los tres tipos celulares (3TC), sin poder observarse una progresión del ciclo ni pasaje por Estro.

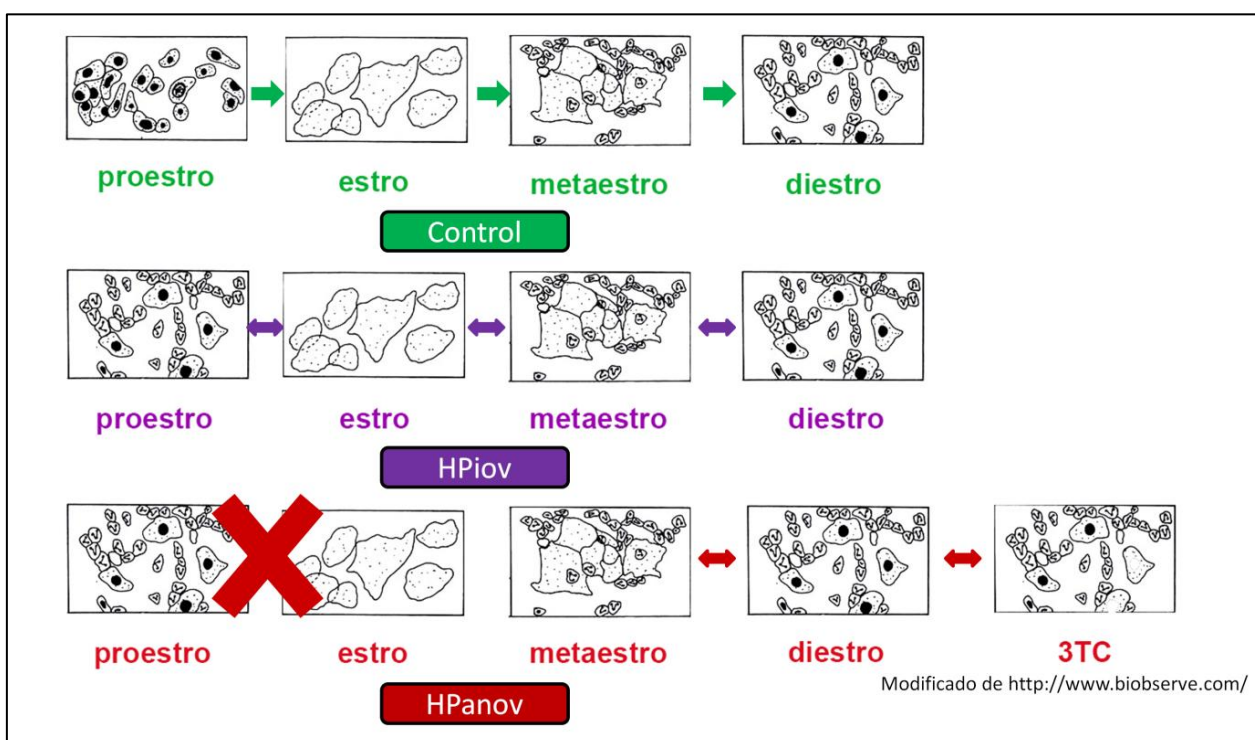


Figura 3.3: Esquema de los tipos de ciclos estrales encontrados y criterios utilizados para la determinación de los fenotipos. Proestro: se detecta presencia de células nucleadas redondas principalmente; Estro: se detecta principalmente células cornificadas; Metaestro: se detectan células cornificadas y leucocitos; Diestro: se detectan principalmente leucocitos y se puede detectar la presencia de algunas células nucleadas redondas; 3TC= corresponde a aquellos extendidos donde se identificaron los tres tipos celulares (células nucleadas redondas, células cornificadas, leucocitos) sin predominancia de ninguno de ellos.

Obtención de Tejidos

A la edad de sacrificio (60 o 90 días de edad) los animales fueron anestesiados en cámara de dióxido de carbono y se realizó eutanasia por decapitación. Se aisló el suero por centrifugación (a 1000 g durante 15 min, fraccionado y conservado a – 80 °C hasta su utilización). Se extrajeron los ovarios e hígado y se conservaron a – 80 °C hasta su utilización o en formaldehído al 4% para su posterior utilización.

Estudios histológicos

Morfología del tejido por técnica de Hematoxilina-Eosina

Para los análisis histológicos, ovarios e hígados de cada grupo experimental y diferentes animales fueron fijados en paraformaldehído al 4% (w/v) y deshidratados previamente a la inclusión en parafina. En forma resumida, los tejidos se sumergieron en etanol al 70% (EtOH) 3 veces x 10 minutos cada vez a temperatura ambiente , luego en EtOH 90% 2 veces x 20 minutos cada vez , y en EtOH 100% 3 veces x 30 minutos. Luego, se sumergieron en xileno 3 veces x 20 minutos cada uno y posteriormente embebidos en parafina a 58 °C.

A continuación, las muestras en parafina fueron cortadas consecutivamente (6 µm de espesor) y colocadas en portavidrios gelatinizados (Biobond, British Biocell International, Cardiff, UK) y secado al aire por 2 horas. Para los análisis morfológicos, los cortes (aproximadamente 6 cortes por portavidrios, 19 portavidrios promedio) de cada ovario fueron rehidratados y lavados en buffer fosfato (PBS; 137 mmol/l NaCl, 2,7 mmol/l KCl, 4,3 mmol/l Na₂HPO₄·7H₂O, 1,4 mmol/l KH₂PO₄, pH 7.3) y posteriormente teñidos con hematoxilina/eosina (DAKO Corporation, Carpintería, CA, E.E.U.U.). Se realizó un conteo y clasificación folicular y se determinó la presencia de cuerpos lúteos y quistes los cuales fueron detectados por tener un tamaño similar a los folículos preovulatorios con una fina capa de células de la granulosa rodeando un antro grande o por tener una estructura llena de fluido con una fina capa de granulosa y un engrosamiento de las capas de células de la teca(Lara et al., 2000; Abramovich et al., 2012) .

Los análisis morfológicos se analizaron por 2 personas independientemente.

Conteo folicular

Para caracterizar la morfología ovárica, se clasificaron los folículos en: folículos primordiales, folículos primarios, folículos preantrales y folículos antrales en 5 ovarios diferentes por tratamiento de acuerdo al siguiente criterio:

- *Folículos primordiales:* Compuesto por pocas células de pre-granulosa pavimentosas, poco organizadas. Estos folículos están dispersos por toda la corteza ovárica, y pueden estar en gran proporción próximos al epitelio ovárico. Además, el núcleo del oocito es grande comparado al citoplasma.

- *Folículos primarios:* Presentan una camada de células de granulosa cuboides, con la zona pelúcida rodeando al oocito. Estos folículos suelen aparecer próximos a los folículos primordiales. Pueden presentar diferentes tamaños, ya que el oocito comienza a crecer antes de que se produzca la multiplicación de las células de granulosa.

- *Folículos pre-antrales:* Estos folículos poseen más de una camada de células de la granulosa. En este estadio ya hay formación de la camada de teca interna y membrana basal que delimita el espacio entre las células de la granulosa y la teca en proliferación.

- *Folículos antrales:* Se observan claramente las capas de células de granulosa y teca, y la membrana basal que las separa. El oocito está rodeado de células de granulosa y se observa la cavidad denominada antro (o antrum).

Cuantificación de lípidos hepáticos por técnica de SUDAN IV

Con el fin de evaluar la existencia de anomalías en la deposición de lípidos en el tejido hepático causadas por la hiperandrogenización durante la etapa gestacional se cuantificó la cantidad de gotas lipídicas. A fragmentos hepáticos de cada grupo que se encontraban fijados en formaldehído se les realizaron cortes histológicos seriados (6 μm /sección cada 50 μm) los cuales fueron teñidos por Sudan IV (Woodruff et al., 1990; Regueira et al., 2016), tinción específica para detectar lípidos en los preparados. Se observó la histología bajo microscopio de luz.

Determinación de RNA mensajero en tejidos

Aislamiento de RNA

El ARN total de los tejidos (ovario e hígado) se aisló usando el reactivo con RNazol RT (MRC gene, Molecular Research Center, Cincinnati, OH, E.E.U.U.). Ovarios enteros o 50 mg de hígado se recolectaron en 100 µl de RNazol. Se homogenizaron las muestras con un homogeneizador eléctrico, para luego continuar los pasos necesarios para la separación de fases acuosa y orgánica siguiendo las instrucciones del fabricante. El pellet de ARN se resuspendió en 50 µl de agua. En todos los pasos del procedimiento se utilizó agua destilada libre de ARNasas. Se cuantificó utilizando el Nanodrop, el cual mide la absorbancia a 260 nm y evalúa su pureza por la relación de absorbancias a 260/280 nm ($> 1,8$). Se lo guardó a -70°C hasta su posterior utilización en la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

Obtención de cDNA

Se obtuvo luego el ADNc por RT-PCR a partir de 1 µg de ARN total en una solución tampón (Buffer) conteniendo 200 U de la enzima MML-V (Promega, Wisconsin, E.E.U.U.), 7.5 mM "Random Primers" (Invitrogen-Life Technologies, Buenos Aires, Argentina) y 0.5mM dNTPs en un volumen total de 25 uL. Las muestras de RNA junto con los *Random primers* fueron pre-incubadas durante 30 minutos a 65°C . Luego, se incorporó el resto de los reactivos y la reacción se llevó a cabo a 37°C durante 1 hora en el termociclador con un paso final de 5 minutos a 4°C .

Cuantificación por PCR cuantitativa en tiempo real (Real time PCR)

A partir de una dilución 1:10 para ovario y 1:5 para hígado del ADNc sintetizado se realizaron los análisis por Real time PCR utilizando 2,5 uL de cDNA junto con 10uL de solución conteniendo un mix de desoxirribonucleotidos (dNTPS) 20mM, GoTaq Polimerasa (Promega, Wisconsin, E.E.U.U.), Eva Green 20x (Biotium Hayward, CA) y *primers* (o cebadores) específicos diseñados por los programas Primer3 Input V0.4.0 y Beacon Designer (Premier Biosoft) (tabla 3.1) en un volumen total de reacción de 12,5uL. Los ensayos se realizaron por duplicado y se incluyó el control negativo de la PCR en tiempo real (en el que se omitió el ADNc molde). Los productos amplificados se cuantificaron por fluorescencia en un Rotor Gene 6000 Corbette. El programa de amplificación estándar utilizado involucró los siguientes pasos: 1) Activación: 95°C por 4 minutos; 2) Desnaturalización: 95°C por 30 segundos; 3) Hibridación: temperatura

específica para cada par de primers (ver tabla 3.1) por 25 segundos; 4) Extensión y lectura de datos: 72°C por 25 segundos. Los pasos 2 a 4 se repiten 50 veces.

La detección del producto amplificado se monitoreó en el equipo de PCR en tiempo real, el cual mide el aumento de los niveles de fluorescencia en cada ciclo de PCR causados por la unión del EVAGREEN al ADN doble cadena. El equipo determina un nivel de fluorescencia umbral dentro de la fase exponencial de la reacción. El número de ciclos que requiere cada muestra para alcanzar dicho umbral se conoce como Ct (ciclo umbral, por sus siglas en inglés: *Cycle threshold*), el cual está directamente relacionado con la cantidad inicial de molde presente en la PCR. Dado que se obtiene una señal siempre que haya moléculas de ADN doble cadena, a posteriori del ensayo de PCR se realizaron curvas de disociación (Curva de Melting) para determinar la especificidad de la señal y así eliminar falsos positivos debidos a productos inespecíficos y dímeros de primers, entre otros. La expresión relativa de los transcritos evaluados se calculó usando RPL32 (proteína ribosomal L32) y PSMB2 (subunidad beta 2 del proteasoma) como controles endógenos. La expresión matemática utilizada para calcular estas relaciones fue: $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Dónde:

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ referencia.}$

$\Delta Ct \text{ muestra} = Ct \text{ gen en estudio} - Ct \text{ gen endógeno (o media geométrica de genes endógenos).}$

$\Delta Ct \text{ referencia} = \text{promedio } \Delta Ct \text{ de las muestras control.}$

Para todos los genes evaluados se realizaron previamente ensayos de estandarización de los protocolos empleados, que involucraron la evaluación de curvas de rango dinámico de amplificación del transcrita de interés y posteriores curvas de disociación.

Cebadores usados en la PCR en tiempo real		
Gen	Secuencia de cebadores utilizados	Temperatura de pegado (°C)
17 BHSD F	AACCGGGTCAGAACAAAT CA	60
17 BHSD R	CAGAAGGAGAAGCAGGTGGA	
3BHSD F	GACACCCCTCACCAAAGCTA	60
3BHSD R	TTGTAAAATGGACGCAGCAG	
Acaca F	CCAGACCCTTTCTTCAGCAG	62
Acaca R	AGGACCGATGTGATGTTGCT	
Acacb F	CAAAGCCTCTGAAGGTGGAG	62
Acacb R	CTCGTCCAAACAGGGGACACT	
Acat 1 F	GACGGGCTAACCGATGTCTA	62
Acat 1 R	ATGGTGATGGGCGTAATCTC	
Adiponectina F	TAGCCCCGAGAATCAAAGAA	58
Adiponectina R	TGCAATGTCAAAGTGGCAAT	
Chrebp F	GGTTGTCCCCAAAGCAGAGA	62
Chrebp R	TTGTTGTCTACACGACCCCG	
CMKLR1 F	ATGCCGCTATGGACTACCAC	62
CMKLR1 R	ACAACCACGCAGGTCATGTA	
CYP17A1 F	TCTCATTACCCCACGCAGA	60
CYP17A1 R	CGGGGCAGTTGTTTATCATC	

<i>CYP19A1 F</i>	CCTGGCAAGCACTCCTTATC	60
<i>CYP19A1 R</i>	CCACGTCTCTCAGCGAAAAT	
<i>Fas F</i>	TCGAGACACATCGTTTGAGC	62
<i>Fas R</i>	CCCAGAGGGTGGTTGTTAGA	
<i>FSH- R F</i>	CTCATCAAGCGACACCAAGA	60
<i>FSH-R R</i>	GGAAAGGATTGGCACAAGAA	
<i>Hmgcr F</i>	TGCTGCTTTGGCTGTATGTC	62
<i>Hmgcr R</i>	TGAGCGTGAACAAGAACCAG	
<i>L32 F</i>	TGGTCCACAATGTCAAGG	58
<i>L32 R</i>	CAAAACAGGCACACAAGC	
<i>Leptina F</i>	GGTGGCTGGTTTGTCTGT	62
<i>Leptina R</i>	TATGTGGCTGCAGAGGTGAG	
<i>Ldl-r F</i>	AGACCCAGAGCCATCGTAGT	62
<i>Ldl-r R</i>	ATCAACCCAATAGAGGCGGC	
<i>LH-R F</i>	AGGAGGCACAGATGCAAACT	60
<i>LH-R R</i>	AACAAGATGGGCTGAGATGG	
<i>Pgc1a F</i>	AATGCAGCGGTCTTAGCACT	60
<i>Pgc1a R</i>	GTGTGAGGAGGGTCATCGTT	
<i>PPARg1+2 F</i>	TTTTCAAGGGTGCCAGTTTC	60
<i>PPARg1+2 R</i>	GAGGCCAGCATGGTGTAGAT	

<i>PPARγ2 F</i>	CTGTTATGGGTGAACTCTGG	62
<i>PPARγ2 R</i>	GAAATCAACCGTGGTAAAGG	
<i>PSMB2 F</i>	TCGGAGTCGGACCCCTTATC	62
<i>PSMB2 R</i>	TGTAGTAAAGTGCTGGCCCC	
<i>Quemerina F</i>	GGCACCTTTGTGAGGCTGGAA TTT	62
<i>Quemerina R</i>	ACC CTG TCCGGGGCTTATTTGGAT	
<i>Scd1 F</i>	GCTTCCAGATCCTCCCTACC	62
<i>Scd1 R</i>	CAACAACCAACCCTCTCGTT	
<i>Srb1 F</i>	GGTGCCCATCATTTACCAAC	62
<i>Srb1 R</i>	CCCTACAGCTTGGCTTCTTG	
<i>Srebp F</i>	TAACTGGCTGAGTGTGCAG	60
<i>Srebp R</i>	ATCCACGAAGAAACGGTGAC	
<i>StAR F</i>	GCAGGGGGATTCTGAATTT	60
<i>StAR R</i>	GTCTCCGTCTCTGTGGCTTC	

Tabla 3.1: Lista de cebadores usados en la PCR en tiempo real. F, hacia adelante R, reverso.

Determinación de niveles proteicos en tejidos

Extracción de proteínas

A ovarios enteros se le agregaron 100ul de Buffer de lisis (Tris-HCl 0,02M (3,15/l), NaCl 0,15M (8,77g/l), Tritón 1% (v/v) pH= 7,4 cóctel inhibidor de proteasas 2% v/v (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.E.U.U.)) cada 100ul de volumen de homogeneización. Luego las muestras fueron homogeneizadas en frío hasta destruir completamente el tejido, dejándolo 2hs a 4°C. Finalmente, se centrifuga a 10.000 g durante 10 minutos a 4°C y sobre el sobrenadante se

determina el contenido de proteínas por método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, E.E.U.U.) (Bradford, 1976). Las muestras fueron fraccionadas y almacenadas a -20°C hasta su utilización en la técnica de Western Blotting.

Corrida electroforética

Las muestras fraccionadas se disolvieron en solución desnaturalizante (10 mM Tris-HCl pH 6,8; SDS 2% p/v; glicerol 10% v/v; azul de Bromofenol 0,06 % p/v; b-mercaptoetanol 1% v/v) y se calentaron a baño maría a 95°C durante 5 min. Se sembró 50 ug de proteína/ 20uL de volumen por cada muestra en un gel de poliacrilamida al 12% o 10% con SDS (condiciones desnaturalizantes). La electroforesis se realizó a voltaje constante a 80 Volts por 1,5 hs. Además de las muestras de interés se sembró un marcador de peso molecular de proteínas (Rainbow-coloured protein mass markers 14.3-200 kDa, BioRad).

Transferencia

Las proteínas separadas luego de la corrida electroforética se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en un buffer de transferencia (20% metanol, vol/vol; 0.19 M glicina; 0.025 M Tris-Base, pH= 8.3) durante 1,5 hs a amperaje constante, 400mA, en baño de hielo utilizando una celda de transferencia mini-electroforética (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Para verificar que la transferencia se llevó a cabo correctamente, 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).

Inmunodetección de proteínas de interés

Las membranas fueron incubadas por 60 minutos en TBS (Tween 20 0,1% v/v, 1X TBS) conteniendo leche descremada al 5% a temperatura ambiente con agitación suave para bloquear las uniones inespecíficas. Luego, se realizaron lavados con T-TBS a fin de eliminar el exceso.

Posteriormente las membranas son incubadas con el anticuerpo primario de interés (tabla 2) diluido en TTBS leche descremada 5% durante toda la noche a 4°C.

Las membranas fueron lavadas con T-TBS seguido de una incubación por 1 hora a temperatura ambiente en agitación con anticuerpo secundario Ig-G de cabra anti-conejo o conejo anti-ratón (según anticuerpo utilizado) ligado a HRP –Horse Recombinant Peroxidase- (1:5000, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, E.E.U.U. ó 1: 5000, ab6728, Abcam). Posteriormente el exceso de anticuerpo fue retirado de las membranas mediante lavados con

T-TBS y, a continuación, se las incubó con reactivos de detección de quimioluminiscencia (ECL) (Sigma-Aldrich).

Las bandas inmunoreactivas se determinaron usando un analizador de imágenes (GeneGnome XRQ, Syngene Synoptics Goup, Cambridge, Reino Unido). La intensidad de las bandas fue analizada empleando el programa Image J (Schneider et al., 2012), teniendo en cuenta tanto la superficie como a la intensidad de las mismas, expresándose en unidades densitométricas arbitrarias relativas al control, luego de normalizarlo según el valor densitométrico correspondiente a la B-tubulina o a la B-actina.

Anticuerpo	Dilución utilizada	
Adiponectina	ABCAM (ab22554)	1:1000
B-Actina	SIGMA (A2228)	1:1500
B-Tubulina	ABCAM (ab131205)	1:1500
Leptina	Santa Cruz (sc393043)	1:400
PGC1a	Santa Cruz (sc13067)	1:200
PPARγ1+2	ABCAM (ab41928)	1:1000
Quemerina	ABCAM (ab112540)	1:800
IgG anti-rabbit	Santa Cruz (sc2030)	1:1500
IgG anti-mouse	ABCAM (ab6728)	1:5000

Tabla 3.2: Anticuerpos utilizados.

Análisis de parámetros relacionados con el balance oxidativo en tejido hepático

Las muestras del tejido hepático (150 mg) fueron homogeneizadas en TCA 0,5% p/v a 4°C por 5 minutos el homogenato fue centrifugado a 9.000g durante 10 min a 4°C. Se recogió el sobrenadante, se lo fraccionó para los ensayos de glutatión total y peroxidación lipídica.

Determinación del contenido total del metabolito antioxidante glutatión (GSH)

El método utilizado aquí para la determinación del contenido de GSH (Tietze, 1969) se basa en la reacción de reducción del ácido 5,5-ditiobis-2 nitro benzoico (DTNB), llevada a cabo por el glutatión reducido (GSH), en medio reductor. Al reducirse, el DTNB forma un compuesto coloreado, el 5-tio-2 nitrobenzoato (TNB) que es posible cuantificar a 412 nm (Ecuación 3.1) . Para medir el glutatión total, se agrega glutatión reductasa (GR) al medio, enzima que cataliza el pasaje de glutatión oxidado (GSSG) a su forma reducida. Para la medición de la concentración de GSH, a 100ul de homogenatos de hígado se agregaron 900 ul de buffer fosfato 50 mM, 50 ul de NADPH, 20 ul del reactivo de Ellman (DTNB) y, en último lugar, 20 ul

de GR. Considerando la linealidad de la reacción, se registró la absorbancia a cada minuto, durante los primeros 6 minutos a fin de determinar la pendiente de la reacción. Con el objeto de cuantificar el contenido de GSH, se comparó con la pendiente de una reacción que se incubó con una concentración de GSH conocida. Los resultados se expresaron como umoles de GSH/g de tejido.



Ecuación 3.1: Reacción de oxidación del GSH y reducción del DTNB en medio reductor.

Obtención del índice de peroxidación lipídica por cuantificación de malondialdehído (MDA)

Los radicales libres producidos en las células actúan provocando la ruptura de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares. Este tipo de reacciones tienen entre sus subproductos al malondialdehído (MDA). Es así, que la concentración de este compuesto puede ser tomada como un indicador de peroxidación lipídica (Buege y Aust, 1978). El MDA es capaz de combinarse con el ácido tiobarbitúrico (TBA) formando un reactivo de color (TBARs: especies reactivas del TBA) que puede cuantificarse a 535 nm en espectrofotómetro, permitiendo estimar de esta manera la concentración de MDA.

Para evaluar la concentración de MDA en hígados 350 µl de los tejidos homogeneizados se incubaron con 650 µl de ácido tiobarbitúrico 0,67 % p/v (TCA 15% p/v, TBA 0.375 % p/v, HCl 0.25 N) por 20 minutos a 95°C. La reacción se detuvo por inmersión en hielo, leyéndose la absorbancia a 535 nm dentro de los siguientes 5 minutos. Se realizó una curva patrón de MDA (Sn stock MDA: 25 µl de MDA con 100 ml de HCl 0.1 N, se guarda en frasco oscuro; HCl 0.1 N = 1.6 ml de HCl (12N) + 200 ml de H₂O bidestilada) en TCA 5% p/v (2,5 ml TCA + 47,5 ml H₂O bidestilada) cuyo rango de concentración varía desde 0.0125 - 24 mM. Los resultados se expresaron como nmoles MDA/g tejidos.

Análisis de interacción proteica por co-IP

Se homogenizaron 25 mg de ovario (n=5 ovarios por tratamiento) en 500 µL de buffer de lisis no desnaturante (200 mM Tris-HCl pH=8, 137 mM NaCl, 10% glicerol, % NP-40, 2 mM EDTA pH=8). Al momento de realizar la homogenización del tejido se agregaron 5 µL de coctel

inhibidor de proteasas (Sigma, E.E.U.U.) cada 25 mg de tejido utilizado. El homogenato se dejó en incubación en agitación constante a 4°C durante 2 hs. Se realizó una centrifugación a 10000g en frío durante 20 minutos y se recuperó el sobrenadante. Se agregó 1ug de anticuerpo anti PPAR γ 1+2 (Abcam, E.E.U.U.) y se dejó en incubación toda la noche en agitación constante a 4°C. Se agregaron 30uL de perlas de proteína A/G (Santa Cruz, sc-2003) y se incubó toda la noche en agitación constante a 4°C. Luego de la incubación se realizó una centrifugación de 1 minuto a 2000 g con el fin de precipitar las perlas junto con el anticuerpo y complejos proteicos. Se descartó el sobrenadante y sobre el precipitado se realizaron 3 lavados que consistieron en 4 pasos cada uno de ellos:

A) agregado de 200uL de con solución tampón RIPA modificado conteniendo mayor concentración de SDS (50 mM Tris-HCl pH=8, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA pH=8, 1% NP-40, 0,5% Deoxicolato de sodio, 0,2% SDS) con inhibidor de proteasas;

B) centrifugación a 2000g por 1 minuto, descartándose el sobrenadante y recuperándose el precipitado;

C) lavado con agua destilada calidad biología molecular;

D) centrifugación a 2000g por 1 minuto, descartándose el sobrenadante y recuperándose el precipitado.

Luego del último lavado y centrifugación, al precipitado se le agregaron 50uL de solución tampón Laemli 2X (4% SDS, 20% glicerol, 0,004% azul de bromofenol, 0,125M Tris-Cl pH= 6,8, 10% 2-mercaptoetanol). Se incubó a 95°C durante 7 minutos con el objetivo de separar las perlas de los complejos proteicos obtenidos. Se realizó una centrifugación a 5000 g durante 1 minuto y se recuperó el sobrenadante. El cual se sembró en un gel 12% de poliacrilamida con SDS en condiciones desnaturalizantes siguiendo el procedimiento detallado en el apartado anterior.

Junto con las muestras a analizar se realizó un control negativo de la técnica, en el cual se siguió el procedimiento total con la excepción de la incubación con anticuerpo. Asimismo en los geles se sembró un control de muestras proteicas de concentración conocida y previamente probadas en la técnica de determinación de proteínas por Western Blott.

Determinación de colesterol y ésteres de colesterol en ovario

La extracción de lípidos del tejido ovárico se realizó según el método de Bligh y Dyer (Bligh y Dyer, 1959). Ambos ovarios de cada animal (aproximadamente 80 mg totales) se homogeneizaron en 1000ul de PBS 1X, de los cuales 500 ul se sometieron a dos rondas de

extracciones con 3,5ml de la mezcla de solventes Bligh-Dyer (Cloroformo 1: Metanol 2). Se particionó el volumen de extracción con 1,5 ml de agua y 1,5 ml de cloroformo, y posteriormente al centrifugado, se descartó la fase superior acuosa y la fase orgánica se evaporó a sequedad en estufa de vacío. El residuo se reconstituyó con 1 ml de mezcla Bligh-Dyer. Volúmenes equivalentes al mismo contenido de proteína fueron evaporados, reconstituídos en 25 ul de Bligh-Dyer y desarrollados en placas de sílica gel mediante la técnica de cromatografía en capa delgada. Junto a las muestras se desarrolló también una curva estándar conteniendo cantidades conocidas de las distintas especies lipídicas a analizar. La mezcla de solventes para el desarrollo de la placa fue hexano: éter: ácido acético (80:20:2, V:V:V) (Capobianco et al., 2008). Las placas se desarrollaron y posteriormente se reveló la presencia de las distintas especies lipídicas con vapores de yodo. El yodo se combina con las moléculas hidrofóbicas, evidenciando la presencia de los lípidos por la aparición de manchas marrones. Estas imágenes fueron digitalizadas y se procedió al análisis de la intensidad y área de las manchas utilizando el programa JustQuantifyFree Web de Sweday (<http://www.sweday.com/JustQuantifyFreeOverview.asp>) desarrollado para cuantificaciones de placas de TLC. Los valores obtenidos se refirieron a la curva realizada con las lecturas de las imágenes obtenidas de colesterol y ésteres de colesterol estándares sembrados en cantidades conocidas. Los resultados se expresaron como ug de especie lipídica/mg proteínas.

Determinación de triglicéridos en hígado

Con el objetivo de determinar el contenido hepático de triglicéridos se tomaron fragmentos de hígado de aproximadamente 150 mg de diferentes animales de cada fenotipo los cuales se trataron con 350 ul de KOH etanólico (2 EtOH 100%: 1 KOH 30%) y se incubó toda la noche a 60°C para garantizar la completa digestión. Luego de la incubación se neutralizaron las muestras con H₂O:EtOH (1:1), llevando a un volumen final de 1 ml. Luego de centrifugar se rescató el sobrenadante y se diluyó nuevamente con H₂O:EtOH (1:1) llevando a un volumen final de 1,2 ml. Se agregaron 215 ul de MgCl₂ y se incubó a 4°C por 10 minutos. Luego de centrifugar se rescató la fase superior y se determinó el contenido de triglicéridos comparando con una curva de glicerol estándar, mediante un ensayo enzimático colorimétrico por kit comercial (Wiener LAB, Argentina)(Chow et al., 2011).

Determinaciones séricas

En suero de ratas se realizó la medición sérica de LH, FSH, testosterona, estradiol, progesterona, enzimas hepáticas (ALT(alanina aminotrasferasa), AST (aspartato

aminotransferasa) y GGT (gama glutamil transpeptidasa)), glucosa, insulina, índice HOMA-IR (índice homeostático de IR) y perfil lipídico.

Radioinmunoensayo(RIA) para la determinación de LH y FSH

Los niveles séricos de LH y FSH a 60 y 90 días fueron determinados por kits de RIA siguiendo los protocolos estandarizados. (Lacau de Mengido et al., 1987; Lacau-Mengido et al., 1996). Los coeficientes intra e inter ensayos fueron menores a 10% y 13%, respectivamente. Los niveles de LH y FSH se expresaron en ng/mL.

Radioinmunoensayo de Testosterona en suero

Los niveles de T a 60 y 90 días fueron determinados por RIA específico, según se describió previamente en el laboratorio (Amalfi et al., 2012). Brevemente, muestras séricas de 6 ratas por tratamiento se extrajeron con el mismo volumen de dietil éter por 3 veces. Los extractos fueron colectados y evaporados en una bomba de vacío y almacenados a -80 °C hasta la realización del RIA. Luego, los reactivos y las muestras se reconstituyen en el Buffer de RIA (Tris HCl 0,05 M, NaCl 0,1 M, Gelatina 0,1 %, Azida Sódica 0,1%, pH 8). Tanto las muestras patrones como las muestras a ensayar (100 ul) se incubaron a 4 °C ON con 200 ul del anticuerpo anti-T y 100 ul del metabolito marcado con tritio-[2,4,6,7,16,17-3H] T, 250μCi, Amersham Corporation, Arlington Heights, E.E.U.U.). Se utilizó para separar las uniones específicas una suspensión de carbón activado-dextrán (Carbón 1%, Dextrán 0,1 % en Buffer RIA) y centrifugación a 2000g por 15 minutos a 4°C en centrífuga refrigerada (Sorvall RC-5B). El sobrenadante de centrifugación fue recogido en viales conteniendo líquido de centelleo, y la radioactividad se cuantificó en un contador de centelleo líquido beta. La sensibilidad del anticuerpo para E2 fue de entre 5–10 pg/tubo, y entre 2–5 ml de suero. Las variaciones intra e inter ensayo fueron de 5,0 and 10,0%, respectivamente.. El rango de utilidad del ensayo de la T fue de 25–1600 pg. Las variaciones intra e inter ensayo fueron de 7,5 y 15,1 respectivamente, y la reacción cruzada entre T y DHEA es < 0,01 pg. Los resultados se expresaron como pg T/ml suero.

Análisis por ELISA de estradiol

Los niveles séricos de estradiol a 60 y 90 días fueron cuantificados por un inmunoensayo COBASE realizando un ensayo de inmunolectro-luminiscencia(ECLIA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los coeficientes intra e inter ensayo fueron de 3,93% y 7,08%, respectivamente. Los resultados se expresaron en ng E2/ml.

Análisis de Progesterona por RIA

Los niveles de progesterona en suero fueron cuantificados por radioinmunoensayo (Abraham et al., 1971; Martinez Calejman et al., 2011). Muestras séricas se extrajeron 2 veces con ciclohexano. En cada extracción se separó la fase orgánica y se llevó a evaporación con calor. Los esteroides se resuspendieron en 100ul de PBS 1x. se agregaron a las muestras 100 µl de la progesterona marcada con tritio y 100 µl de la dilución apropiada del anticuerpo anti progesterona. Se incubaron a 4°C durante toda la noche, se agregaron 200 µl de carbón/dextrano y se centrifugaron a 3.200 rpm durante 15 minutos. Una alícuota del sobrenadante fue contada en un contador de centelleo líquido. Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 10,9% y 12,8 %, respectivamente. Los valores se expresaron en ng de progesterona /ml de suero.

Análisis de enzimas hepáticas ALT, AST y GGT

Los niveles séricos de ALT, AST y GGT a 60 días fueron cuantificados por métodos enzimáticos colorimétricos por kit comercial (Wiener Lab, Argentina) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos cromóforos fueron medidos a 340 nm para ALT y AST, y a 405 nm para GGT, todos a 25°C. Los coeficientes intra- e interensayo fueron 3.02 and 5.63% para ALT, ALT, 4.4 y 4.9% para AST, y 1.62 and 5% para GGT.

Análisis por ELISA de insulina

Los niveles basales de insulina sérica a 60 y 90 días fueron medidos por KIT de ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante (Abcam Insulin Human ELISA Kit). Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron 10 y 12%, respectivamente.

Análisis de glucosa basal y curva de glucosa.

Los niveles de glucemia basal fueron medidos a 60 y 90 días por tiras reactivas One Touch Ultra Mini (Johnson & Johnson Medical S.A). El rango de medición del aparato es de 20 - 600 mg/dl.

Asimismo, a los 60 días de edad se evaluó el test de tolerancia a la glucosa. Se tomaron 6 animales de 60 días de edad de cada fenotipo, previo ayuno de 8 horas, los cuales fueron inyectados intraperitonealmente con 2 ml de una solución (30g de dextrosa en 100 ml de H₂O bidestilada). Posteriormente, se le tomaron muestras de sangre proveniente de la cola a tiempo 0, 30, 60 y 90 minutos y se midió el contenido de glucosa en sangre utilizando las tiras reactivas One Touch Ultra Mini (Johnson & Johnson Medical S.A). El rango de medición del aparato es de 20 -600 mg/dl. Los datos obtenidos fueron utilizados para graficar el área bajo la

curva de ambos grupos experimentales. El área bajo la curva de glucosa nos va a indicar cierto grado de insulino resistencia.

Cálculo del índice HOMA-IR

Se realizó el cálculo del modelo homeostático (HOMA-IR, por sus siglas en inglés) como índice para evaluar insulino resistencia en los animales a 60 y 90 días de edad (Ecuación 3.2) .

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{insulina en ayuno (uUI/ml)} \times \text{glucosa en ayuno (mg/dl)}}{450}$$

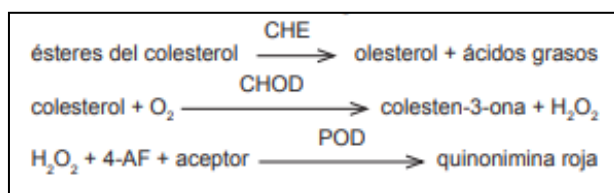
Ecuación 3.2: Cálculo de HOMA-IR

Determinación del perfil lipídico

Se analizaron en suero a 60 y 90 días los niveles de colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL y triglicéridos.

Determinación de colesterol total

El colesterol total se midió utilizando un kit enzimático colorimétrico (Colestat enzimático AA, Wiener lab, Argentina). El kit se basa en la detección del peróxido de hidrógeno que resulta como producto de degradación del colesterol presente, según la siguiente reacción (Ecuación 3.3):



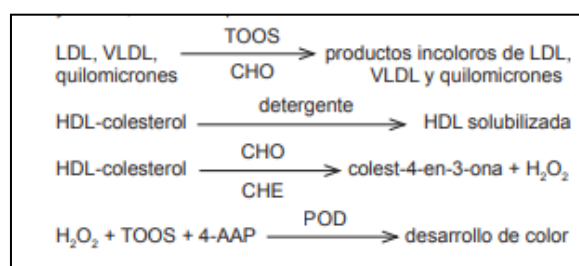
Ecuación 3.3: reacción de liberación de peróxido de hidrógeno a partir de colesterol, donde 4-AF es 4-aminofenazona (Colestat enzimático AA, Wiener lab, Argentina) .

El producto final de la reacción se mide en espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm. Los resultados se calculan como: colesterol total (g/L) = Densidad óptica de la muestra*f, donde f= 2 g/L/estándar. El límite de detección es de 0.63 mg/dL.

Determinación de colesterol HDL

El colesterol HDL se midió utilizando un kit enzimático colorimétrico (HDL Colesterol Monofase AA plus, Wiener lab Argentina). La reacción de detección se basa en un método colorimétrico sin precipitación que detecta el producto de degradación del colesterol HDL basándose en una reacción en dos etapas, en la primera se solubiliza y consume el colesterol libre o unido a proteínas distintas de HDL, dando un producto no coloreado.

En una segunda etapa, un detergente solubiliza específicamente las proteínas unidas a HDL. Deesa forma, el colesterol HDL es liberado pudiendo reaccionar con la esterasa de colesterol y la oxidasa de colesterol resultando en un producto coloreado por medio de una reacción con peroxidasa (Ecuación 3.4).

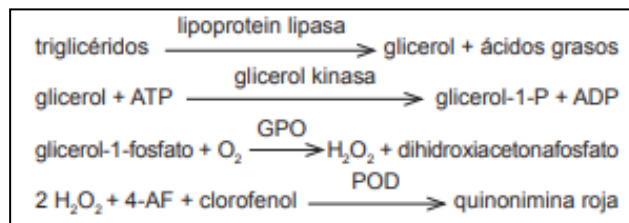


Ecuación 3.4: reacción para la cuantificación de colesterol HDL (HDL Colesterol Monofase AA plus, Wiener lab Argentina) .

Se miden los productos de ambas partes de la reacción (producto no coloreado y el coloreado) en espectrofotómetro a 600nm. La concentración de HDL se calcula a partir de la diferencia de ambos valores de absorbancia tomando como referencia el valor calculado para el calibrador, medido en simultáneo. La concentración mínima detectable es de 4mg/dL.

Determinación de Triglicéridos(TG)

Los valores séricos de TG se midieron utilizando un kit enzimático colorimétrico (triglicéridos color GPO/PAP AA, Wiener lab Argentina). Se basa en un método enzimático de degradación de Triglicéridos a un producto coloreado rojo, la quinonimina (Ecuación 3.5).



Ecuación 3.5: reacción para la cuantificación de Triglicéridos (H triglicéridos color GPO/PAP AA, Wiener lab Argentina).

Determinación de colesterol LDL

El colesterol LDL se estimó indirectamente por fórmula (Friedewald et al., 1972) (Ecuación 3.6).

$$\text{LDL} = \text{Colesterol total} - \text{HDL} + \text{TG}/5.$$

Ecuación 3.6: cálculo de colesterol LDL según fórmula de Friedewald y colaboradores (1972).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa InfoStat (<http://www.infostat.com.ar>), e Instat program (GraphPad software, San Diego, CA, E.E.U.U.). Se aplicó la prueba de Shapiro- Wilks para testear la distribución normal de las muestras y la prueba de Levene para analizar la homogeneidad de varianza. En los casos en que alguno de los supuestos no se cumplió, los datos se transformaron a Log10 y se analizaron de dicha forma (previa corroboración de normalidad y homocedasticidad de la variable a analizar). En dichos casos, las variables volvieron a retransformarse a la variable original para realizar los gráficos. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) con test post-hoc de Tukey para comparar entre los tres fenotipos o análisis por test de *t-Student*, en el caso de comparaciones entre dos grupos. Los porcentajes fueron analizados por Prueba de chi-cuadrado (χ^2), como fue el caso de las etapas del ciclo estral.

Para el estudio de asociación entre la proporción de animales con fenotipo anovulatorio respecto de las hembras por camada (clasificados como anovulatorios o no) y el número de: crías, hembras o machos por camada, se aplicó un análisis por modelo lineal generalizado (GLM, por sus siglas en inglés) con una distribución binomial . Este análisis se realizó utilizando el paquete estadístico R y el "R studio" (R Core team 2014), los gráficos se realizaron con el programa Instat program (GraphPad software, San Diego, CA, E.E.U.U.) para mantener la homogeneidad en los gráficos.

En la leyenda de cada figura, de los distintos resultados, se indican las pruebas estadísticas utilizadas. En todos los casos los resultados fueron expresados como las medias $\pm$ el desvío estándar (D.E.).

B- Estudios en población de pacientes con SOP local

Reclutamiento y selección de pacientes y población control

Población SOP:

Se reclutaron 110 pacientes con diagnóstico de SOP, entre 18 y 35 años atendidas en la división Endocrinología del Hospital Durand (Ciudad autónoma de Buenos Aires) y de la División Ginecología del Hospital Posadas (Provincia de Buenos Aires). El diagnóstico de SOP se realizó según los criterios de Rotterdam (2003), que incluye al menos dos de los siguientes componentes:

- a) hiperandrogenismo clínico o bioquímico
- b) morfología de ovario poliquístico por ecografía encontrando al menos un ovario con 12 o más folículos de 2-9 mm y/o volumen ovárico mayor a 10 cm³
- c) disfunción ovulatoria definida por la presencia de oligo o amenorrea (ciclos mayores a 35 días o ausencia de ciclos por 90 días o más, respectivamente).

Las pacientes con SOP reclutadas no estaban recibiendo (al menos hasta 2 meses antes de la extracción de sangre) terapia hormonal, fármacos que modifiquen la insulina u otros tratamientos que pudieran afectar el metabolismo o el eje gonadal.

Se establecieron como criterio de exclusión la presencia de: enfermedades hipofisarias, adrenales y ováricas incluyendo hiperplasia suprarrenal congénita (déficit de 21 hidroxilasa), tumores productores de andrógenos y síndrome de Cushing, así como también pacientes con historia de diabetes gestacional, enfermedades hepáticas e hiperprolactinemia.

Los pacientes firmaron un consentimiento informado escrito que fue conducido de acuerdo a la declaración de Helsinki y el estudio fue aprobado por los Comité de Ética del Hospital Carlos G. Durand (DI-2014-54-HGACD), del Hospital Nacional Profesor Alejandro Posadas y de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires.

Población control:

Se reclutaron 88 mujeres controles. Que fueron incluidas tomando como criterios: una edad de entre 18 y 35 años. Pacientes sanas, residente en áreas urbanas de Buenos Aires (C.A.B.A. o conurbano bonaerense), sin antecedentes personales patológicos previos exceptuando la posible existencia de hipertensión, dislipidemia y/o sobrepeso/obesidad. Asimismo se establecieron como criterios de exclusión: la anormalidad en los ciclos menstruales, signos visibles de acné o hirsutismo, presencia de ovarios poliquísticos por ecografía, antecedentes de diabetes gestacional, antecedentes de diabetes en familiares de primer grado, factores de riesgo cardiovasculares, embarazo, antecedentes psiquiátricos, enolismo, toxicomanía, antecedentes o sospecha de pancreatitis, ingesta recientes (<3 meses) de hiperglucemiantes (v.g. glucocorticoides), inestabilidad en el peso corporal (pérdida de >3 kg en los últimos 6 meses).

Las mujeres controles firmaron un consentimiento informado escrito conducido de acuerdo a la declaración de Helsinki y el estudio aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Clínicas José de San Martín, Hospital Carlos G. Durand y de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires .

Fenotipificación clínica

En cada individuo reclutado, se incluyeron datos antropométricos, clínicos y biológicos y antecedentes familiares.

Se determinaron:

- **Medidas antropométricas**

Peso, Talla, Índice de Masa Corporal (IMC), Circunferencia de la Cintura (CC) se determinaron mediante un protocolo estandarizado. Evaluación de Características clínicas para clasificarlos en los grupos de estudio correspondientes. Medición de presión arterial sistólica y diastólica (PAS y PAD, respectivamente).

- **Parámetros metabólicos**

Las muestras séricas fueron tomadas por la mañana luego de 12hs de ayuno, entre los días 1-3 del ciclo menstrual (fase folicular temprana), en caso de que las

pacientes fuesen oligomenorreicas o presentasen ciclos menstruales regulares o irregulares. En caso de pacientes con amenorrea, se tomó la muestra de sangre y suero en cualquier momento del ciclo.

En todas las pacientes tantos controles como SOP se realizó el dosaje de glucemia e insulinemia y el perfil lipídico básico (triglicéridos, colesterol, HDL colesterol, LDL colesterol). Al grupo de mujeres con SOP se les evaluó: el exceso de andrógenos por la presencia de hiperandrogenemia, midiendo la testosterona total, DHEA-S y/o $\Delta 4$ androstenediona o por la evidencia de clínica de hiperandrogenismo, la cual fue determinada por la presencia de hirsutismo de acuerdo al puntaje de Ferriman-Gallway modificado (FGm) ≥ 8 o por la presencia de acné y/o alopecia androgénica.

- **Determinación de fenotipo en pacientes con SOP**

Las pacientes con SOP fueron subclasificadas en fenotipo hiperandrogénico (HA) si presentaba signos de hiperandrogenismo(bioquímico y/o clínico), o en caso contrario en fenotipo normoandrogénico (NHA).

Determinación de marcadores de riesgo cardiovascular (RCV) y establecimiento de valores de corte

Se realizaron los cálculos de los índices conocidos como índice de adiposidad visceral (VAI, por sus siglas en inglés: *Visceral Adiposity Index*) (Ecuación 3.7) (Amato et al., 2010, 2011) y el producto de acumulación lipídica (LAP, por sus siglas en inglés: *Lipid accumulation product*) (Ecuación 3.8) (Kahn, 2005) como marcadores tanto de IR como de RCV.

$$\text{VAI} = \text{CC}/36,58 + (1,89 \times \text{IMC}) \times \text{TG}/0,81 \times 1,52/\text{HDL}$$

Ecuación 3.7: fórmula para el cálculo de VAI

$$\text{LAP} = (\text{CC (cm)} - 58) \times \text{TG (nmol/L)}$$

Ecuación 3.8: fórmula para el cálculo de LAP

La IR fue estimada en forma indirecta utilizando valores de glucemia e insulinemia en ayuno para calcular el modelo homeostático de IR (Ecuación 3.9,a) (Matthews et al., 1985), el índice de insulino sensibilidad QUICKI (Ecuación 3.9, b)(Katz et al., 2000) y la razón glucemia a insulinemia (Legro et al., 1998) (Ecuación 3.9, c).

A

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{insulina en ayuno (uUI/ml)}}{\text{glucosa en ayuno (mg/dl)}} \times 450$$

B

$$\text{QUICKI} = \frac{1}{\log \text{ insulinemia basal (IU/mL)} + \log \text{ glucemia basal (mg/dl)}}$$

C

$$\text{GLC/INS} = \frac{\text{Glucemia (mg/dl)}}{\text{Insulinemia (IU/mL)}}$$

Ecuación 3.9: Fórmulas utilizadas para los cálculos de los índices de IR. A) HOMA-IR, B) QUICKI, C) GLC/INS.

Marcadores tradicionales de RCV como el índice CT/HDL (Millán et al., 2009) y TG/HDL (McLaughlin et al., 2005; da Luz et al., 2008) fueron utilizados como marcadores de RCV para comparar con LAP y VAI. Se tomaron como valores de corte para los marcadores de RCV tradicionales los ya utilizados por otros autores (Siniawski et al., 2011; Salazar et al., 2012). Estableciéndose RCV en aquellas pacientes que presenten valores de $\text{CT/HDL} \geq 3,2$ o $\text{TG/HDL} \geq 2,5$, según el marcador considerado.

A pesar que el clamp euglucémico-hiperinsulinémico fue establecido como el estudio *gold-standard* para la determinación de IR, existen dificultades para su aplicación por lo que el índice HOMA-IR se utilizó como herramienta para evaluar IR ya que correlaciona con el clamp (Bonora et al., 2000). El índice HOMA-IR se utilizó para calcular el mejor valor de corte para VAI y LAP. También se estudió la asociación entre LAP y VAI y los diferentes parámetros involucrados en el RCV como se describe en el III Panel de tratamiento adulto (ATP III) para la evaluación de la presencia de Síndrome metabólico (Tabla 3.3) (Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, 2001).

Componentes del síndrome metabólico según ATP III	
CC	≥ 88 cm
Glucemia	≥ 110 mg/dl
HDL	< 50 mg/dl
TG	≥ 150 mg/dl
Presión arterial sistólica (PAS)	≥ 130 mmHg
Presión arterial diastólica (PAD)	≥ 85 mmHg

Tabla 3.3: Componentes del síndrome metabólico (SM) según la definición del III Panel de tratamiento adulto (ATP III), según el cual la presencia de SM queda definida por la presencia de al menos 3 de las 5 características: Circunferencia de cintura alta, glucemia alta, bajos niveles de HDL, altos niveles de triglicéridos, presión arterial alta.

Determinación de quemerina sérica

Se realizó un cálculo del n necesario para la cuantificación de quemerina sérica. La determinación se realizó mediante ensayo de ELISA Sandwich por kit comercial (ab155430, Abcam, E.E.U.U.). Se diluyeron los sueros 1:4 v/v según las indicaciones del fabricante, las muestras se midieron junto con una curva de calibración usando reactivos dados por el fabricante. Los productos coloreados se midieron en espectrofotómetro a 450nm. Los resultados se expresan en ng/mL. Los coeficientes de variación intra e interensayo son 10% y 12%, respectivamente.

Análisis estadístico

Los datos se presentan como media $\pm$ desvío estándar (D.E.) o mediana y rango intercuartilico según sea distribución normal o asimétrica respectivamente.

Se realizaron análisis de correlación mediante la utilización de los coeficientes de Pearson o Spearman, según el carácter de la variable a analizar. El test de chi-cuadrado se utilizó para ver la asociación entre variables categóricas. En los casos en que las variables no cumplían con los criterios de normalidad y homocedasticidad se aplicó la transformación logarítmica con el fin de aplicar el test ANOVA (de uno o dos factores, según correspondiere) con test post-hoc para establecer las comparaciones. Luego de testear la homocedasticidad, usando test de Levene, se aplicó el test post-hoc de Tukey para los casos en que la misma se cumplía, en caso contrario se aplicó el test Dunnett's-T3. En los casos en que esta transformación no logró el cumplimiento de los supuestos para la aplicación de la estadística paramétrica, se aplicó un tratamiento no paramétrico de los datos mediante test de Kruskal-Wallis. Las variables son presentadas como valores medidos, sin transformación. El análisis de regresión múltiple se utilizó para ajustar las variables por edad e IMC debido a que ambos son parámetros conocidos como factores contribuyentes a RCV. Todos los análisis descriptos se realizaron por el paquete estadístico SPSS (SPSS versión 14.0, Chicago, IL, E.E.U.U.).

En el caso de variables heterocedásticas se aplicó un modelo lineal generalizado (MLG) con distribución gama y función log link. Para modelar la heterocedasticidad se utilizó la función "VarIdent" mediante el paquete de datos R (R Core team 2014).

Para evaluar la habilidad de VAI y LAP para estimar la presencia de IR en nuestra población, curvas de construyeron curvas ROC, y se determinó el área bajo la curva (AUC). Para la construcción de las curvas se utilizó una población control normal de entre 18 y 35 años que no presentaran ningún criterio diagnóstico de SOP y no cumplieran ninguno de los criterios de exclusión previamente descriptos. Se usó de referencia un valor de HOMA>2,3 como corte para definir IR que fue establecido en trabajos previos realizados con población argentina sana (Graffigna et al., 2005). Se eligió como valor de corte para LAP y VAI los que presentaban valores óptimos de sensibilidad y especificidad identificados como los que mantienen $(1 - \text{sensibilidad})^2 + (1 - \text{especificidad})^2$ al mínimo. Los análisis fueron realizados usando el programa SPSS versión 14.0 Chicago, IL, E.E.U.U.. Las curvas ROC/AUC fueron construidas con el programa InStat (GraphPad software, San Diego, CA, E.E.U.U.) y se calcularon los valores predictivos positivos (VPP) y los valores predictivos negativos (VPN). como VPP= resultados positivos en pacientes con la patología/ total de resultados positivos, y VPN= resultados negativos en pacientes sanos/total de resultados negativos (Wiltgen et al., 2009). Se tomaron como diferencias significativas $p < 0,05$.

IV. Capítulo 1: Efectos de la hiperandrogenización prenatal: caracterización de las camadas y efectos sobre el balance metabólico.

Capítulo 1

Efectos de la hiperandrogenización prenatal: caracterización de las camadas y efectos sobre el balance metabólico

Nuestro primer objetivo fue caracterizar el modelo de hiperandrogenización prenatal desde el punto de vista metabólico, ya que dichas alteraciones se encuentran presentes en las pacientes con SOP. Asimismo, con el objetivo de evaluar si las posibles alteraciones metabólicas se modificaban a lo largo de la vida, estudiamos dos momentos: la transición de la pubertad a la adultez (60 días de vida) y la adultez (90 días de vida).

Resultados

Parámetros por camada

Al momento del nacimiento se evaluaron diferentes parámetros de las camadas como son: la duración de la gestación, la proporción de hembras y machos y el número total de crías. No se observaron diferencias estadísticas significativas entre grupos experimentales en cuanto a la duración de la gestación, al tamaño de la camada, ni en cuanto a la proporción de sexo en las crías nacidas, al comparar entre grupos Control y HP (Tabla 4.1).

Parámetro Evaluado		Tratamiento	
		Control	Hiperandrogenización
Duración de la Gestación (días)		22,17 ± 0,41	22,00± 0,28
Camada	N° crías Totales	12,25 ± 0,50	12,37 ± 1,98
	N° crías Hembras	7,25 ± 1,89	6,05 ± 1,75
	N° crías Machos	5,20 ± 1,31	6,32 ± 1,76

Tabla 4.1: Características de la camada. Por cada tratamiento se evaluaron un total de 19 camadas. No se detectaron diferencias significativas ; $p > 0,05$ para todos los casos estudiados por test de *t-student*.

Como puede observarse en la Tabla 4.2 se clasificaron las crías hembras según su ciclo estral tanto, en el comienzo de la adultez como ya en la etapa adulta. Los resultados revelan

que desde el comienzo de la adultez la hiperandrogenización prenatal genera irregularidades en el ciclo estral. Dichas irregularidades no se mantienen a los 90 días de edad. El análisis por Chi cuadrado de Pearson demostró que existe una relación entre la edad y la proporción de fenotipos presentados en el grupo HP ($p=0,0425$).

El grupo HP ovulatorio regular no fue considerado para los análisis posteriores ya que dicho grupo no presenta alteraciones en la disfuncionalidad del ciclo estral, siendo esta una de las características esperadas en los modelos SOP de animales de laboratorio. De aquí en adelante el fenotipo HP ovulatorio irregular se nombrará como HPiov y el fenotipo HP anovulatorio como HPanov.

Edad	Fenotipo del grupo control	Fenotipo del grupo HP		
	Ovulatorio Regular	HP ovulatorio regular	HP ovulatorio irregular	HP anovulatorio
60 días (comienzo de adultez)	100%	20 (10-30)%	47 (43-51)%	33 (27-39)%
90 días (adultez)	100%	9,5 (8-11)%	49,5 (49-50)%	40,5 (38-43)%

Tabla 4.2: Proporción de fenotipos de acuerdo al ciclo estral. Los experimentos para la evaluación de la frecuencia de fenotipos se repitieron en tres ocasiones distintas, cada uno con camadas de $n=25$ madres. Los resultados son presentados como la media y el rango (mín.-máx.).

Con el fin de analizar la variabilidad de fenotipos intra-camadas, realizamos un análisis para evaluar si la proporción de animales con fenotipo anovulatorio por camada presenta asociación con el número total de crías, el número total de machos o el número total hembras. Se analizaron $n=19$ camadas distintas, de las totales efectuadas, para las cuales se contaba con todos los datos. El análisis reveló que la proporción de ratas anovulatorias por camada no presentó asociación con el número de crías totales ($p=0,875$, Fig. 4.1, A), con el número de crías machos ($p=0,4202$, Fig. 4.1, B) ni con el número de crías hembras ($p=0,0581$, Fig. 4.1, C).

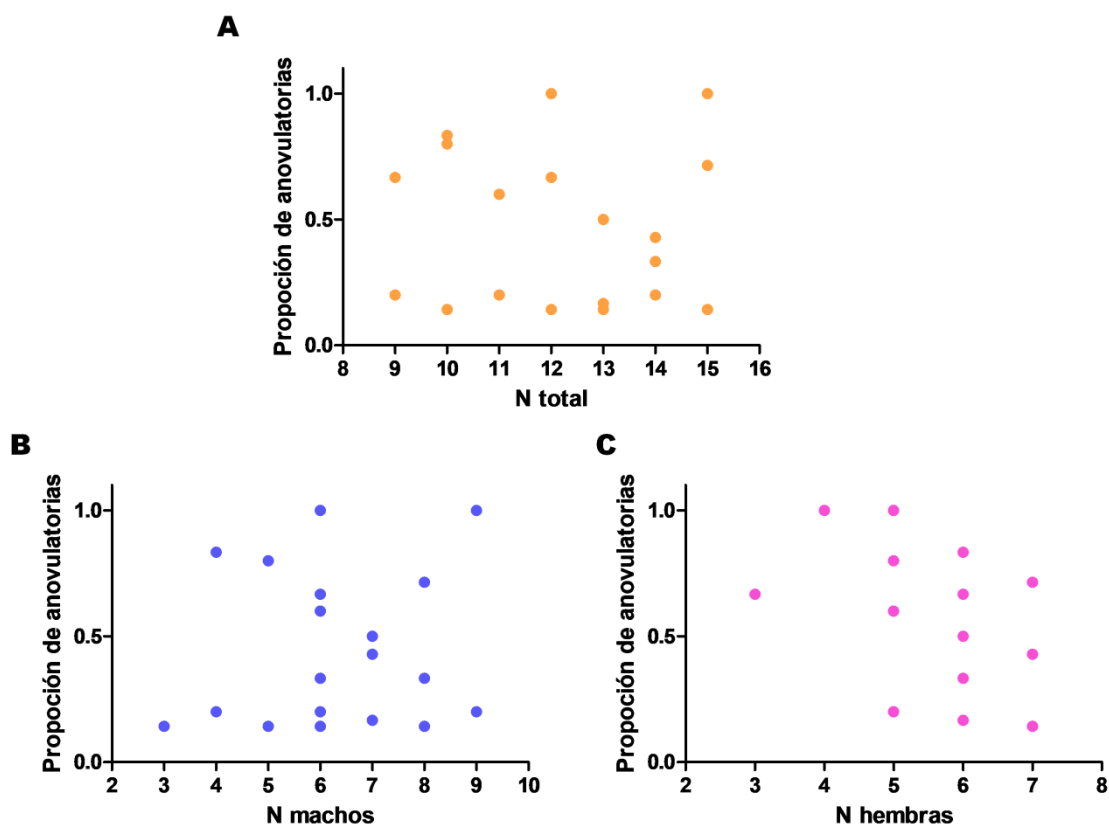


Figura 4.1: Análisis de asociación para $n=19$ camadas totales, entre la proporción de ratas anovulatorias por camada con A) el número de crías totales, B) el número de machos totales por camada, C) el número de hembras totales por camada.

Curva de ganancia de peso o crecimiento

Se construyó la curva de crecimiento para todas las crías hembras clasificadas según el fenotipo que presentan en estadio adulto. Los resultados obtenidos muestran que no se ve alterado el patrón de ganancia de peso desde el momento del destete hasta los 90 días de edad (Fig. 4.2).

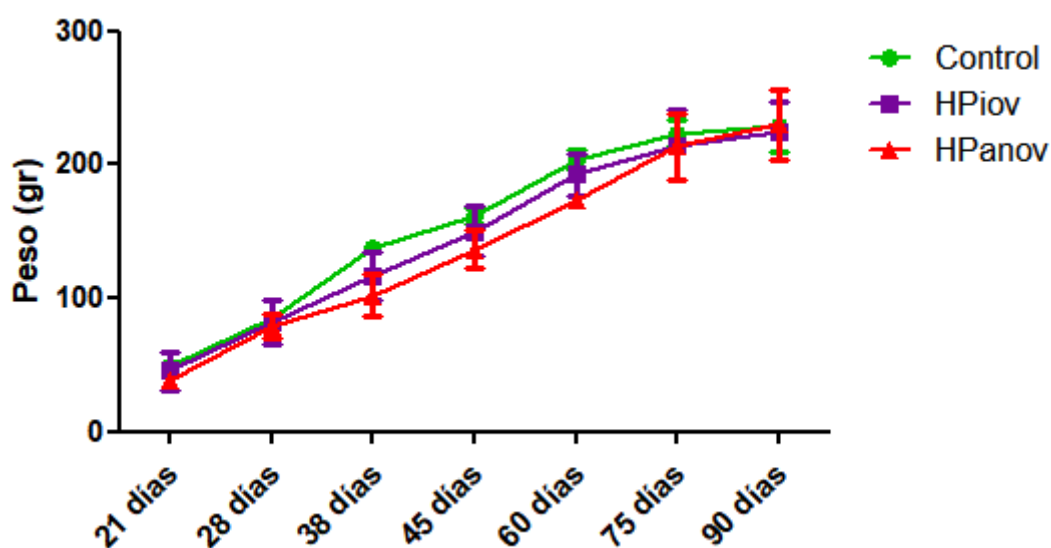


Figura 4.2: Curva de crecimiento de los distintos grupos desde la fecha del destete hasta la edad adulta (90 días). ANOVA de medidas repetidas, $p > 0,05$ entre tratamientos para cada tiempo analizado $n=30$ ratas por grupo.

Perfil metabólico

Se evaluó el perfil metabólico en los grupos control, HPiov y HPanov. Debido a que el inicio de la adultez (60 días) es un período de susceptibilidad, cambio e inestabilidad, donde pueden aparecer fenómenos que podrían dar indicios de afecciones en la vida adulta, se decidió medir distintos parámetros desde dicha etapa como así también en la vida adulta (90 días). Los objetivos de evaluar dichas etapas son estudiar si la hiperandrogenización prenatal tiene un efecto desde el fin de la pubertad; y por otro lado, estudiar si dichos efectos pueden persistir o modificarse en la adultez.

Comienzo de la adultez (60 días)

Perfil lipídico

La medición del perfil de lípidos mostró que, en el comienzo de la adultez, en los fenotipos HPiov como HPanov se observa una dislipidemia caracterizada por un aumento en los niveles circulantes de colesterol LDL así como también de triglicéridos (Fig. 4.3).

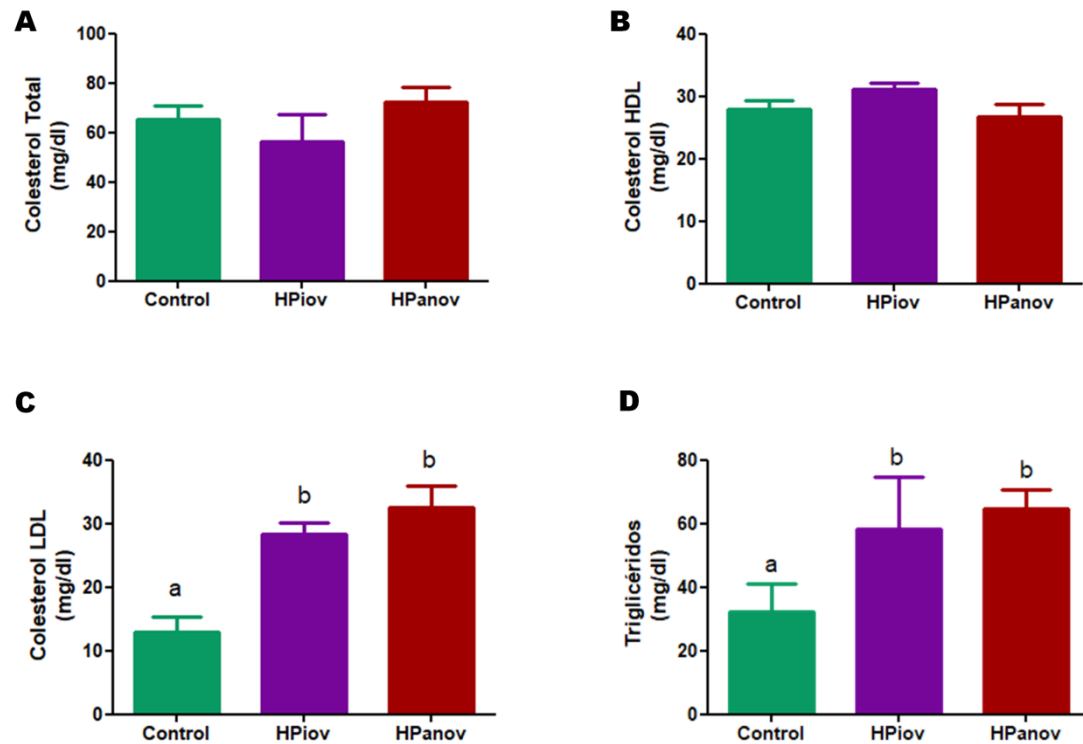


Figura 4.3: Perfil lipídico en suero en edad puberal (60 días). A) Colesterol total, B) Colesterol HDL, C) Colesterol LDL, D) Triglicéridos. Cada columna representa la media + D.E. de grupos Control e Hiperandrogenizado prenatalmente (HP) en 10 muestras por grupo; a vs b $P < 0,05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey.

Por otro lado, se midieron estimadores del metabolismo de glucosa e insulina. Los niveles de insulina basal se encontraron alterados en ambos fenotipos del grupo HP (Fig. 4.4, A), mientras que los niveles de glucemia sólo se vieron alterados en el fenotipo HPanov (Fig. 4.4, B).

La curva de tolerancia a la glucosa se vio afectada en ambos fenotipos HP (Fig. 4.4, C). El índice HOMA-IR, como estimador de insulino resistencia, se vio aumentado en el fenotipo HPanov (Fig. 4.4, D). Se observa entonces una hiperinsulinemia precediendo tanto a la hiperglucemia como al indicio de insulino resistencia detectado por el índice HOMA-IR en el fenotipo HPiov.

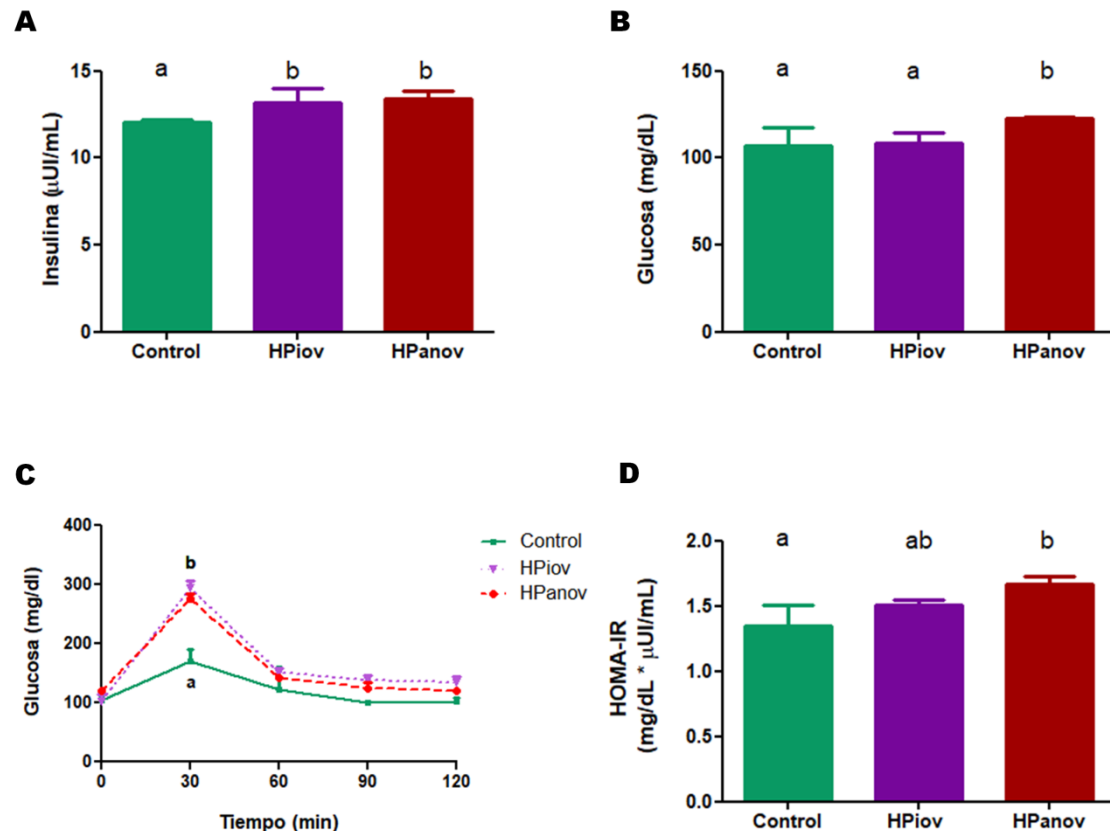


Figura 4.4: Parámetros de insulina y glucosa en el comienzo de la adultez (60 días). A) Insulina basal, B) Glucosa basal, C) Curva de tolerancia a la glucosa, D) índice HOMA-IR. Cada columna representa la media + D.E. de grupos Control e Hiperandrogenizado prenatalmente (HP) en 10 animales por grupo; a vs b $P < 0,05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey.

Marcadores de daño hepático

Debido a que la insulino resistencia y la dislipidemia, así como también el hiperandrogenismo, son considerados como factores de riesgo para el desarrollo de esteatosis hepática y EHGNA, se midieron entonces marcadores de daño hepático.

Evaluamos los niveles séricos de tres enzimas hepáticas que se utilizan cotidianamente en la clínica como marcadores de daño hepático. Los niveles de ALT se vieron elevados en el fenotipo HPiov, sin embargo en el fenotipo HPanov no se encontraron alterados respecto del grupo control. Los niveles de las enzimas AST y GGT no se vieron afectados en ninguno de los fenotipos HP respecto del grupo control (Fig. 4.5).

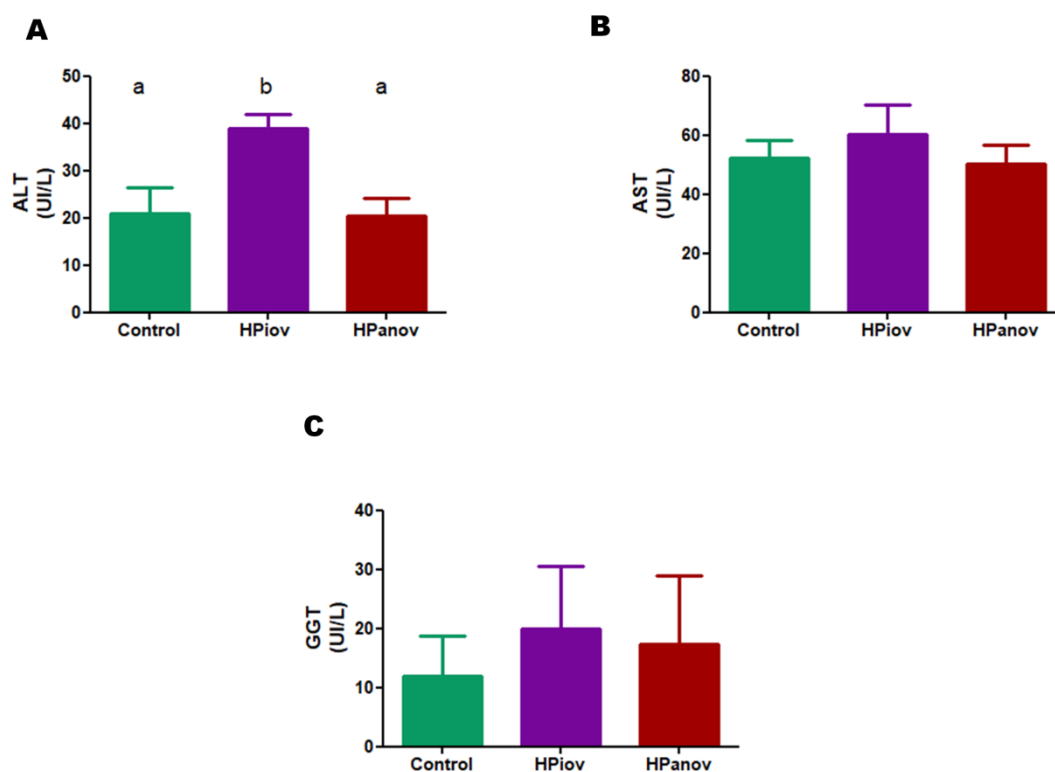


Figura 4.5: Niveles séricos de enzimas hepáticas en animales de 60 días de edad. A) niveles de ALT, B) niveles de AST, C) niveles de GGT. Cada columna representa la media + D.E. de grupos Control e Hiperandrogenizado prenatalmente (HP) en 10 animales por grupo; a vs b $P < 0,05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey.

Debido a que el hiperandrogenismo ha sido correlacionado como posible factor contribuyente al desarrollo de hígado graso evaluamos los niveles de concentración de lípidos intrahepáticos. La tinción específica de lípidos en el hígado resultó negativa en todos los grupos (Fig. 4.6). Asimismo la cuantificación específica de triglicéridos hepáticos no mostró diferencias entre los tres fenotipos analizados (Fig. 4.7).

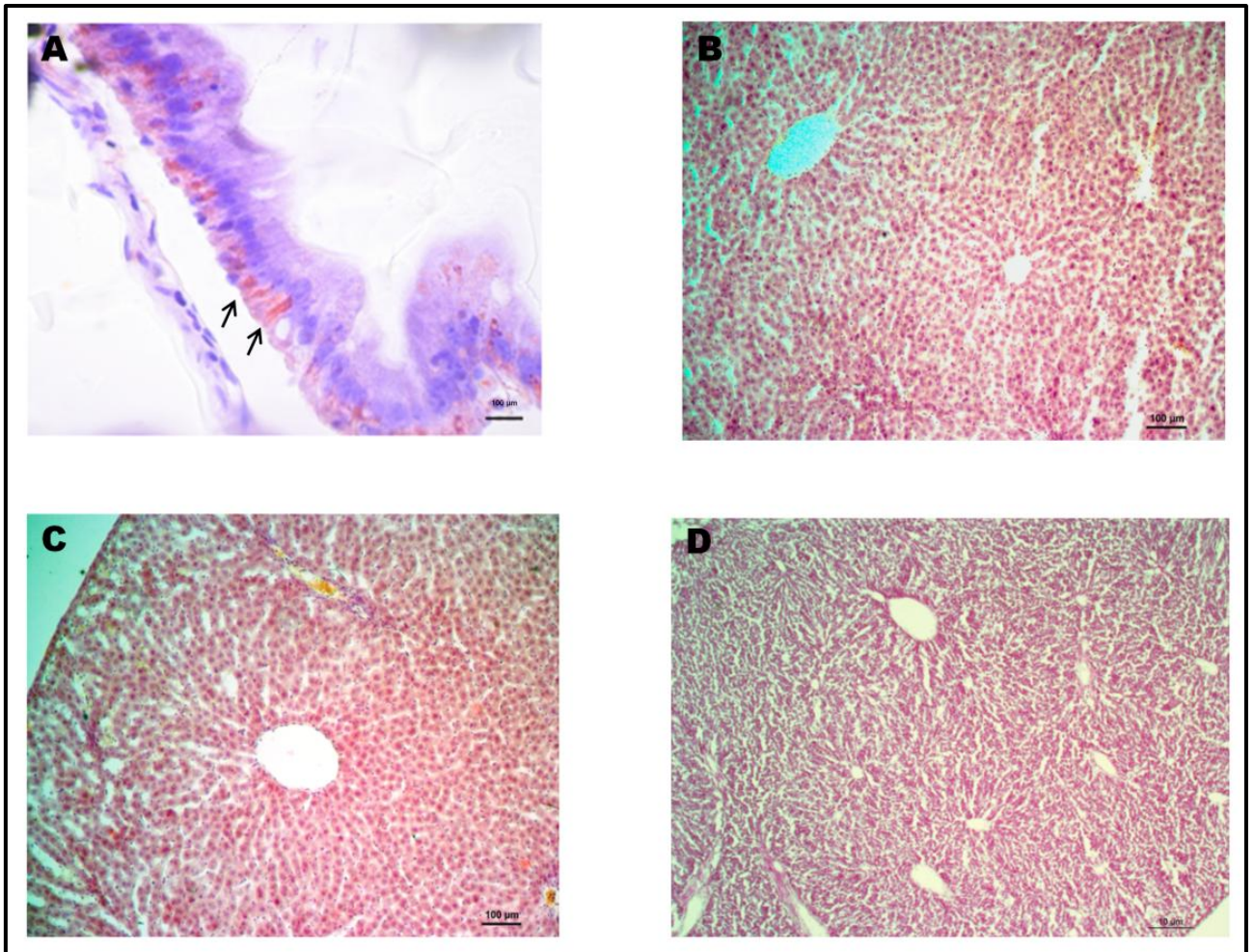


Figura 4.6: Contenido citoplasmático de gotas lipídicas por técnica de SUDAN IV para n= 6 ratas por grupo. A) Control positivo de la técnica, donde las gotas lipídicas se señalan con flechas. Cada fotografía muestra los detalles (100x) de una tinción representativa de B) Control, C) HPiov, D) HPanov. No se encontraron evidencias de acumulación de gotas lipídicas hepáticas.

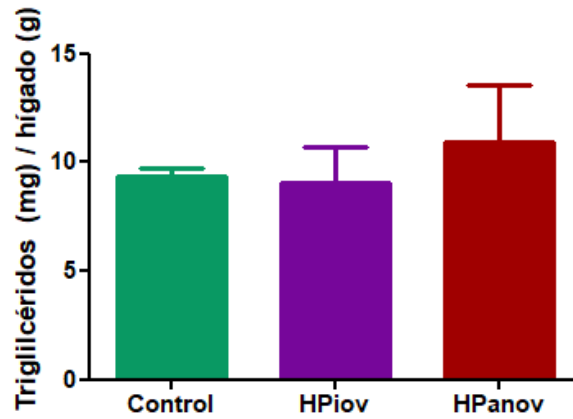


Figura 4.7: Contenido de triglicéridos en hígado. Cada columna representa la media + D.E de grupos Control e Hiperandrogenizado prenatalmente (HP) en 8 animales por grupo; a vs b $P < 0,05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos analizados.

Dado que el estrés oxidativo es otro factor involucrado en el desarrollo de esteatosis, evaluamos los niveles del metabolito antioxidante, glutatión, y el índice de peroxidación lipídica. El fenotipo ovulatorio presentó valores incrementados de glutatión total respecto del grupo control, mientras que el fenotipo HPanov presentó bajos niveles del mismo respecto del grupo control (Fig. 4.8, A). En cuanto a los niveles de peroxidación lipídica, observamos que sólo el fenotipo HPanov presentó un incremento de los mismos respecto del grupo control (Fig. 4.8, B).

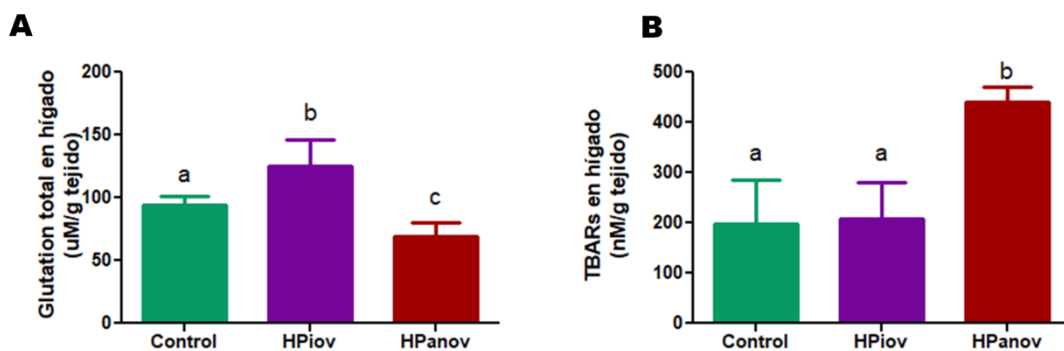


Figura 4.8: Estrés oxidativo en hígado a 60 días. A) Niveles del metabolito antioxidante, GSH total en hígado, B) Niveles de peroxidación lipídica hepática. Cada columna representa la media + D.E de grupos Control e Hiperandrogenizado prenatalmente (HP) en 6 animales por grupo; a vs b $P < 0,05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos analizados.

Mediadores de la vía lipogénica hepática a 60 días

Si bien nuestros resultados no revelaron señales de estosis hepática ni daño hepático severo, nos planteamos como objetivo evaluar el efecto del hiperandrogenismo sobre la posible disregulación de la lipogénesis hepática, la cual podría llevar a una posterior acumulación de lípidos en el hígado y, al consecuente desarrollo de EHGNA en edades más avanzadas.

Los factores de transcripción reguladores de las enzimas involucradas en la vía lipogénica *PPARg* y *Srebp* mostraron mayores niveles de expresión de ARNm en los grupos HP (Fig. 4.9, A y B). Mientras que el factor de transcripción *Chrebp* solo presentó mayores niveles de ARNm en el fenotipo HPanov (Fig. 4.9, C).

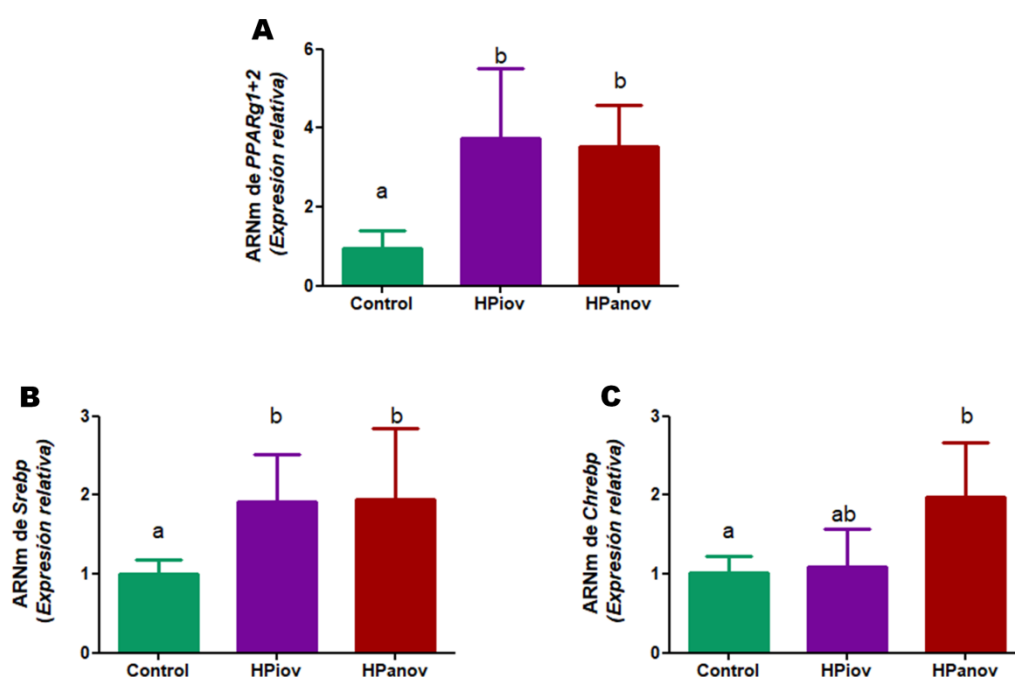


Figura 4.9: Abundancia relativa de ARNm de factores de transcripción reguladores de las enzimas lipogénicas relativos a 60 días de edad. Expresión de a) *PPARg*, B) *Srebp*, C) *Chrebp*. Cada columna representa la media + D.E. de grupos Control e Hiperandrogenizado prenatalmente (HP) en 10 muestras por grupo; a vs b $P < 0,05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey.

Las enzimas involucradas en la lipogénesis mostraron niveles alterados de sus ARNm. Los niveles de ARNm de ambas isoformas de las enzimas acetil-CoA carboxilasas (*Acaca* y *Acacb*) estaban disminuidos en ambos fenotipos HP (Fig. 4.10, A y B). Mientras que los niveles

de ARNm de la enzima *Fas* estaban aumentados en ambos fenotipos HP (Fig. 4.10, C) y de *Scd1* sólo mostraron un aumento significativo en el fenotipo HPanov (Fig. 4.10, D).

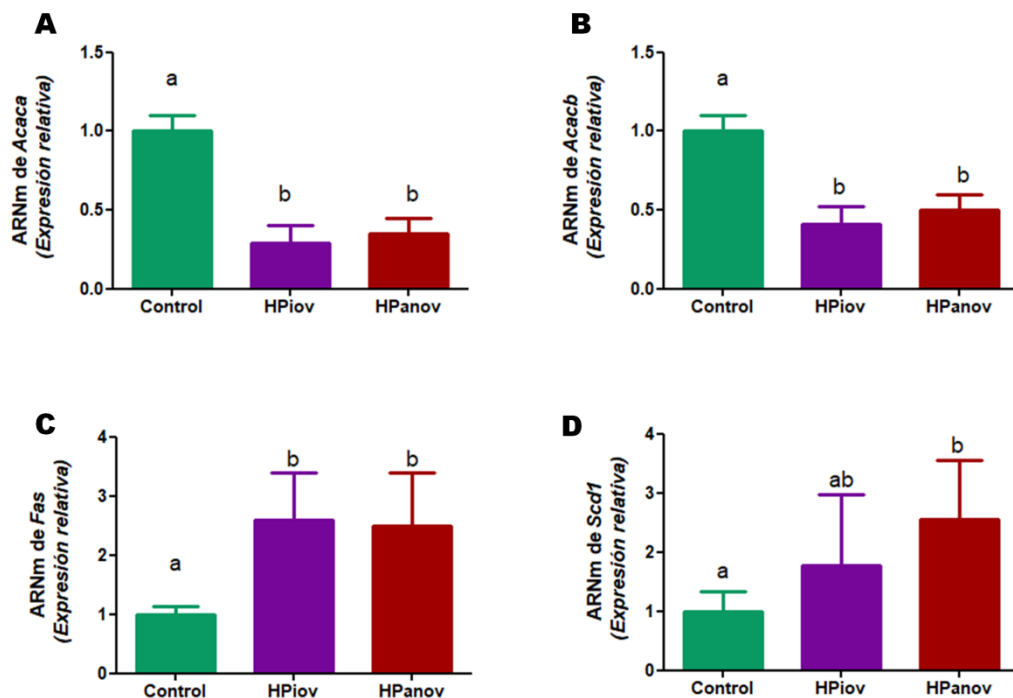


Figura 4.10: Abundancia relativa de ARNm de enzimas lipogénicas a 60 días de edad (comienzo de la adultez). Expresión de A) *Acaca*, B) *Acacb*, C) *Fas*, D) *Scd1*. Cada columna representa la media + D.E. de grupos Control e Hiperandrogenizado prenatalmente (HP) en 10 muestras por grupo; a vs b $P < 0,05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey.

Etapa adulta (90 días)

Perfil metabólico

La medición del perfil de lípidos mostró que en etapa adulta los fenotipos HPiov y HPanov presentan dislipidemia, con aumento en los niveles circulantes de colesterol LDL y de triglicéridos (Fig. 4.11), manteniéndose las mismas alteraciones que en el comienzo de la adultez.

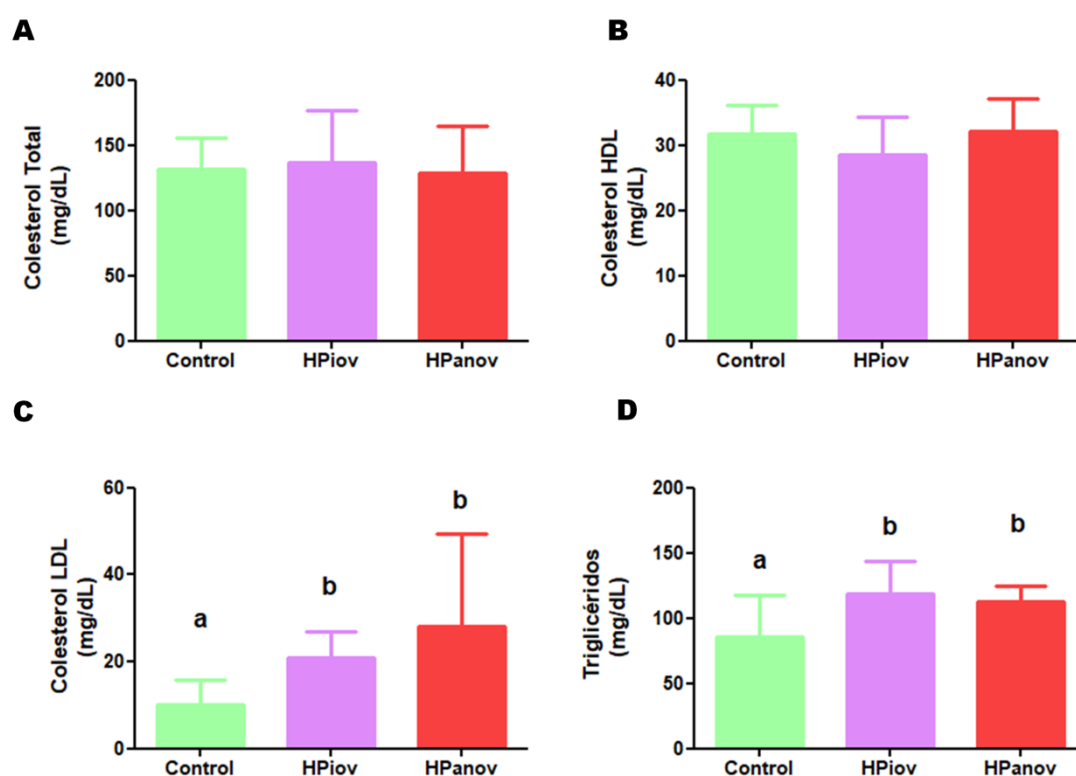


Figura 4.11: Perfil lipídico en suero en edad adulta (90 días). A) Colesterol total, B) Colesterol HDL, C) Colesterol LDL, D) Triglicéridos. Cada columna representa la media + D.E. de grupos Control e Hiperandrogenizado prenatalmente (HP) en 10 animales por grupo; a vs b $P < 0,05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey.

Los niveles de insulina se encontraron alterados en ambos fenotipos de los grupos HP (Fig. 4.12, A). La glucemia basal se encontró aumentada en el fenotipo HPiov y aún más elevada en el fenotipo HPanov (Fig. 4.12, B). Asimismo el índice HOMA-IR se encontró elevado en ambos fenotipos HP (Fig. 4.12, C). Estos resultados revelan que, el cuadro metabólico empeora en edad adulta en el fenotipo HPiov, siendo que, a 60 días de edad no se encontraba hiperglucemia ni alteraciones en el índice HOMA-IR.

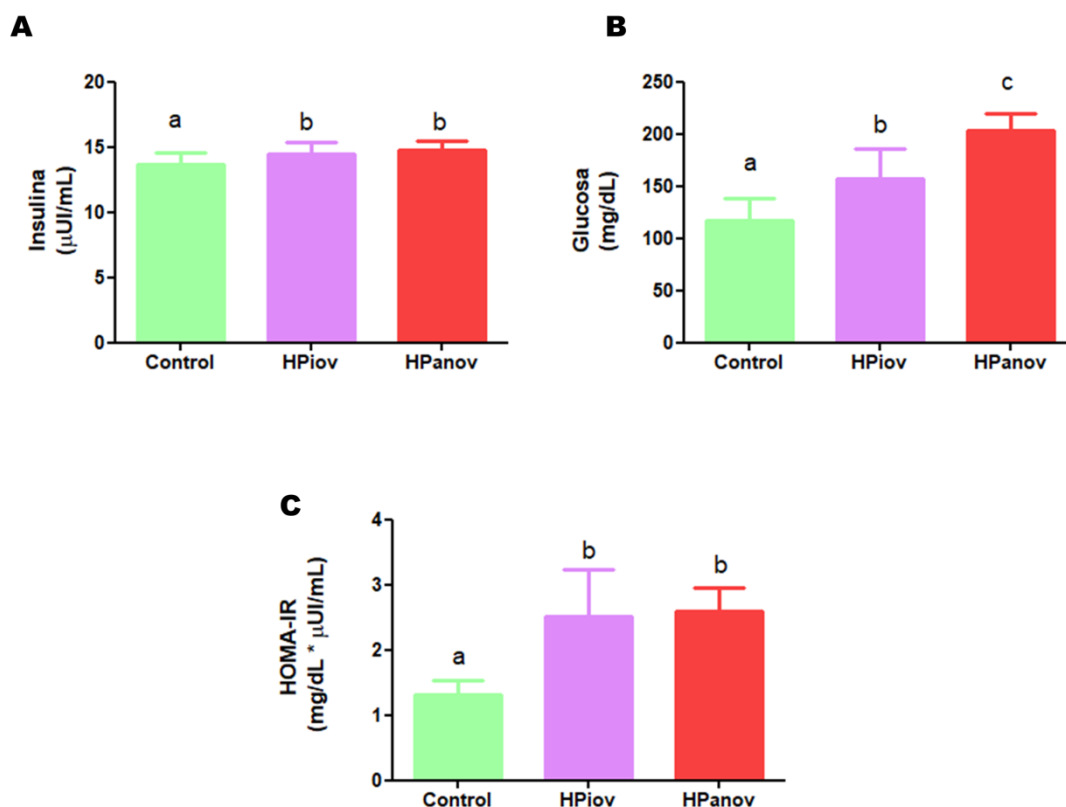


Figura 4.12: Parámetros de insulina y glucosa en la adultez (90 días). A) Insulina basal, B) Glucosa basal, C) índice HOMA-IR. Cada columna representa la media + D.E. de grupos Control e Hiperandrogenizado prenatalmente (HP) en 10 animales por grupo; a vs b $P < 0,05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey.

Marcadores de daño hepático

Debido a que en el comienzo de la adultez no se hallaron señales de esteatosis hepática pero sí alteraciones en la lipogénesis, se decidió evaluar si dichas alteraciones a 90 días de edad podrían llevar al desarrollo de alteraciones asociadas a EHGNA.

Evaluamos los niveles séricos de tres enzimas hepáticas. Los niveles de ALT, AST y GGT no se vieron afectados en ninguno de los fenotipos HP respecto del grupo control (Fig. 4.13).

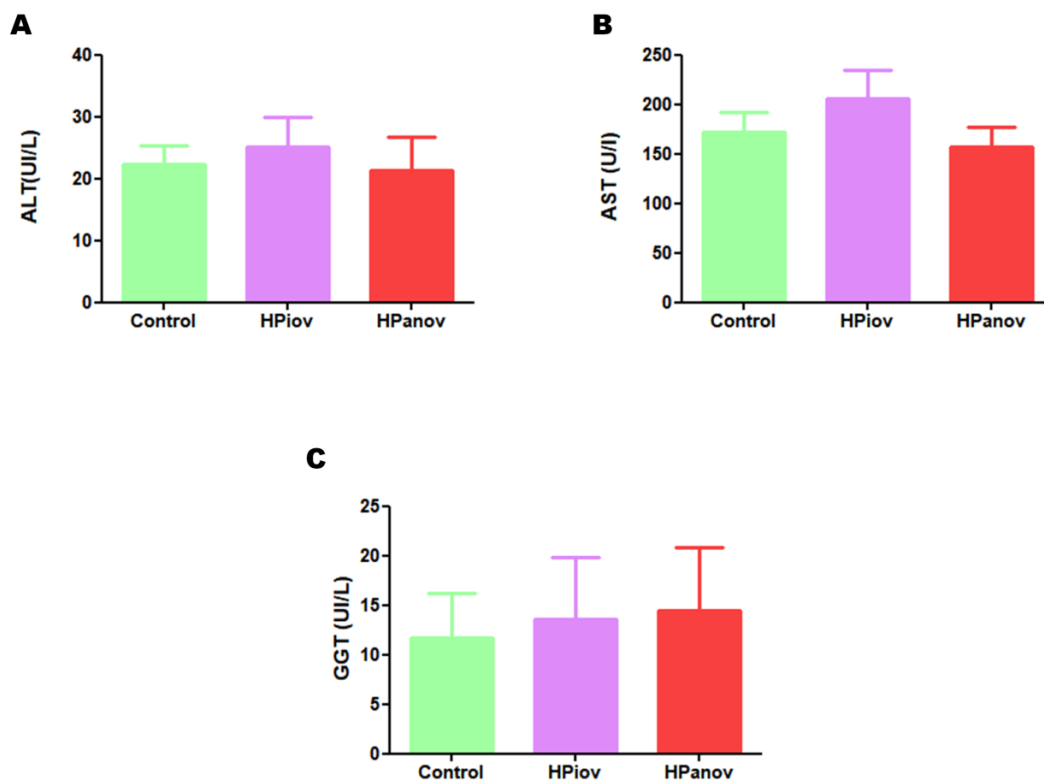


Figura 4.13: Niveles séricos de enzimas hepáticas en animales de 90 días de edad. A) niveles de ALT, B) niveles de AST, C) niveles de GGT. Cada columna representa la media + D.E. de grupos Control e Hiperandrogenizado prenatalmente (HP) en 10 animales por grupo; a vs b $P < 0,05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey.

Asimismo la cuantificación específica de triglicéridos hepáticos no mostró diferencias entre los tres fenotipos analizados (Fig. 4.14).

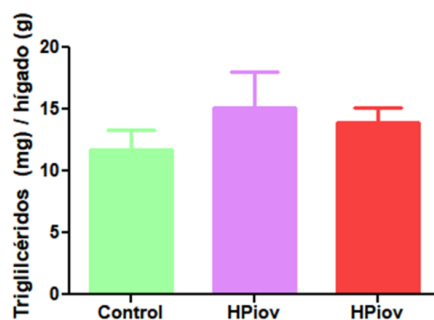


Figura 4.14: Contenido de triglicéridos en hígado. Cada columna representa la media + D.E. de grupos Control e Hiperandrogenizado prenatalmente (HP) en 8 animales por grupo; a vs b $P < 0,05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey.

Al evaluar los niveles de estrés oxidativo a 90 días de edad, solo el fenotipo HPanov presentó un incremento en los valores de glutatión respecto del grupo control (Fig. 4.15, A). Asimismo hallamos altos valores del índice de peroxidación lipídica en el fenotipo HPanov respecto del grupo control (Fig. 4.8, B).

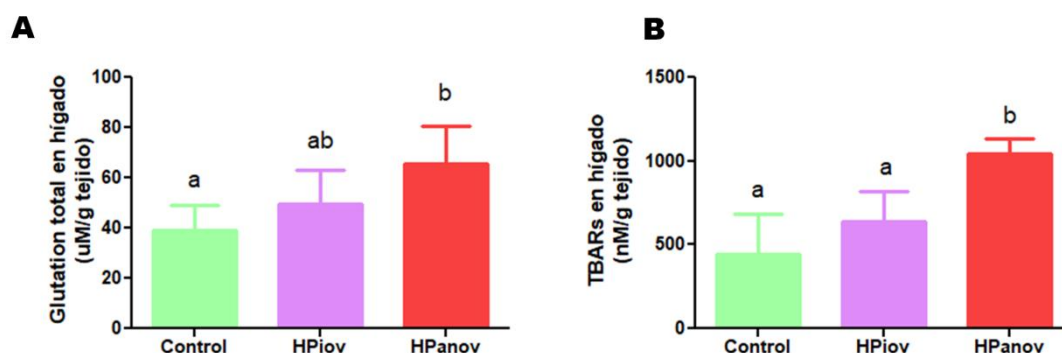


Figura 4.15: Estrés oxidativo en hígado a 90 días. A) Niveles del metabolito antioxidante, GSH total en hígado, B) Niveles de peroxidación lipídica hepática. Cada columna representa la media + D.E. de grupos Control e Hiperandrogenizado prenatalmente (HP) en 6 animales por grupo; a vs b $P < 0,05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos analizados.

Mediadores de la vía lipogénica hepática a 90 días

Los factores de transcripción reguladores de las enzimas involucradas en la vía lipogénica mostraron un patrón contrario al hallado a 60 días de edad. Los niveles de ARNm de *PPARG*, *Srebp* y *Chrebp* fueron menores en ambos fenotipos HP respecto del grupo control (Fig. 4.16, A,B y C, respectivamente). Incluso, en el caso de *Chrebp* el fenotipo HPanov presentó los niveles más bajos de expresión (Fig. 4.16, C).

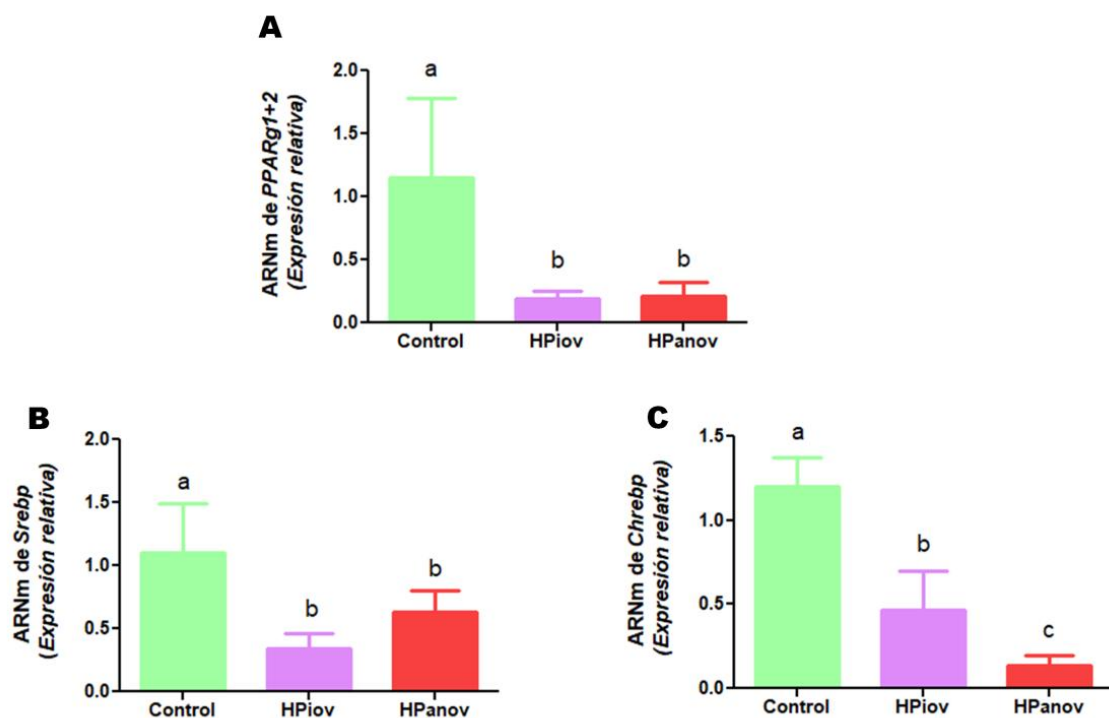


Figura 4.16: Abundancia relativa de ARNm de factores de transcripción reguladores de las enzimas lipogénicas a 90 días de edad. Expresión de a) *PPARγ*, B) *Srebp*, C) *Chrebp*. Cada columna representa la media + D.E. de grupos Control e Hiperandrogenizado prenatalmente (HP) en 6 muestras por grupo; a vs b $P < 0,05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey.

En su conjunto, todos estos resultados sugieren que el hiperandrogenismo prenatal conlleva a alteraciones en el metabolismo y la reproducción de las crías hembras aún sin la presencia de sobrepeso u obesidad. Dichas perturbaciones pueden detectarse desde el comienzo de la adultez. El cuadro metabólico de alteraciones en el sistema de insulina y glucosa empeora en etapa adulta mientras que la vía lipídica intra-hepática se ve modificada.

Discusión

La programación fetal es un fenómeno que puede perturbar a distintos tejidos en desarrollo. Se sabe que las alteraciones hormonales, como es el exceso de andrógenos durante las primeras etapas de la vida, pueden alterar tanto al sistema endócrino como al metabólico en la vida post-natal. Se ha demostrado que las consecuencias endócrino-metabólicas son dependientes de la dosis de testosterona administrada durante la vida prenatal, incluso llevando a una defeminización si las dosis aplicadas son altas (Wolf, 2002; Amalfi et al., 2012). En este trabajo de tesis nos propusimos evaluar los efectos de la hiperandrogenización con una dosis de testosterona de 1mg. La dosis elegida ya ha sido reportada anteriormente (Wolf, 2002). Concordando con Wolf y colaboradores (2002), nuestros resultados revelaron que la hiperandrogenización prenatal, en esta dosis, conlleva a alteraciones apreciables pero sin afectar la viabilidad de las crías, la proporción de sexos, ni la gestación (Tabla 4.1). Más aún, al analizar las crías hembras encontramos que la hiperandrogenización prenatal con una dosis de 1mg diario de testosterona conlleva el desarrollo de dos fenotipos respecto del ciclo estral. En particular, nuestros resultados revelaron que desde el fin de la pubertad se detecta un alto porcentaje de las crías con alteraciones en la ciclicidad y que dichas alteraciones se incrementan y empeoran en etapa adulta (Tabla 4.2).

La presencia de dos fenotipos distintos en una misma camada no dependió del número total de crías por camada, ni del número de hembras ni de machos. Por lo que, la compleja red de mecanismos que puede llevar al desarrollo de dos fenotipos distintos como respuesta a una misma dosis de testosterona, podría deberse tanto al fenómeno de plasticidad fenotípica en la respuesta al insulto hormonal (Bateson et al., 2014), como así también a un efecto de posición intrauterino o a alteraciones y modulaciones particulares de la placenta. La posición relativa que un feto en desarrollo tiene, respecto de los otros fetos adyacentes, influencia el medio hormonal al que el mismo queda expuesto, y así también a su desarrollo (Zielinski et al., 1991). Por ejemplo, se ha estudiado que un feto hembra que está rodeado por dos fetos macho, tiene un ambiente hormonal diferente al de un feto hembra que tiene otras dos hembras adyacentes (Zielinski et al., 1991). En cuanto a la disfunción placentaria, se ha demostrado que los andrógenos administrados prenatalmente pueden influenciar los niveles de enzimas esteroidogénicas expresadas por la placenta, condicionando de esta forma, el medio hormonal al que quedan expuestos los fetos en desarrollo (Sun et al., 2012). Es importante resaltar que se ha descrito un fenotipo plástico en pacientes con SOP y sus parientes. Particularmente, Jahanfar y colaboradores (1995) estudiaron gemelos mono y dicigóticos en los cuales hallaron que si bien uno de los gemelos presentaba ovarios poliquísticos, hiperandrogenismo y

disfunciones menstruales, el otro, presentaba sólo algunos de dichos síntomas (Jahanfar et al., 1995). Es de destacar que, si bien se conoce que todos estos fenómenos están involucrados en el desarrollo del fenotipo que se puede presentar en la vida postnatal, aún hoy, estos mecanismos y fenómenos no se concocen con certeza ni se han estudiado con profundidad en el contexto de SOP e hiperandrogenismo.

SOP y EHGNA comparten ciertas características como IR y SM. EHGNA, al igual que SOP, es una patología multifactorial y se ha descrito que el ambiente intrauterino juega un rol en su posible desarrollo (Baranova et al., 2013). Asimismo, se ha demostrado que en pacientes con SOP el hiperandrogenismo está asociado a la predisposición a EHGNA. Debido a esto, nos propusimos evaluar el efecto de la programación fetal mediada por andrógenos en el hígado.

Nuestros resultados revelaron la presencia de dislipidemia desde el comienzo de la adultez, la cual se mantiene en la vida adulta. También hemos encontrado alteraciones en el metabolismo de la glucosa e insulina. A los 60 días de edad, se observó que el fenotipo con anovulación (HPanov) presentó insulino resistencia, hiperinsulinemia e hiperglucemia, síntomas que se mantienen durante la etapa adulta, a los 90 días de edad. Por otro lado, el fenotipo ovulatorio irregular presentó en el comienzo de la adultez hiperinsulinemia y alteraciones en la respuesta a la glucosa. Sin embargo, en etapa adulta, dicho fenotipo mantuvo su hiperinsulinemia pero presentó también, insulino resistencia e hiperglucemia. Estos resultados sugieren, como se ha descrito en pacientes con SOP, que la hiperinsulinemia puede presentarse aún en ausencia de hiperglucemia (Diamanti-Kandarakis et al., 2005). Asimismo, estos resultados revelan que alteraciones por exceso andrógeno durante la vida prenatal pueden detectarse ya a los 60 días de vida, pudiendo empeorar al llegar a la adultez. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de evaluar parámetros metabólicos desde edades tempranas en mujeres con SOP, ya que un diagnóstico temprano de dichas comorbilidades podría prevenir el desarrollo de IR y cuadros metabólicos más complejos.

La IR es un factor de riesgo para el desarrollo de esteatosis hepática. Asimismo, el hígado es un órgano muy importante, no sólo en la regulación metabólica, sino también en el control endocrino, por lo que, la evaluación del estado del mismo es de gran importancia en individuos con riesgo de síndrome metabólico y síntomas de IR.

Las transaminasas hepáticas han sido descritas como marcadores de la función y daño hepático (Vassilatou, 2014). Aunque ALT es una de las enzimas más utilizadas como marcador para detectar daño hepático, varios estudios han demostrado que su incremento puede deberse a otras cuestiones como alteraciones del crecimiento y diabetes (Burgert et al., 2006;

Vassilatou, 2014) . Incluso se ha cuestionado el valor diagnóstico de ALT como marcador de EHGNA ya que se ha encontrado que individuos con EHGNA pueden presentar valores normales de ALT y asimismo que, individuos con ALT alto pueden no presentar EHGNA (Kim et al., 2008). Dado estos resultados controversiales, se ha recomendado que los niveles de las transaminasas sean utilizados solo para detectar niveles de inflamación, como señales indirectas de daño hepático. Nuestros resultados revelaron altos niveles de ALT sólo en el fenotipo HPiov, pero no en el fenotipo HPanov, lo que podría estar reflejando cierto nivel de inflamación en el fenotipo ovulatorio irregular.

El estrés oxidativo también ha sido postulado como uno de los factores involucrados en la patogénesis del daño hepático. Entre otros procesos, el estrés oxidativo participa en la regulación de la producción y exportación hepática de VLDL (Pan et al., 2004). Pan y colaboradores (2004) han demostrado que la adición de GSH a células hepáticas disminuye la esteatosis y la peroxidación lipídica. Asimismo los niveles de GSH hepáticos correlacionan con altos niveles circulantes de colesterol LDL, lo cual resalta la asociación entre el estrés oxidativo y el metabolismo lipídico (Lin et al., 2014). De acuerdo con estos hallazgos, nuestros resultados a 60 días de edad, revelaron que en el fenotipo HPiov los niveles de GSH porían compensar el daño causado por la peroxidación lipídica. En cambio, en el fenotipo anovulatorio encontramos altos niveles de daño por peroxidación lipídica y una disminución de GSH. En el fenotipo HPiov, GSH podría estar involucrado en la modulación de VLDL desde el hígado a la circulación, lo cual se condice con los altos niveles de LDL séricos. Esta modulación podría estar previniendo la acumulación de lípidos intrahepática.

Nuestros resultados no revelaron acumulación de lípidos en el hígado, contrariamente a lo previamente demostrado por otros autores para modelos de hiperandrogenización prenatal (Demissie et al., 2008; Hogg et al., 2011). Esta diferencia puede deberse a que dichos autores han utilizado mayores dosis de exposición androgénica. Esto es coherente con lo que previamente hemos encontrado en nuestro laboratorio, donde demostramos que dosis mayores de exposición a andrógenos inducen fenotipos SOP más severos y peores cuadros metabólicos asociados (Amalfi et al., 2012). Es por ello que si bien no hemos encontrado evidencia de acumulación lipídica, decidimos evaluar el estado del metabolismo lipídico en el tejido y las factores involucrados en la síntesis *de novo* de lípidos. Para ello evaluamos dos factores de transcripción: *Srebp* y *Chrebp*, los cuales están regulados por insulina y glucosa. Ambos, en conjunto, regulan la expresión de enzimas lipogénicas (Browning y Horton, 2004; Strable y Ntambi, 2010). Nuestros resultados mostraron que ambos fenotipos HP presentan altos niveles de estos factores de transcripción, lo cual se condice con los niveles altos de

glucosa e insulina hallados. Los niveles de expresión de ARNm de *Srebp* se vieron alterados en ambos fenotipos HP. En cambio, los niveles de *Chrebp* solo se vieron alterados en el fenotipo HPanov, lo que correlaciona con los niveles de insulina y glucosa séricos encontrados, dado que a los 60 días los niveles de insulina se encontraban aumentados en ambos fenotipos HP, mientras que los de glucosa sólo estaban alterados en el fenotipo HPanov.

El tercer factor de transcripción estudiado asociado a la lipogénesis *de novo*, fue PPARg, el cual se encuentra involucrado en la regulación de la lipogénesis. Se ha demostrado que PPARg está incrementado en modelos animales de IR promoviendo la acumulación lipídica. Nuestros resultados, en concordancia con lo anterior, mostraron que los niveles de este factor de transcripción están aumentados en ambos fenotipos HP, evidenciando de esta forma la íntima relación entre el metabolismo lipídico y de insulina y glucosa (Ables, 2012; Kawano y Cohen, 2013). No solo encontramos alteraciones en los factores de transcripción reguladores de la lipogénesis sino también en los niveles de expresión de ARNm de los genes de *Fas* y *Scd1*. Ambos grupos HP mostraron niveles alterados de expresión de *Fas* pero sólo el fenotipo HPanov presentó niveles alterados de *Scd1*, la enzima que conlleva a la formación de ácidos grasos monoinsaturados. De esta forma, aunque la vía lipogénica está alterada en ambos grupos, estos resultados muestran que el fenotipo anovulatorio presenta una mayor desregulación.

El primer factor limitante en la lipogénesis es la síntesis de Malonyl-CoA, el cual es sintetizado por ACC, una enzima que presenta dos isoformas, ACC1 y ACC2, codificadas por dos genes distintos: *Acaca* y *Acacb*. Nuestros resultados revelaron que dichas isoformas se encontraban disminuidas en ambos grupos, independientemente del aumento en los factores de transcripción reguladores de la lipogénesis. Se sabe que el Malonyl-CoA es un inhibidor indirecto de la oxidación de ácidos grasos (Browning y Horton, 2004), y ha sido descrito que, cuando una de las isoformas ACC se encuentran disminuidas entonces la oxidación de ácidos grasos se incrementa. Estos resultados muestran que la reducción de las isoformas de ACC podría deberse a mecanismos regulatorios independientes de la acción de PPARg, SREBP y ChREBP. Esto podría estar evitando la acumulación de lípidos en el hígado mediante la inhibición de la síntesis de Malonyl-CoA y el favorecimiento de la oxidación de ácidos grasos (Savage et al., 2006; Strable y Ntambi, 2010).

Nuestros resultados concuerdan con estudios previos (Mao et al., 2006; Strable y Ntambi, 2010) en los que se demostró que los niveles de *Acaca* son independientes de la expresión de genes involucrados en la síntesis de ácidos grasos. De hecho, se ha demostrado que el ratón *knock-out* para *Acaca* presenta altos niveles de expresión de varias proteínas

involucradas en la lipogénesis y ausencia de acumulación hepática de lípidos. Estos resultados sugieren que *Acaca* podría estar jugando un rol de protección hepática, previniendo el desarrollo de esteatosis, la cual tampoco es detectada en edad adulta. A pesar de la disregulación y estimulación de la vía lipogénica a 60 días de edad, a 90 días de edad, sorprendentemente, encontramos una inhibición de los factores reguladores de la vía lipogénica y el cuadro de estrés oxidativo, es menor en ambos fenotipos HP respecto de lo hallado a 60 días de edad. Estos resultados podrían deberse a que una disminución de la lipogénesis concuerda con una disminución de radicales libres. De esta forma, el sistema antioxidante intracelular podría compensar el daño oxidativo. Sin embargo, no se podría descartar la acción del daño oxidativo por otras vías.

Asimismo, tampoco encontramos señales de acumulación lipídica hepática. Es importante resaltar que la incidencia de EHGNA y la acumulación hepática de lípidos está asociada al peso corporal, siendo el sobrepeso, la obesidad y las alteraciones en tejido adiposo asociadas desencadenantes de esteatosis hepática (Fabbrini et al., 2010; Michaliszyn et al., 2013; Park et al., 2014). Debido a que en nuestro modelo no encontramos alteraciones en el peso, esto podría estar asociado al hecho de que no se presente un cuadro de esteatosis. Nuestros resultados revelan que el fenotipo más afectado fue el anovulatorio, por lo que podría ser el más susceptible a presentar daño hepático y signos de esteatosis a largo plazo en presencia de sobrepeso u obesidad (Browning y Horton, 2004; Estall et al., 2009). Estos resultados están de acuerdo con lo encontrado en mujeres con SOP, donde fenotipos más severos presentan mayor prevalencia de EHGNA (Jones et al., 2012).

Una vez determinado el cuadro metabólico a 60 y 90 días de edad en nuestro modelo, el paso siguiente fue analizar posibles alteraciones en el sistema reproductivo, el cual se encuentra relacionado y depende del estado metabólico

Resumen visual del capítulo 1

	60 días	90 días
Metabolismo lipídico		
Colesterol Total	 	 
Colesterol HDL	 	 
Colesterol LDL	 	 
Triglicéridos	 	 
Metabolismo de glucosa e insulina		
Glucemia	 	 
Insulinemia	 	 
HOMA IR	 	 
Marcadores de alteraciones hepáticas		
ALT	 	 
AST	 	 
GGT	 	 
TG en hígado	 	 
Lipogénesis	 	 
Peroxidación lipídica	 	 
GSH	 	 

Figura 4.14: Alteraciones metabólicas en animales de 60 y 90 días de edad. Flechas y signos igual indican la desregulación (en el caso de flechas) o no (signos iguales) respecto del grupo control de edad correspondiente en los fenotipos HPiov (violeta) y HPanov (rojo). Flechas con bordes discontinuos indican tendencia. Flechas con bordes continuos indican diferencias estadísticamente significativas.

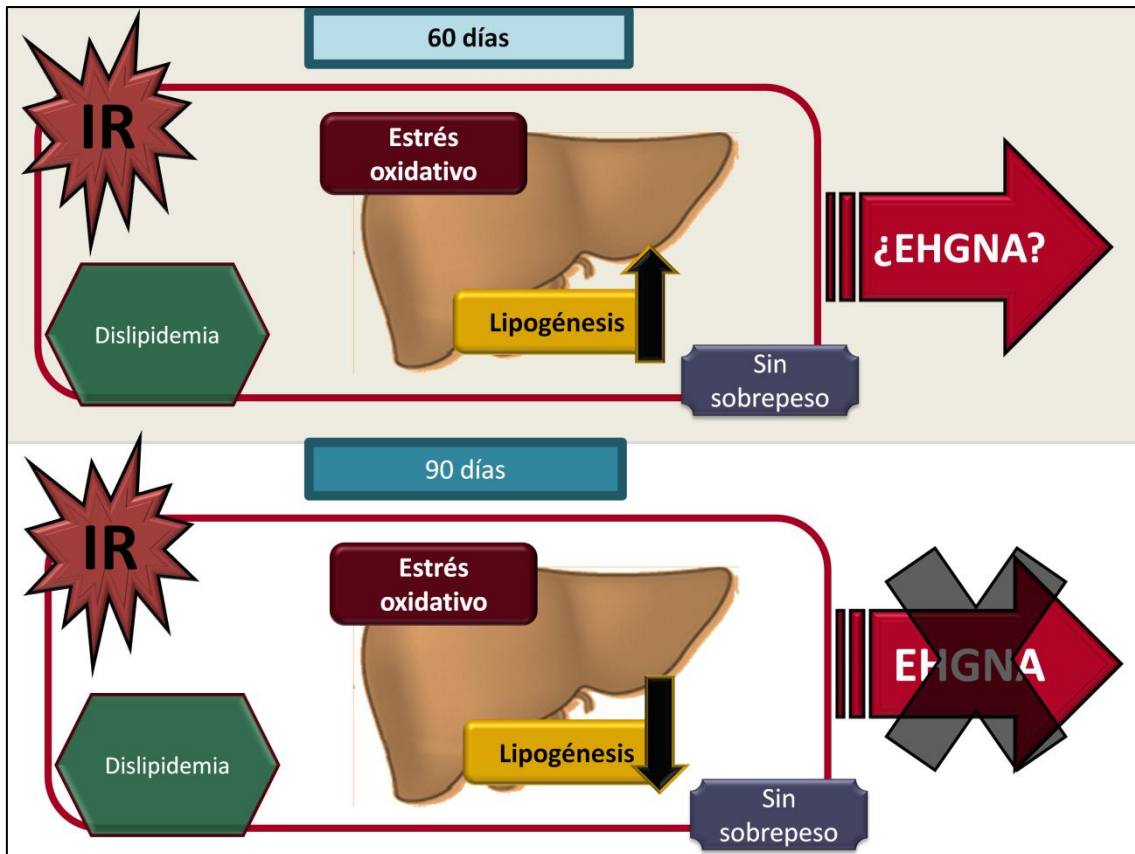


Figura 4.15: Esquema resumen de las alteraciones metabólicas y hepáticas en animales de 60 y 90 días de edad. A los 60 días se observa un cuadro metabólico alterado en los animales HP con dislipidemia, alteraciones en el metabolismo de glucosa e insulina pero sin sobrepeso. En el hígado se observó una estimulación de la vía lipogénica y daño por estrés oxidativo. Todo ello podría conducir al desarrollo de esteatosis y enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA) en edades avanzadas. A 90 días se observa también un cuadro metabólico alterado, sin sobrepeso, en animales HP así como estrés oxidativo hepático, pero los resultados revelaron una disminución de la lipogénesis sin presencia de acumulación de triglicéridos hepáticos y el desarrollo de EHGNA.

**V. Capítulo 2: Efectos de
la hiperandrogenización
prenatal sobre la
funcionalidad ovárica en
la transición a la edad
adulta (60 días).**

Capítulo 2

Efectos de la hiperandrogenización prenatal sobre la funcionalidad ovárica en la transición a la edad adulta (60 días).

Una vez caracterizado metabólicamente nuestro modelo de hiperandrogenización prenatal (Capítulo 1), nos propusimos evaluar, en primera instancia, los posibles efectos sobre la funcionalidad ovárica a 60 días de vida (transición a la adultez).

Resultados

Evaluación histológica y morfológica del ovario

Se evaluó la morfología ovárica en etapa puberal (Fig. 5.1.). El grupo control presentó ovarios con folículos en distintos estadios de desarrollo y la presencia de cuerpos lúteos (Fig. 5.1, A). Se observaron alteraciones en la morfología en los grupos HP (Fig. 5.1, B y C). El grupo HPiov presentó quistes (Fig. 5.1 B) los cuales están caracterizados por una fina capa de células de la granulosa y un engrosamiento de la capa de células de la teca (Fig. 5.1, D). En el grupo HPanov se observó, además de la presencia de quistes, un exceso de folículos preantrales invadiendo la estructura ovárica (Fig. 5.1, C).

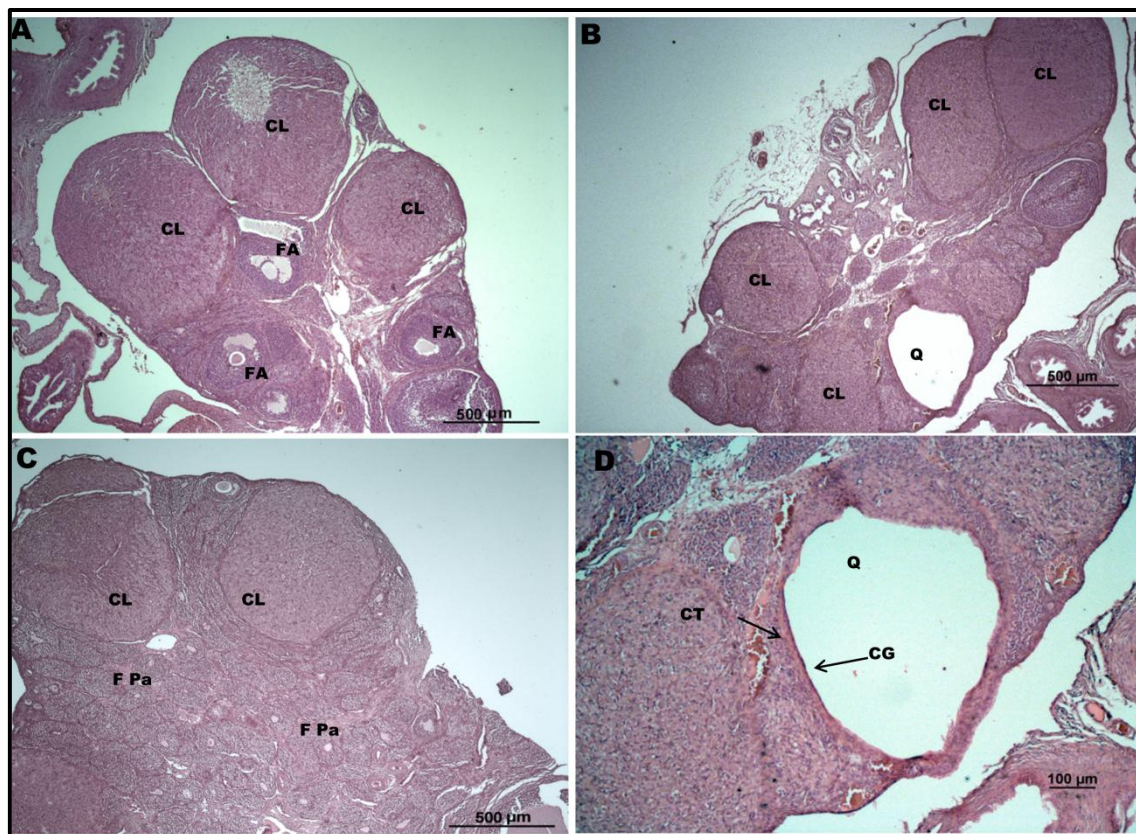


Figura 5.1: Cortes histológicos representativos de cada fenotipo con coloración de Hematoxilina eosina en animales de 60 días de edad. A) Grupo control (40X), B) Grupo HPiov (40X), C) Grupo HPanov (40X), D) Detalle de quiste (100X). Cuerpo Lúteo (CL), Folículo antral (FA), quiste (Q), células de la granulosa (CG), células de la teca (CT) y folículos preantrales (F Pa).

Si bien se observó la presencia de cuerpos lúteos en ambos fenotipos HP, los cuales pueden ser interpretados como señal de ovulación, los mismos presentaban un alto grado de degeneración. Asimismo, el conteo folicular reveló alteraciones en el desarrollo folicular de los fenotipos HP. Si bien no hubo alteraciones en el porcentaje de folículos primordiales de los grupos HP respecto de los animales controles (Fig. 5.2, A), sí encontramos un aumento del porcentaje de los folículos primarios en el fenotipo PHanov (Fig. 5.2, B) y una disminución del porcentaje de folículos preantrales en el fenotipo PHiov (Fig. 5.2, C). No encontramos diferencias en el porcentaje de los folículos antrales entre los grupos Control y HP (5.2, D). Por otro lado, si bien se encontraron cuerpos lúteos en los grupos HP (Fig. 5.2, E), el porcentaje de los mismos estaba disminuido. Asimismo los fenotipos HP presentaron quistes (Fig. 5.2, F).

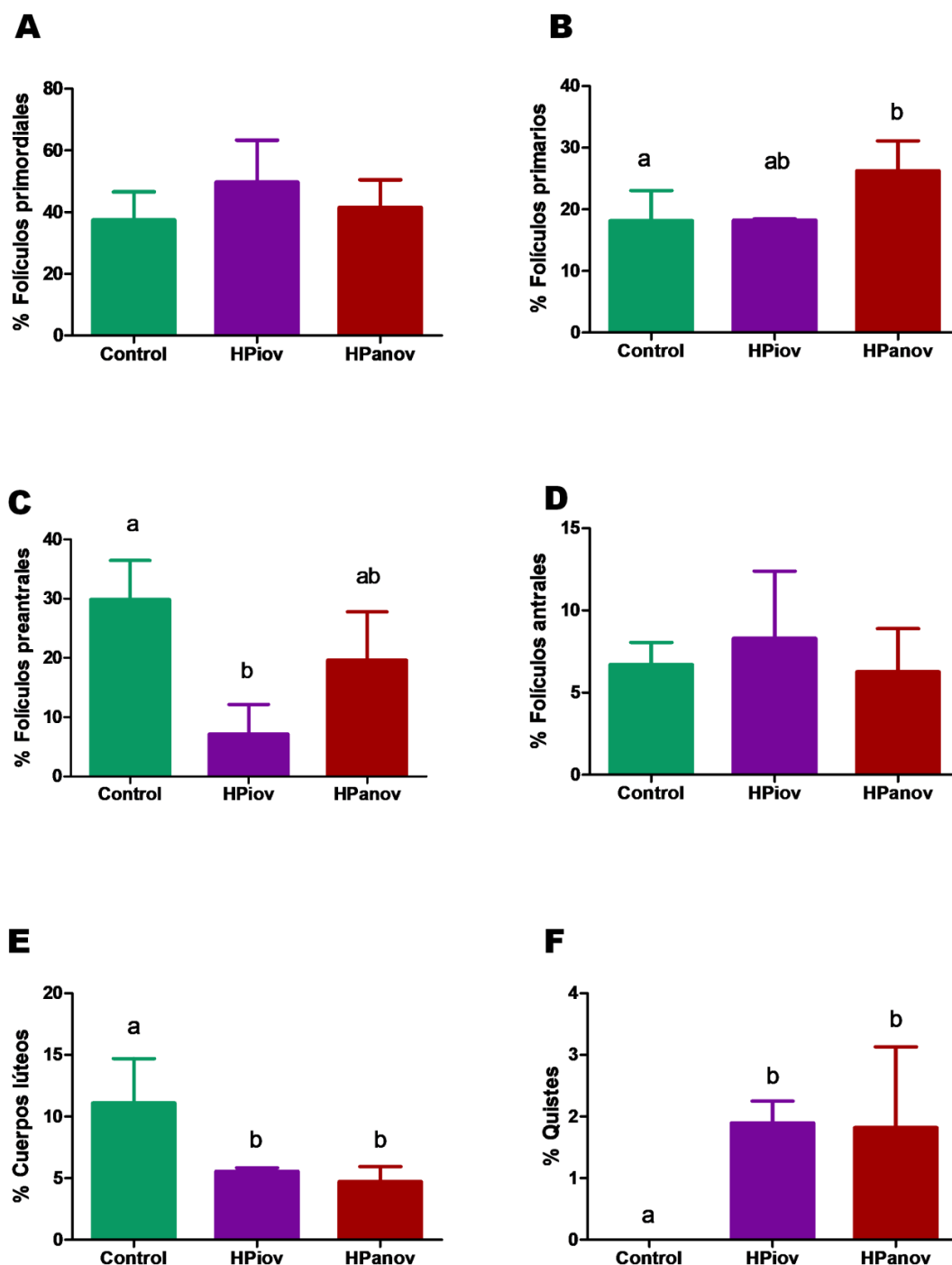


Figura 5.2: Efecto del hiperandrogenismo prenatal en la cuantificación del porcentaje de los distintos estadios foliculares ováricos. A) Porcentajes de folículos primordiales, B) Porcentajes de folículos primarios, C) Porcentajes de folículos preantrales, D) Porcentajes de folículos antrales, E) Porcentaje de cuerpos lúteos, F) Porcentaje de quistes. Cada columna representa la media + D.E. de 5 animales por grupo. a vs b $P < 0,05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey.

Evaluamos el peso del ovario y el índice de peso ovárico respecto del peso corporal (índice gonado somático), como marcador del desarrollo gonadal. Los resultados volcados a la

tabla 5.1 muestran que si bien el peso del ovario no se vio alterado entre los fenotipos, sí puede apreciarse una alteración en el índice gonado somático en el grupo HPanov.

	Control	HPiov	PHanov
Peso corporal a 60 días (g)	209,33±12,05 ^a	208,00±16,02 ^a	222,00±6,48 ^a
Peso medio ovárico a 60 días (g)	47,33±1,53 ^a	43,40±3,97 ^a	41,25±3,20 ^a
Índice gonado somático	0,22±0,02 ^a	0,21±0,03 ^{ab}	0,19±0,02 ^b

Tabla 5.1: Peso corporal, ovárico y relación gonado somática en etapa puberal en 8 animales por grupo. a vs.b p<0,05 por ANOVA con test port-hoc Tukey.

Evaluación de los niveles de hormonas circulantes

Con el objetivo de estudiar si el hiperandrogenismo prenatal tiene un efecto sobre la regulación hormonal involucrada en los procesos reproductivos se midieron los niveles de las gonadotrofinas LH y FSH, sus receptores y las principales hormonas esteroides sexuales secretadas por el ovario.

Gonadotrofinas

Los niveles de las gonadotrofinas FSH y LH (Fig. 5.3, A y B, respectivamente) no se vieron alterados entre los tratamientos. El índice LH/FSH, antiguo marcador de disfuncionalidad en la secreción de gonadotrofinas, tampoco se vio afectado entre los fenotipos (Fig. 5.3, C). Sin embargo, la expresión de los receptores ováricos de las gonadotrofinas se vieron alterados en los grupos HP. Los niveles de ARNm del receptor de FSH se encontraron disminuidos en el fenotipo HPiov respecto del grupo control, mientras que el fenotipo HPanov no presentó alteraciones en la expresión de *FSH-R* con respecto al grupo control (Fig. 5.3, D). La expresión de ARNm *LH-R* se vio aumentada en el fenotipo HPanov y se encontró una tendencia al aumento en el fenotipo HPiov (Fig. 5.3, E).

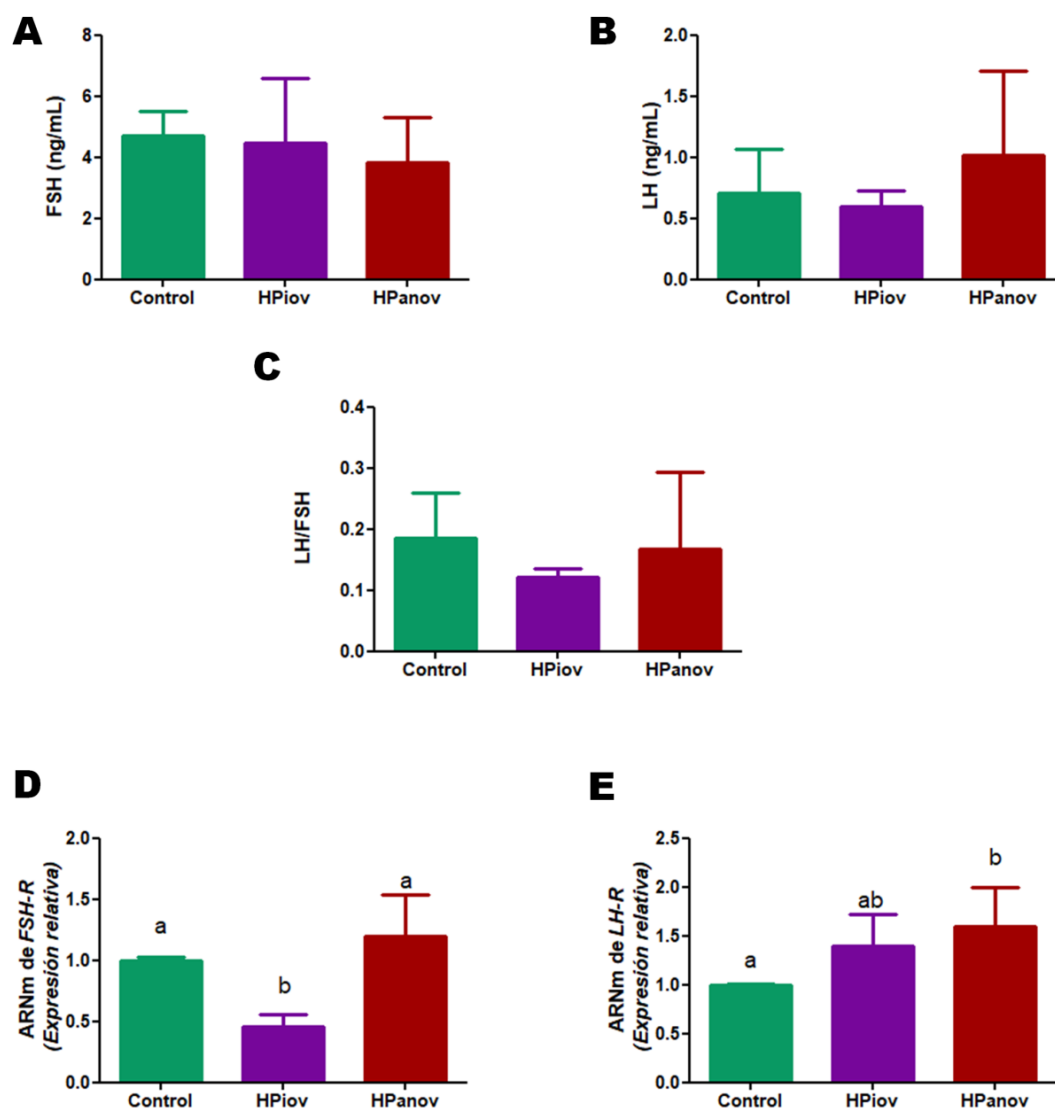


Figura 5.3: Niveles séricos de gonadotrofinas séricas y sus receptores medidas en diestro en animales de 60 días de edad. A) niveles de FSH, B) niveles de LH, C) índice LH/FSH y abundancia relativa de ARNm de D) *FSH-R* y E) *LH-R*. Cada columna representa la media + D.E. de grupos Control e Hiperandrogenizado prenatalmente (HP) para 7 animales por grupo para el caso de las gonadotrofinas y para 6 animales por grupo para el caso de los niveles de ARNm; a vs b $P < 0,05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey.

Hormonas esteroides

Los niveles séricos de testosterona, principal andrógeno secretado por el ovario, se encontraron incrementados en ambos fenotipos del grupo HP (Fig. 5.4, A). Los niveles de estradiol sólo se encontraron disminuidos en el fenotipo HPanov (Fig. 5.4, B). Los niveles de progesterona se vieron disminuidos en ambos fenotipos del grupo HP (Fig. 5.4, C). El índice estradiol/testosterona, marcador de funcionalidad ovárica, se encontró disminuido en ambos

fenotipos del grupo HP (Fig. 5.4, D). Estos resultados indican la presencia de hiperandrogenismo bioquímico en ambos fenotipos del grupo HP a 60 días de edad.

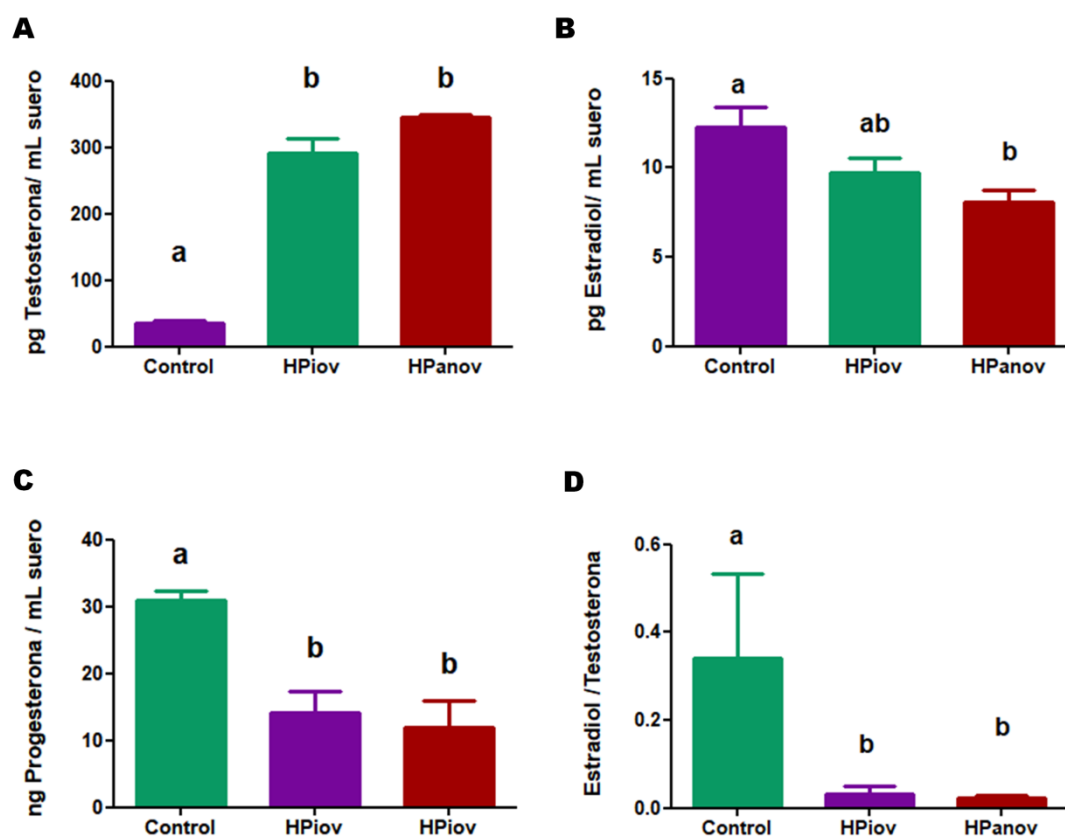


Figura 5.4: Niveles séricos de las principales hormonas esteroides gonadales medidas en diestro en animales de 60 días de edad. A) niveles de Testosterona (n=10 animales por grupo), B) niveles de Estradiol (n=10 animales por grupo) C) Nivel de Progesterona (n= 7 animales por grupo), D) índice Estradiol2/Testosterona. Cada columna representa la media + D.E. de grupos Control e Hiperandrogenizado prenatalmente (HP); a vs b $P < 0,05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey.

Esteroidogénesis ovárica

Debido a las alteraciones encontradas en los niveles circulantes de hormonas esteroides se decidió evaluar la expresión a nivel ARNm de diversos factores ováricos involucrados en la síntesis de dichos esteroides.

Los niveles de ARNm del transportador de colesterol, *StAR*, se encontraron aumentados sólo en el fenotipo HPanov (Fig. 5.5, A), revelando así una alteración de la esteroidogénesis desde sus primeros pasos. Los niveles del ARNm de *3BHSD* no se encontraron alterados (Fig. 5.5, B). Los niveles de ARNm de *CYP17A1*, enzima limitante en la síntesis de andrógenos ováricos, se encontraron disminuidos en el fenotipo HPiov (Fig. 5.5, C), mientras que los niveles

de *CYP19A1* (aromatasa, enzima limitante en la síntesis de estradiol) se encontraron disminuidos en el fenotipo HPanov (Fig. 5.5, D).

Estos resultados revelan alteraciones en la esteroidogénesis ovárica de forma fenotipo-específica.

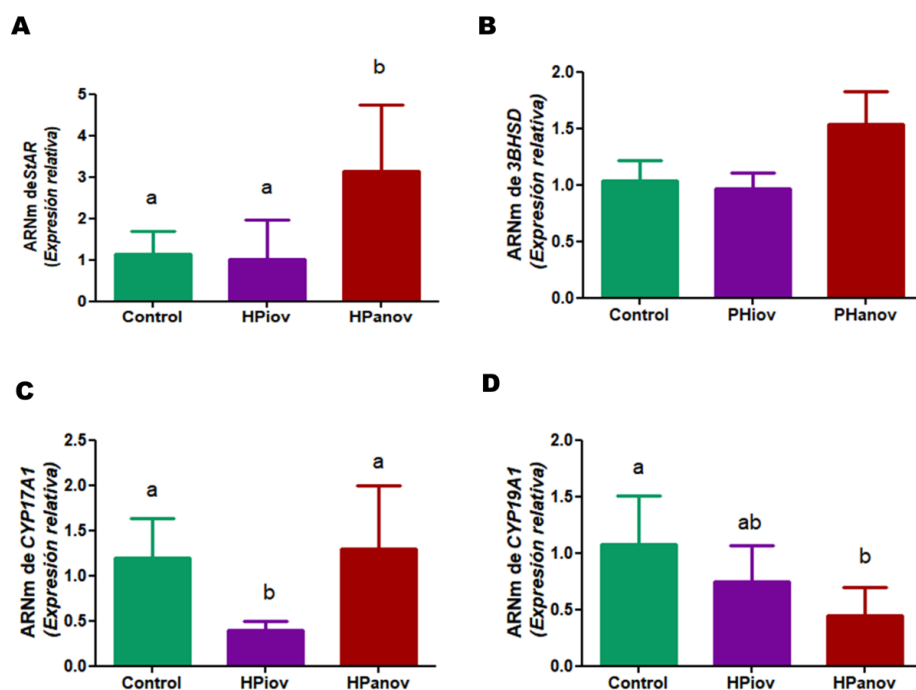


Figura 5.5: Abundancia relativa de ARNm de factores y enzimas involucrados en la esteroidogénesis relativos a L32. Expresión de A) *STaR* B) *3BHSD*, C) *CYP17A1*, D) *CYP19A1*. Cada columna representa la media + D.E. de grupos Control e Hiperandrogenizado prenatalmente (HP) en 6 muestras por grupo; a vs b $P < 0,05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey.

Sensores metabólico-energéticos reguladores de la esteroidogénesis

Debido a que los procesos reproductivos se encuentran regulados por el estado metabólico, se evaluaron los niveles de distintos factores que actúan como sensores energéticos, de los cuales se conoce, que están involucrados en las vías de regulación de la esteroidogénesis ovárica.

El primer factor evaluado fue PPARg teniendo en cuenta ambas dos isoformas en que puede presentarse (PPARg1 y PPARg2).

Se evaluaron los niveles de ARNm mediante cebadores que permiten amplificar ambas isoformas de *PPARg* y se observó que, a nivel transcripcional, existen alteraciones en ambos fenotipos (Fig. 5.6, A). Mediante cebadores específicos para el exón diferencial presente en la isoforma *PPARg2*, se cuantificaron los niveles de expresión transcripcional de la misma, no encontrándose alteraciones en los diferentes grupos evaluados (Fig. 5.6, B). Estos resultados sugieren que la isoforma alterada en los grupos HP sería la isoforma *PPARg1*. Para confirmar dichos resultados se evaluaron los niveles proteicos de PPARg en sus dos isoformas. Se observó que los niveles de PPARg1 se encuentran incrementados en ambos fenotipos del grupo HP (Fig. 5.6, C), mientras que los niveles de PPARg2 no se vieron afectados por la hiperandrogenización prenatal (Fig. 5.6, D).

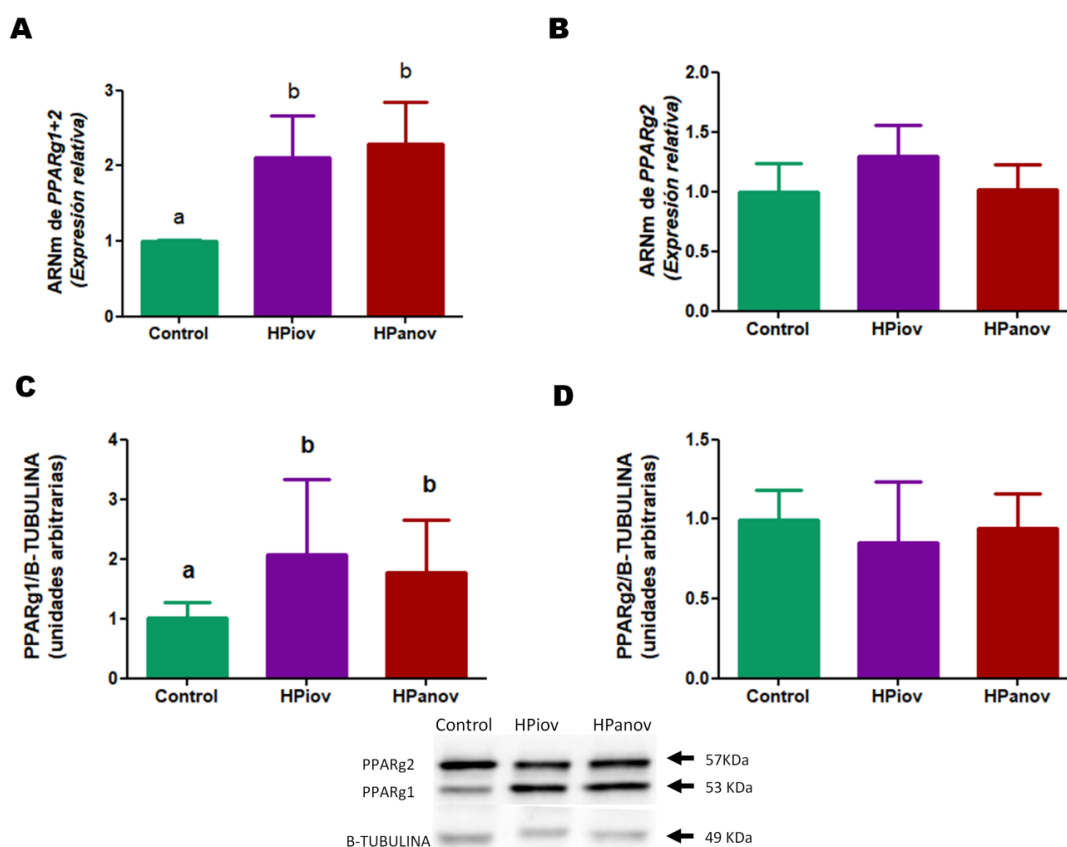


Fig. 5.6: Abundancia relativa de ARNm de las isoformas de PPARg A) isoformas *PPARg1+2*, B) isoforma *PPARg2*, y expresión proteica de las isoformas de PPARg relativas a B-tubulina C)PPARg1, d)PPARg2. Cada columna representa la media + D.E. de grupos Control e Hiperandrogenizado prenatalmente (HP) en 6 muestras por grupo; a vs b $P < 0,05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey.

Adipoquinas ováricas

Además de PPARg, las adipoquinas son moléculas que tienen señales autocrinas en el ovario y regulan la esteroidogénesis. En particular, se evaluaron los niveles de tres adipoquinas: leptina, adiponectina y quemerina, las cuales presentan interacciones con PPARg.

Los niveles de ARNm de *Leptina* se encontraron disminuidos en el fenotipo HPanov (Fig. 5.7, A), mientras que no encontramos diferencias significativas para los niveles proteicos entre los grupos analizados (Fig. 5.7, B). Los niveles de ARNm de *Adiponectina* se encontraron incrementados sólo en el fenotipo HPiov (Fig. 5.7, B) mientras que los niveles proteicos de esta adipoquina se vieron disminuidos en ambos fenotipos HP (Fig. 5.7, C). En cuanto a la expresión de Quemerina, tanto los niveles de ARNm como los niveles proteicos de la misma se vieron incrementados en el fenotipo HPiov (Fig. 5.7, C y D). Estos resultados muestran que cada fenotipo del grupo HP presenta un patrón particular de adipoquinas.

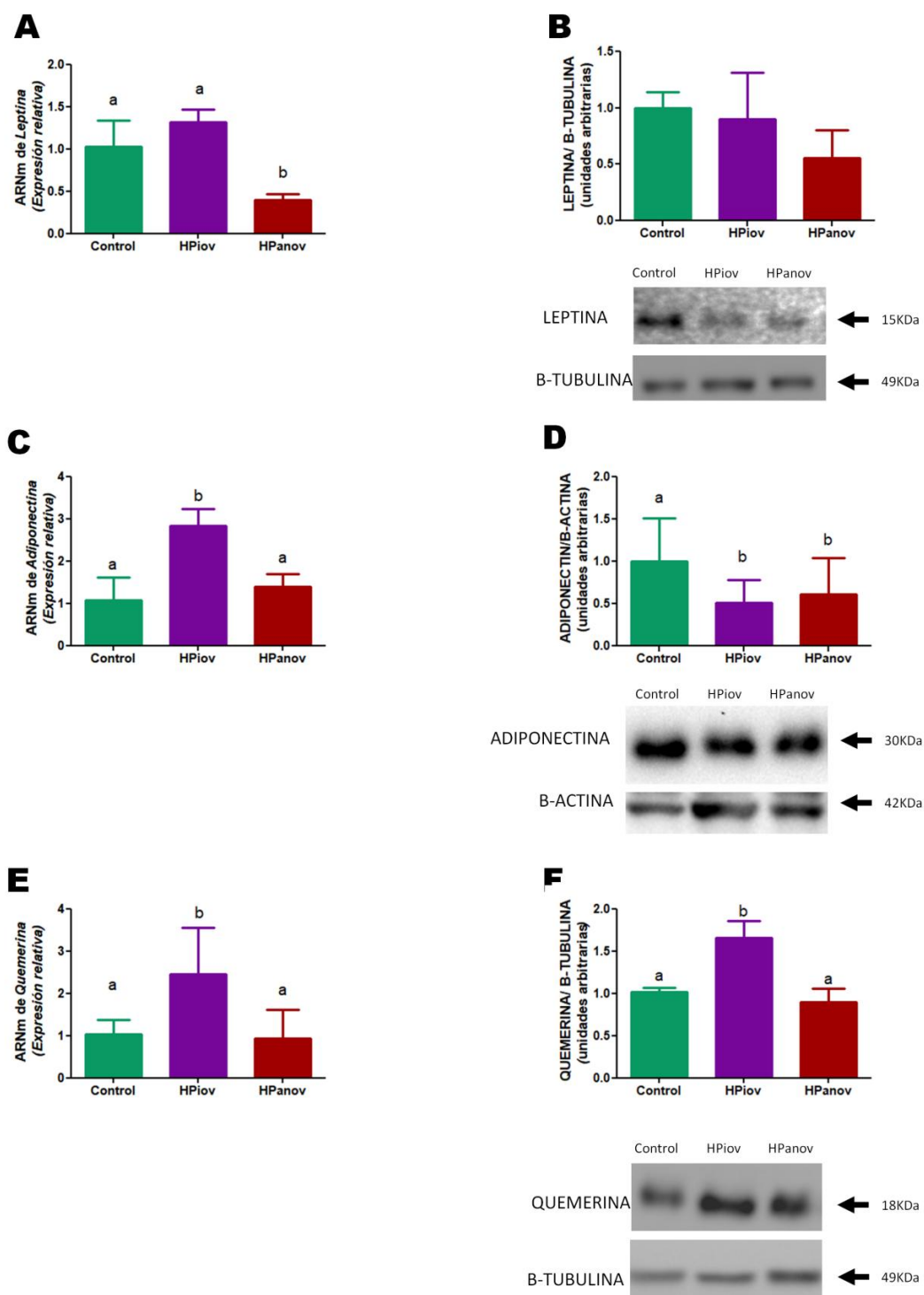


Figura 5.7: Abundancia relativa de A) ARNm de *Leptina*, B) Expresión proteica de *Leptina*, C) ARNm de *Adiponectina*, D) Expresión proteica de *Adiponectina*, E) ARNm de *Quemerina*, F) Expresión proteica de *Quemerina*. Los niveles de ARN se normalizaron y relativizaron a los niveles de L32. Los niveles proteicos se relativizaron a B-Tubulina o B- Actina. Cada columna representa la media + D.E. de grupos Control e Hiperandrogenizado prenatalmente (HP) en 6 muestras por grupo; a vs b $P < 0,05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey.

En su conjunto, todos estos resultados sugieren que el hiperandrogenismo prenatal conlleva a alteraciones en el desarrollo, morfología y funcionalidad ovárica, afectando la esteroidogénesis y el desarrollo folicular así como también los mediadores energéticos intra ováricos.

Discusión

El balance metabólico y las funcionalidades reproductivas se encuentran asociados y conjuntamente regulados. Las funciones reproductivas dependen del balance energético; alteraciones metabólicas como la obesidad, desnutrición e insulino resistencia pueden impactar negativamente en la reproducción femenina (Torre et al., 2014). En el caso de pacientes con SOP, se ha descrito que no sólo presentan alteraciones reproductivas sino también metabólicas, varias de las cuales pudieron replicarse en nuestro modelo, como describimos en el capítulo anterior. La presencia de alteraciones del metabolismo en SOP ha llevado a que el síndrome se considere como una patología endócrino metabólica y asimismo a tratar a las pacientes con SOP con fármacos reguladores del metabolismo, como son las glitazonas y la metformina que actúan como insulino sensibilizantes, lo que conlleva no sólo a la mejora de los parámetros metabólicos sino también de los reproductivos (Kim et al., 2010; Mohsen, 2012; Penzias et al., 2017). Nuestros resultados demuestran que la hiperandrogenización prenatal conlleva a alteraciones tanto metabólicas como reproductivas desde edades tempranas.

En el capítulo anterior demostramos que el hiperandrogenismo prenatal lleva al desarrollo de dos fenotipos respecto del ciclo estral (HPiov y HPanov). Los resultados de este capítulo mostraron que el hiperandrogenismo prenatal conlleva asimismo a alteraciones en la morfología y funcionalidad ovárica en ambos fenotipos.

En el grupo HP encontramos un exceso de folículos primarios, una disminución de folículos pre-antrales y la presencia de quistes. Estos resultados sugieren que el desarrollo folicular en los grupos HP está alterado, principalmente en los estadios que son independientes de la señalización de gonadotrofinas. Contrariamente a nuestros resultados, las mujeres con SOP presentan un aumento en el porcentaje de folículos preantrales (Chang y Cook-Andersen, 2013). Sin embargo, la disminución de folículos preantrales también ha sido reportada en otros modelos animales de SOP y contextos androgénicos (Revisado en Noroozzadeh et al. (2017) (Noroozzadeh et al., 2017)). Posiblemente los folículos preantrales de las ratas empiezan a crecer pero su desarrollo es anormal y tiende a la formación de quistes. Inesperadamente, encontramos la presencia de cuerpos lúteos en animales que

presentaron ciclos anovulatorios. Esto, sin embargo, ha sido demostrado por otros autores que describen la presencia de cuerpos lúteos en animales con ciclos estrales alterados acíclicos y que incluso no presentan apertura vaginal (Wu et al., 2010; Amalfi et al., 2012). Por otro lado, es importante resaltar que los cuerpos lúteos encontrados presentaron alteraciones en su funcionalidad dado que encontramos bajos niveles de progesterona en los animales HP. Asimismo, en trabajos anteriores de nuestro laboratorio hemos demostrado en ratas con ciclos estrales acíclicos la presencia de cuerpos lúteos con luteneización anormal (Amalfi et al., 2012).

Otra de las alteraciones encontradas corresponde al índice gonado-somático (peso ovárico promedio / peso corporal). Éste es usualmente utilizado como marcador de crecimiento prenatal y dado que alteraciones durante la vida intrauterina pueden perturbar a las gónadas en desarrollo, su evaluación resulta de gran interés en nuestro modelo. Este índice ha sido descrito como un mejor marcador frente al peso gonadal para la estimación de dichas alteraciones (Fujikura y Froehlich, 1972; Mitropoulos G. et al., 2008). Nuestros resultados mostraron que el fenotipo anovulatorio presenta un índice alterado. Esto podría estar reflejando que los animales que presentan el fenotipo HPanov han experimentado efectos perjudiciales durante el desarrollo debido al hiperandrogenismo, lo que condicionaría su crecimiento y fisiología en la vida post natal. El hecho de que el fenotipo HPiov no se viera afectado en cuanto a su índice gonado-somático podría estar reflejando que el ambiente intrauterino no es homogéneo para las crías en desarrollo, tal cual comentamos en el capítulo anterior, de esta forma las menos afectadas podrían haber desarrollado alteraciones que se traducen en su vida adulta como menos severas. Esto explicaría, al menos en parte, la presencia de los dos fenotipos hallados.

Se sabe que la esteroidogénesis ovárica depende tanto de la regulación energética como así también del control neuroendocrino y hormonal. Nuestros resultados mostraron que los niveles de las hormonas hipofisarias FSH y LH no se encontraron alteradas en los grupos HP. Sin embargo, sí encontramos una expresión alterada de sus receptores: FSH-R y LH-R, lo que sugiere una posible alteración de la señalización dada por estas gonadotrofinas en el ovario. Estos resultados concuerdan con estudios previos, en donde en contextos androgénicos los niveles de gonadotrofinas se mantienen inalterados pero sí se encontraron alteraciones en la pulsatilidad, lo que podría estar contribuyendo a la disfunción neuroendocrina (Foecking et al., 2005; Yan et al., 2014). Es necesario tener en cuenta que, debido a que los niveles hormonales varían según el estadio del ciclo estral y que los animales que presentan fenotipos anovulatorios sólo permanecen en diestro (variando a veces sólo a metaestro), no pudimos evaluar la variación de dichas hormonas ni su pulsatilidad dado que solo hemos analizado su

secreción en diestro para poder comparar con las ratas anovulatorias, que permanecían mayoritariamente en dicho estadio.

Asimismo, nuestros resultados revelaron que si bien la secreción de LH y FSH no estaría alterada, sí se encuentra afectada la respuesta ovárica a dichas gonadotrofinas. Esto se podría ver reflejado en las alteraciones halladas en la esteroidogénesis ovárica así como también en las desregulaciones respecto del ciclo estral. En relación a la acción de las gonadotrofinas respecto de la foliculogénesis ovárica, es de destacar que FSH actúa induciendo la maduración folicular y que junto con el estrógeno, pueden actuar induciendo la ovulación (Hunzicker-Dunn y Maizels, 2006). En este trabajo, encontramos que el fenotipo HPiov presenta una disminución de los niveles de *FSH-R*, lo que podría afectar la respuesta ovárica a esta hormona. Asimismo, los animales HPiov presentan bajos niveles de estradiol y un bajo índice de estradiol/testosterona, por lo que este desbalance hormonal y alteración en la señalización de FSH estaría contribuyendo a la irregularidad de los ciclos estrales presentes en este fenotipo.

Por otro lado, en el fenotipo HPanov, encontramos altos niveles de *LH-R*, lo que contribuiría a un aumento en la respuesta a LH y así también, a un incremento en la producción de andrógenos (Hunzicker-Dunn y Maizels, 2006; Raju et al., 2013). Esto puede verse reflejado en los altos niveles de testosterona que presenta este fenotipo y en la alteración del índice estradiol/testosterona.

Nuestros resultados muestran que la hiperandrogenización prenatal conlleva, desde el comienzo de la adultez, a características que se evidencian en pacientes con SOP (hiperandrogenismo bioquímico, disfuncionalidad ovulatoria, morfología de ovario poliquístico) (Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group, 2004) dado que encontramos que los animales presentan altos niveles séricos de testosterona, un desbalance hormonal caracterizado también por bajos niveles de estradiol, presencia de quistes ováricos y alteraciones en el ciclo estral. De esta forma, nuestro modelo de programación intrauterina del desarrollo por exceso androgénico puede ser considerado como un modelo animal no sólo para el estudio de los efectos de las alteraciones androgénicas durante el desarrollo sino, particularmente, para el estudio de SOP.

La esteroidogénesis ovárica es un proceso que depende del control neuroendocrino, paracrino autocrino y del balance energético. En este capítulo, encontramos que se ven afectados sensores energéticos ováricos. Cada fenotipo presentó una desregulación diferencial tanto en los sensores energéticos cuantificados así como también, en los mediadores de la esteroidogénesis. La señalización energética en el ovario involucra a sensores metabólicos maestros como son PPAR γ y las adipoquinas. Es importante tener en cuenta que PPAR γ es capaz de regular la expresión génica de distintas adipoquinas y asimismo, estas últimas pueden

regular a PPARg involucrando redes complejas de modulación (Cabrero et al., 2005; Muruganandan et al., 2011; Mirzaei et al., 2013; Bharati et al., 2016). Se conoce también que las enzimas involucradas en la esteroidogénesis ovárica están controladas por dichos sensores energético-metabólicos (Kitawaki et al., 1999; Fan et al., 2005; Reverchon et al., 2014b) por lo que dicho sistema resulta interesante de estudiar.

Nuestros resultados demostraron que la hiperandrogenización prenatal conlleva a una alterada expresión de PPARg en ambos fenotipos HP a 60 días de edad. Particularmente, encontramos que ambas isoformas de PPARg1 y PPARg2 se expresan en los ovarios de animales HP, sin embargo, la isoforma PPARg1 se encontró incrementada en su expresión tanto génica como proteica en ambos fenotipos HP. Estos resultados concuerdan con lo hallado por otros autores poniendo de manifiesto que la isoforma PPARg1 sería la más importante en el ovario (Komar, 2005; Froment et al., 2006).

Se ha demostrado que PPARg podría influenciar el desarrollo de células de la granulosa y que alteraciones en su expresión afectan a los oocitos, comprometiendo las funciones ováricas (Komar, 2005; Froment et al., 2006). De esta forma, alteraciones en los niveles de PPARg en el ovario podrían estar contribuyendo a la desregulación del ciclo estral, tal como se observa en los grupos HP. Por otro lado, los PPARs también regulan los niveles de estradiol, debido a que pueden unirse a elementos de respuesta a estrógeno e inhibir el estradiol mediante la regulación de la expresión de aromatasa, enzima limitante de su síntesis (Keller et al., 1995; Nuñez et al., 1997; Yanase et al., 2001; Lovekamp-Swan et al., 2003). En concordancia con estos resultados, encontramos que los niveles de estradiol están disminuidos en el fenotipo HPanov, y que los niveles de ARNm de la enzima aromatasa están alterados. Dado que PPARg puede modular a la aromatasa, su acción contribuiría al desbalance hormonal caracterizado por una alteración de la relación testosterona/estradiol en los grupos HP. Estos resultados están de acuerdo con otros estudios que han revelado que en contextos hiperandrogénicos, PPARg se encuentra aumentado, contribuyendo a la alteración en la producción de andrógenos (Ortega et al., 2010; Amalfi et al., 2012). Nuestros resultados apoyan la idea que PPARg podría ser uno de los mediadores involucrados en la programación fetal de la disfuncionalidad ovárica en contextos de exceso androgénico (Ortega et al., 2010).

Por otro lado, se sabe que las adipocinas pueden actuar como mediadores metabólicos de la regulación ovárica, actuando sobre la esteroidogénesis ovárica, la maduración de los oocitos y el desarrollo embrionario (Reverchon et al., 2014b). Nosotros nos concentramos particularmente en tres adipocinas: leptina, adiponectina y quemerina debido a que están involucradas en la regulación de la esteroidogénesis ovárica y asimismo están asociadas a

PPARg (Barkan et al., 1999; Kendall et al., 2004; Karamouti et al., 2009; Muruganandan et al., 2011; Wang et al., 2012b, 2013; Reverchon et al., 2014b).

En cuanto a leptina, el fenotipo HPanov mostró una disminución de los niveles de su ARNm. Se ha demostrado que bajos niveles de leptina se encuentran asociados a estados de infertilidad (Cornejo et al., 2016). Asimismo, otros autores han mostrado que los niveles de leptina se encuentran inversamente correlacionados a los niveles de PPARg en distintos tejidos (Cabrero et al., 2005; Wang et al., 2012a; Abbasi et al., 2017). Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en los niveles proteicos de esta adipocina. Esto podría deberse a una desregulación en su secreción. Particularmente, se ha demostrado que los andrógenos tienen un impacto negativo en la exocitosis de leptina (Jenks et al., 2017). Por lo que, el exceso androgénico podría estar alterando la vía secretora de leptina en el ovario.

Por otro lado, en el fenotipo HPanov, no encontramos alteraciones respecto de los niveles de quemerina pero sí hallamos una disminución en la expresión proteica de adiponectina, sin alteraciones en el ARNm de esta adipocina. Se ha demostrado que adiponectina regula la maduración folicular, particularmente los cambios pre ovulatorios en el ovario pero también la esteroidogénesis (Ledoux et al., 2006; Dobrzyn et al., 2018). Esta evidencia concuerda con nuestros resultados, ya que los bajos niveles de leptina y adiponectina en el fenotipo HPanov podrían estar asociados al aumento en el porcentaje de folículos primarios hallados en estos animales y asimismo, podrían estar contribuyendo a las alteraciones reproductivas y disfuncionalidad ovulatorias encontradas. Es importante resaltar también que adiponectina actúa como un agente sensibilizante a la acción de insulina en distintos tejidos (Dupont et al., 2008; Michalakis y Segars, 2010) y en mujeres con SOP se ha descrito que pacientes con cuadros severos de insulino resistencia presentan bajos niveles de adiponectina (Michalakis y Segars, 2010). En relación a lo descrito, en el capítulo anterior mostramos que el fenotipo HPanov presenta insulino resistencia, por lo que, estos resultados sugieren que la desregulación en la expresión ovárica de adiponectina podría estar asociada a las alteraciones metabólicas encontradas.

En el fenotipo HPiov, los niveles proteicos y de ARNm de leptina no se vieron afectados respecto de los niveles del grupo control, sin embargo, los niveles proteicos de adiponectina sí se encontraron disminuidos en este fenotipo, mientras que la expresión de su ARNm se encontró aumentada. Estos resultados sugieren, que en el fenotipo HPiov (que presenta menores alteraciones metabólicas respecto del HPanov (ver capítulo 1)) el aumento en la expresión génica a nivel transcripcional se daría en respuesta a los bajos niveles proteicos de esta adipocina. Es importante resaltar que existen diferentes mecanismos post-

transcripcionales que regulan la traducción de los ARNm de diversas molecular, por ejemplo el caso de los micro ARN y que los mismos son susceptibles de programación fetal. En particular, en el caso de adiponectina, se ha descripto que miR-378 modula su expresión en tejido adiposo (Ishida et al., 2014) y asimismo se ha demostrado que este micro ARN se expresa en ovario y también puede modular negativamente la expresión de aromatasa (Xu et al., 2011). Sin embargo, hasta nuestro conocimiento, no hay estudios que hayan asociado miR-378 con SOP así como tampoco con la regulación ovárica de adiponectina. Por lo que, la regulación de esta adipoquina en ovario y el rol de los micro ARN, es un campo de estudio interesante a abordar en la investigación de alteraciones ováricas en contextos androgénicos y, en particular, en modelos de hiperandrogenización prenatal.

En el fenotipo HPiov también encontramos un aumento tanto en la expresión génica como proteica de quemerina. Se ha sugerido que esta adipoquina puede inhibir la esteroidogénesis (Wang et al., 2012b), y que la expresión génica de quemerina puede ser regulada por PPARg (Muruganandan et al., 2011; Wang et al., 2012b, 2013). Por lo que, adiponectina y quemerina en este fenotipo, podrían contribuir mutuamente a las alteraciones ováricas halladas en este fenotipo.

Como mencionamos anteriormente, la regulación de las enzimas esteroidogénicas está dada, entre otros factores, por PPARg y las adipoquinas estudiadas. Nuestros resultados mostraron que la expresión de la proteína StAR, que participa en los primeros pasos de la regulación esteroidogénica, se vio aumentada en el fenotipo HPanov. Asimismo encontramos un patrón fenotipo-específico en las alteraciones halladas respecto de CYP17A1 y aromatasa, enzimas limitantes de la síntesis de andrógenos y estradiol, respectivamente.

Por un lado, el fenotipo HPiov, mostró bajos niveles de expresión de la enzima CYP17A1 y una tendencia a la disminución de los niveles de aromatasa. Se sabe que adiponectina puede regular negativamente a CYP17A1 y asimismo, se ha postulado que el sistema PPARg modularía la expresión de esta enzima (Veldhuis et al., 2002; Velez et al., 2015). Por lo que, en este fenotipo estos sensores metabólicos podrían estar contribuyendo a una regulación de la síntesis de andrógenos. Por otro lado, se ha demostrado que quemerina actúa regulando negativamente a CYP19A1 e inhibiendo los niveles de estradiol (Reverchon et al., 2012). De acuerdo con esto, nuestros resultados revelaron altos niveles de quemerina en el fenotipo HPiov y una tendencia a la disminución en los niveles de estradiol y CYP19A1.

En el caso del fenotipo HPanov, no encontramos alteraciones en la expresión de CYP17A1 pero sí una disminución de la expresión de aromatasa. De acuerdo con esto, se sabe

que leptina regula la actividad de aromatasa, modulando la síntesis de estradiol. Asimismo, y tal cual fue comentado, encontramos altos niveles de PPARg el cual modula positivamente a StAR y negativamente a aromatasa (Kitawaki et al., 1999; Fan et al., 2005). Por lo que, en el fenotipo HPanov, tanto PPARg como leptina estarían implicados en la desregulación de la esteroidogénesis.

Estos resultados revelan que, aún en ausencia de obesidad o sobrepeso (ver capítulo 1), la hiperandrogenización prenatal conlleva a alteraciones en el balance energético del ovario, en el cual están involucrados el sensor metabólico maestro, PPARg y las adipoquinas leptina, adiponectina y quemerina. Este desbalance energético intra ovárico, está asociado a alteraciones en la esteroidogénesis y desarrollo folicular, así como también a una desregulación hormonal y de señalización de las gonadotrofinas.

Teniendo en cuenta las alteraciones halladas a 60 días de edad, el paso siguiente fue analizar los efectos de la hiperandrogenización prenatal a largo plazo.

Resumen visual del capítulo 2

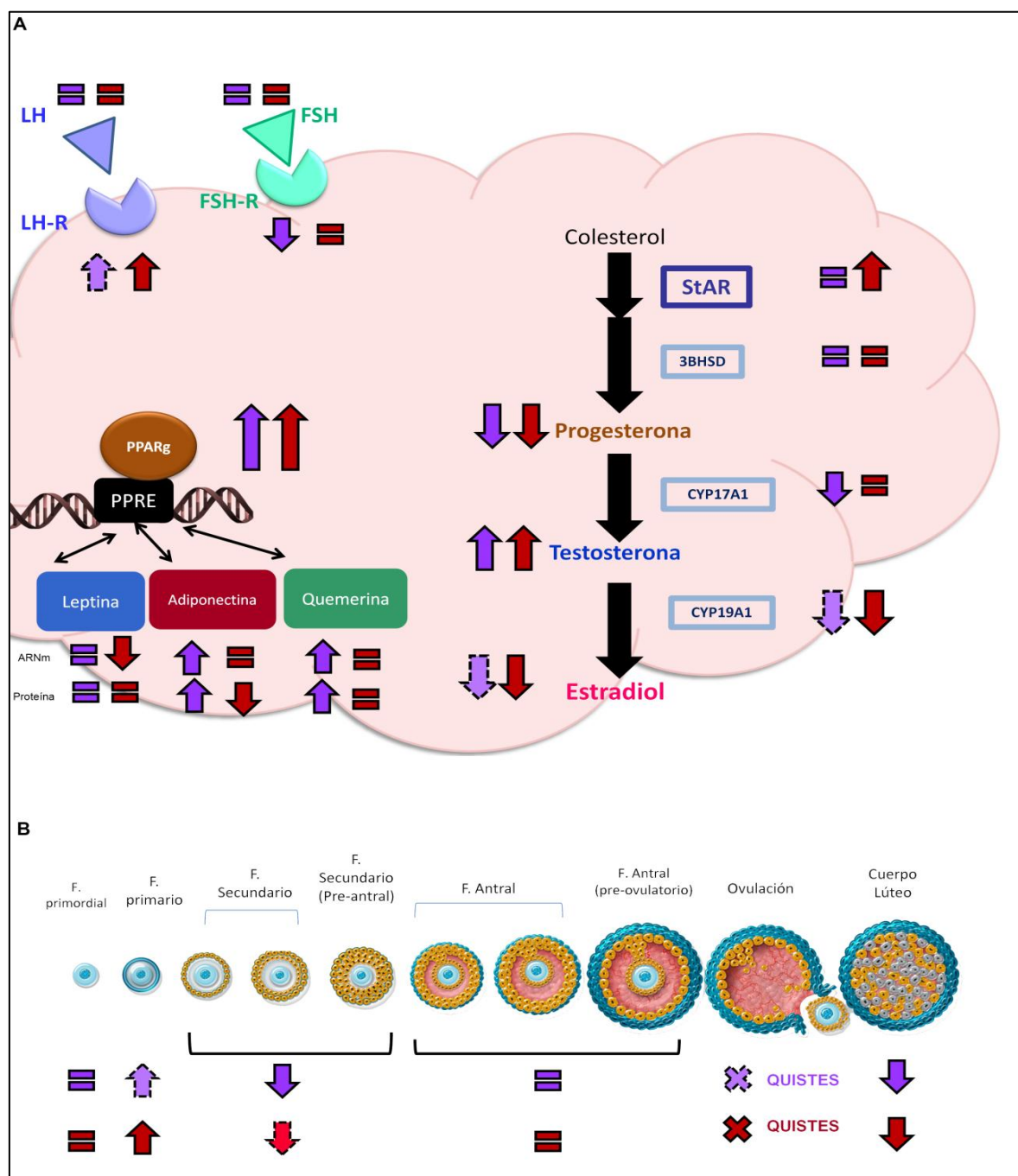


Figura 5.8: Alteraciones en la funcionalidad ovárica de animales de 60 días de edad. A) Alteraciones en la vía y regulación de la esteroidogénesis, B) Alteraciones en la foliculogénesis. Flechas y signos igual indican la desregulación (en el caso de flechas) o no (signos iguales) respecto del grupo control en los fenotipos HPiov (violeta) y HPanov (rojo). Flechas con contorno discontinuo indican tendencia. Flechas con contorno continuo indican diferencias significativas en el análisis estadístico realizado.

VI. Capítulo 3: Efectos de la hiperandrogenización prenatal sobre la regulación de la esteroidogénesis ovárica en edad adulta.

Capítulo 3

Efectos de la hiperandrogenización prenatal sobre la regulación de la esteroidogénesis ovárica en edad adulta

Debido a que en la transición a la adultez (60 días) encontramos alteraciones ováricas inducidas por hiperandrogenización prenatal (Capítulo 2), y con el objetivo de evaluar y profundizar en el estudio de sus efectos sobre las funciones reproductivas a largo plazo, en este capítulo nos propusimos analizar la funcionalidad ovárica en edad adulta (90 días de edad).

Resultados

Evaluación de los niveles de hormonas circulantes

Gonadotrofinas

En la adultez los niveles de las gonadotrofinas FSH y LH (Fig. 6.1, A y B, respectivamente) no se vieron alterados entre los tratamientos. El índice LH/FSH tampoco se vio afectado entre los fenotipos (Fig. 6.1, C).

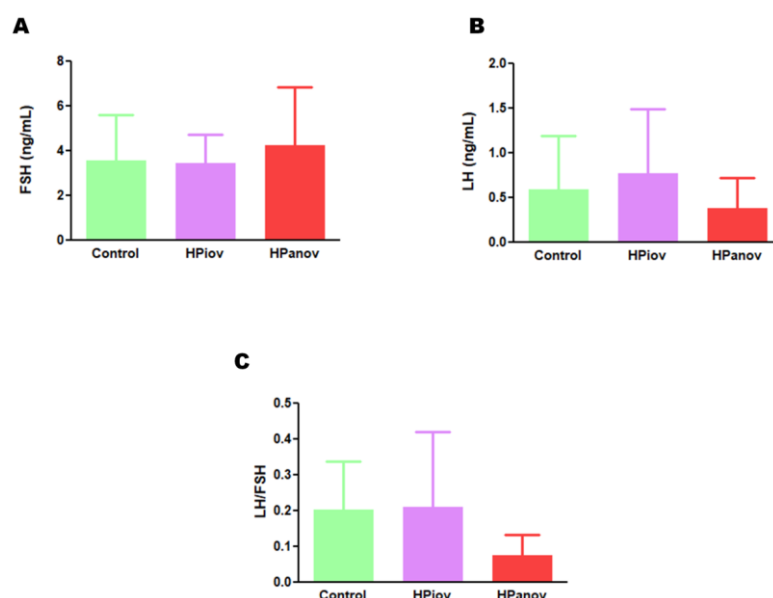


Figura 6.1: Niveles séricos de gonadotrofinas séricas medidas en diestro en animales de 90 días de edad. A) niveles de FSH, B) niveles de LH, C) índice LH/FSH. Cada columna representa la media + D.E. de grupos Control e Hiperandrogenizado prenatalmente (HP) en 7 muestras por grupo; a vs b $P < 0,05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey.

Hormonas esteroides

Los niveles séricos de testosterona se encontraron incrementados, en la vida adulta, sólo en el fenotipo HPanov (Fig. 6.2, A). Los niveles de estradiol fueron menores en ambos fenotipos HP (Fig. 6.2, B). El índice estradiol/testosterona, se halló disminuido en ambos fenotipos del grupo HP (Fig. 6.2, C). Los niveles de progesterona no se vieron afectados entre los grupos estudiados a 90 días de edad (Fig. 6.2, D). Estos resultados indican que la presencia de hiperandrogenismo bioquímico, medida por los niveles de testosterona, se mantendría con respecto a los 60 días de edad, sólo en el fenotipo HPanov. Sin embargo, en el fenotipo HPiov, se observa una disfuncionalidad en la síntesis de esteroides y un desbalance en la relación andrógeno/estrógeno.

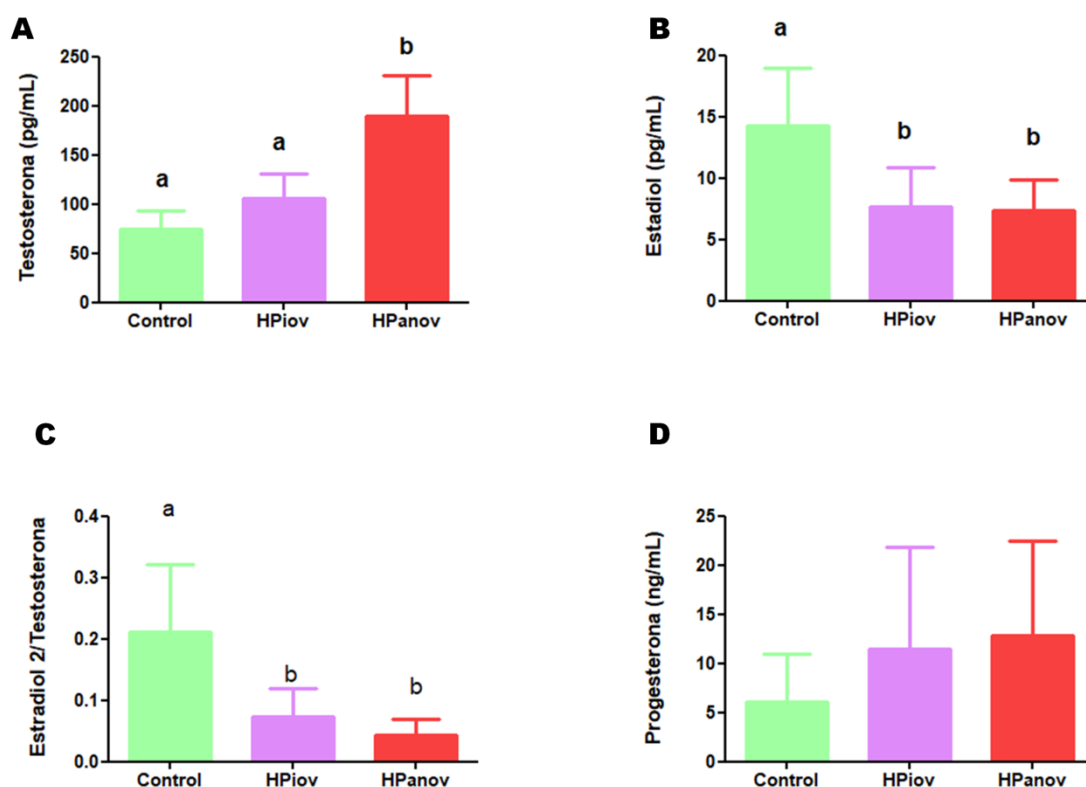


Figura 6.2: Niveles séricos de las principales hormonas esteroides gonadales medidas en diestro en animales de 90 días de edad. A) niveles de Testosterona, B) niveles de Estradiol C) índice Estradiol2/Testosterona D) niveles de Progesterona. Cada columna representa la media + D.E. de grupos Control e Hiperandrogenizado prenatalmente (HP) en 7 muestras por grupo; a vs b $P < 0,05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey.

Morfología ovárica

El estudio de la morfología ovárica a 90 días de edad (Fig. 6.3) reveló que los grupos HP presentan alteraciones tal cual se observó a 60 días de edad. El grupo control presentó ovarios con folículos en distintos estadios de desarrollo. Se pueden observar folículos antrales y folículos preantrales de tamaño avanzado, así como también la presencia de cuerpos lúteos (Fig. 6.3, A). Ambos grupos HP presentaron gran cantidad de folículos preantrales de tamaño pequeño (Fig. 6.3, B y C) y quistes, como se observa en la Figura 6.3, C. En ambos grupos HP también se observó la presencia de cuerpos lúteos , pero con un alto grado de degeneración.

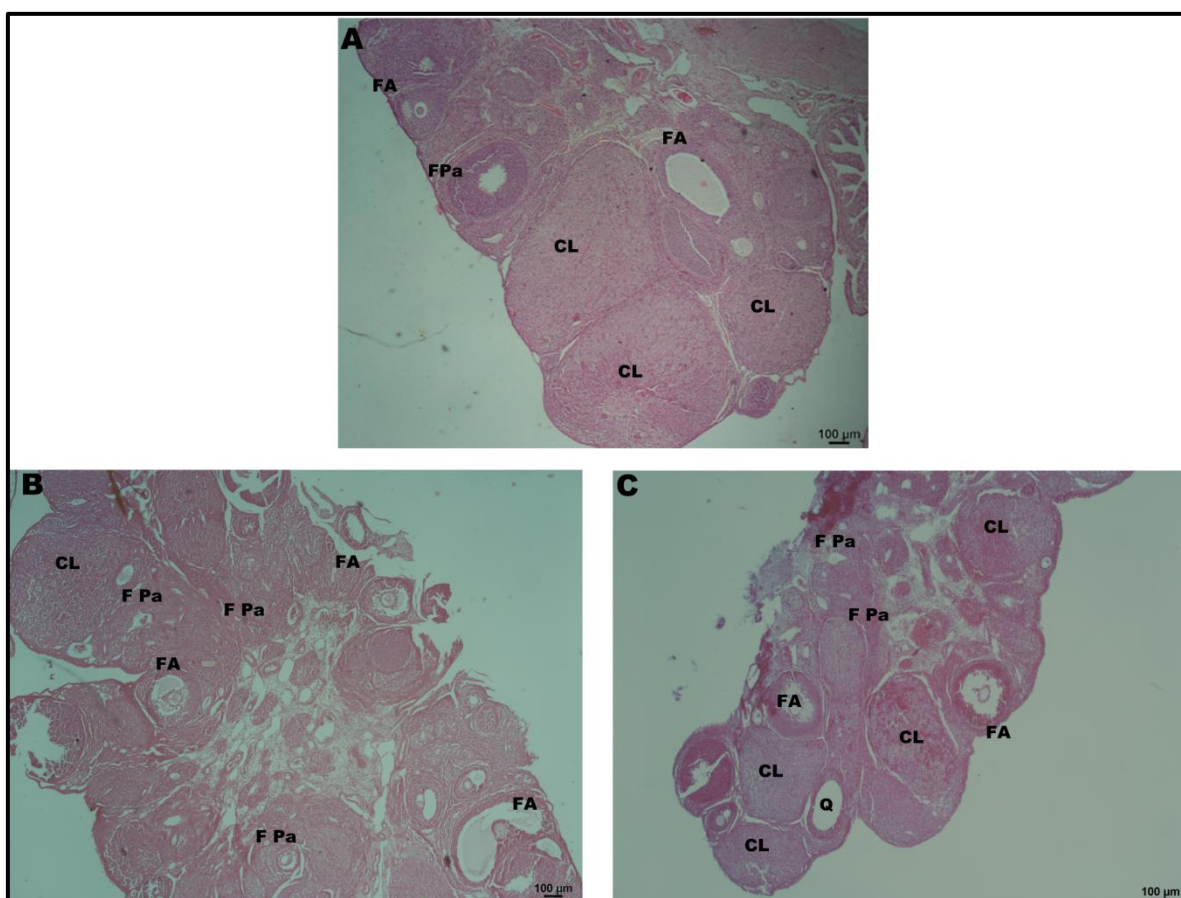


Figura 6.3: Cortes histológicos representativos de cada fenotipo con coloración de Hematoxilina eosina en animales de 90 días de edad. A) Grupo control (40X), B) Grupo HPiov (40X), C) Grupo HPanov (40X). Cuerpo Luteo (CL), Folículo antral (FA), quiste (Q) y folículos preantrales (F Pa).

Mediadores del tráfico de colesterol en el ovario

Debido a que nuestros resultados revelaron alteraciones en la síntesis de esteroides decidimos evaluar la regulación de la misma. La esteroidogénesis es un proceso dependiente de colesterol, por lo que nos propusimos analizar, primero, la dinámica del tráfico de colesterol ovárico.

Receptores de colesterol

El colesterol entra al ovario por medio de los receptores de LDL (LDL-R) y de HDL (SR-B1). Nuestros resultados revelan que los niveles de *Ldl-r* se encontraron incrementados en el fenotipo HPanov (Fig. 6.4, A); mientras que los niveles del receptor *Sr-b1* estaban disminuidos en el fenotipo HPiov (Fig. 6.4, B).

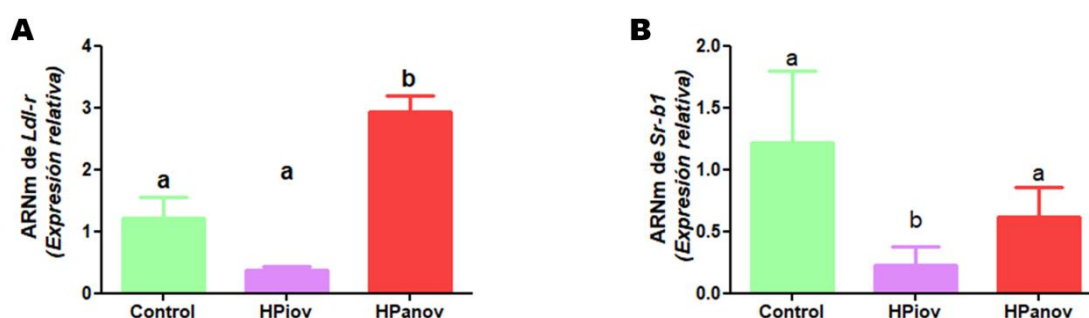


Figura 6.4: Abundancia relativa de ARNm de receptores de colesterol en el ovario. Expresión de A) *Ldl-r*, B) *Sr-b1*. Cada columna representa la media + D.E. de grupos Control e Hiperandrogenizado prenatalmente (HP) en 6 muestras por grupo; a vs b $P < 0,05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey.

Reguladores de la biodisponibilidad de colesterol

Una vez que el colesterol ingresa al ovario mediante sus receptores, la biodisponibilidad del mismo se encuentra regulada por ACAT1, la cual lleva a la formación de gotas lipídicas para el almacenamiento de colesterol. Por otro lado, HMGCR es otra enzima que regula la biodisponibilidad de colesterol, actuando como enzima limitante de su síntesis.

Nuestros resultados revelan que los niveles de *Acat1*, se encontraron incrementados en los grupos HP (Fig. 6.5, A). En cuanto a la síntesis *de novo* encontramos que los niveles de ARNm de *Hmgcr* estaban disminuidos en ambos fenotipos HP (Fig. 6.5, B).

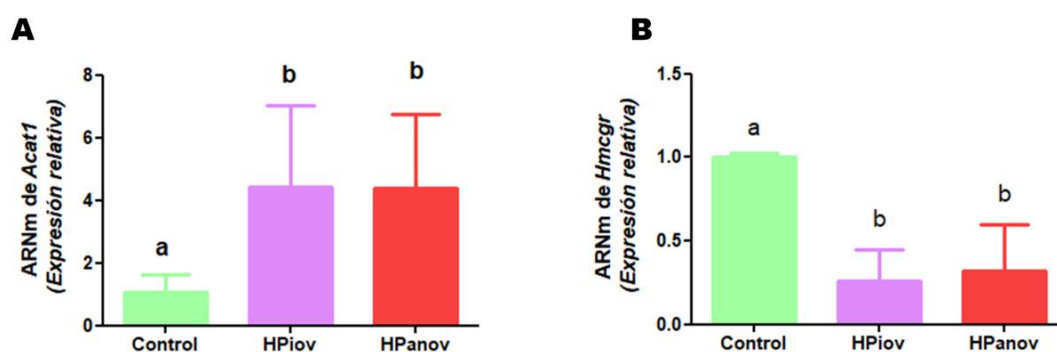


Figura 6.5: Abundancia relativa de ARNm de mediadores de la disponibilidad de colesterol en el ovario. Expresión de A) *Acat1*, B) *Hmgcr*. Cada columna representa la media + D.E. de grupos Control e Hiperandrogenizado prenatalmente (HP) en 6 muestras por grupo; a vs b $P < 0,05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey.

Lípidos intraováricos

Al evaluar los niveles de colesterol y de los ésteres de colesterol intraováricos encontramos que los niveles de colesterol (libre) no fueron afectados por el hiperandrogenismo prenatal (Fig. 6.6, A). Sin embargo, en cuanto a los ésteres de colesterol, encontramos que el fenotipo HPanov presentó altos niveles de éstos en relación al grupo control (Fig. 6.6, B), sugiriendo una acumulación lipídica intraovárica en este fenotipo.

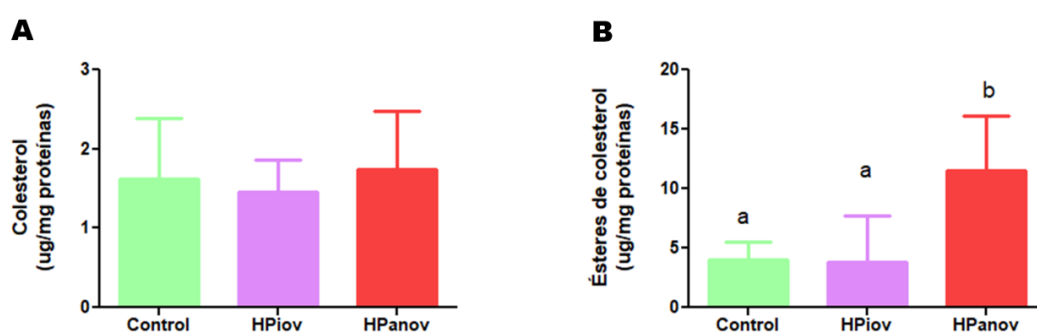


Figura 6.6: Concentraciones de A) colesterol y B) ésteres de colesterol en ovario de ratas de 90 días. Cada columna representa la media + D.E. de grupos Control e Hiperandrogenizado prenatalmente (HP) en 6 muestras por grupo; a vs b $P < 0,05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey.

Estos resultados en conjunto revelan un desbalance en la biodisponibilidad de colesterol en el grupo HP.

Esteroidogénesis ovárica

Debido a las alteraciones encontradas en los niveles circulantes de hormonas esteroides así como de los reguladores de la biodisponibilidad de colesterol en el ovario, se decidió evaluar la expresión a nivel ARNm de las enzimas esteroidogénicas.

Los niveles del ARN mensajero del transportador de colesterol, *StAR*, estaban incrementados sólo en el fenotipo HPiov (Fig. 6.7, A). Los niveles de ARNm de la enzima *3BHSD* no se encontraron alterados (Fig. 6.7,B). Los niveles de ARNm de *CYP17A1*, enzima limitante en la síntesis de andrógenos ováricos, se encontraron aumentados en el fenotipo HPanov (Fig. 6.7, C), mientras que los niveles de *17BHSD* se hallaron disminuidos en el fenotipo HPiov (Fig. 6.7, D). Los niveles de *CYP19A1* (aromatasa) fueron menores, sólo, en el fenotipo HPanov respecto del grupo control, permaneciendo inalterados en el fenotipo HPiov (Fig. 6.7, E).

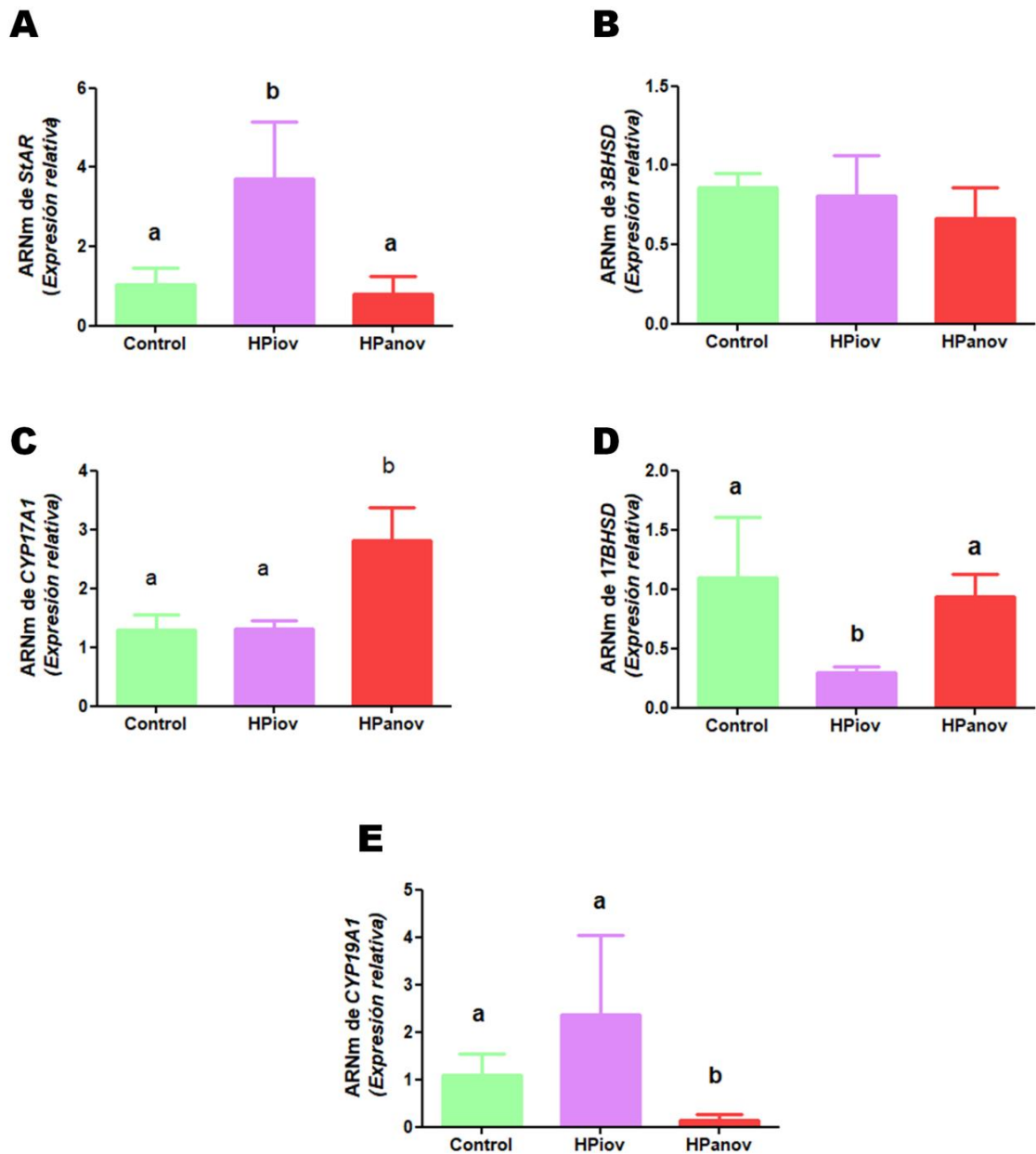


Figura 6.7: Abundancia relativa de ARNm de factores y enzimas involucrados en la esteroidogénesis relativos a L32. Expresión de A) *StAR*, B) *3BHSD*, C) *CYP17A1*, D) *17BHSD*, E) *CYP19A1*. Cada columna representa la media + D.E. de grupos Control e Hiperandrogenizado prenatalmente (HP) en 6 muestras por grupo; a vs b $P < 0,05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey.

Estos resultados revelan alteraciones en la esteroidogénesis ovárica de forma fenotipo-específica.

Discusión

Los efectos de la programación fetal pueden perdurar a lo largo de la vida (Padmanabhan et al., 2016). Las alteraciones producidas en edades pre y perinatales conllevan a cambios en la expresión de diferentes genes y alteraciones fisiológicas (Gluckman et al., 2005, 2008). Si bien existen mecanismos fisiológicos adaptativos que permiten afrontar y, en algunos casos, compensar, ciertos desbalances en la homeostasis metabólica y reproductiva, a largo plazo dichos mecanismos pueden fallar o saturarse llevando a fenotipos alterados y a diversas patologías. En el capítulo anterior observamos que el exceso de andrógenos prenatal conlleva a alteraciones en la morfología, en la esteroidogénesis, en la funcionalidad y en el balance energético ovárico durante el periodo de ingreso a la adultez (60 días). En este capítulo, nos propusimos evaluar si dichos efectos persisten hasta la vida adulta.

En etapa adulta encontramos que los niveles de las gonadotrofinas permanecieron inalterados, tal cual habíamos mostrado a los 60 días de edad.

En cuanto al balance de hormonas esteroides, encontramos un perfil alterado, pero de diferente forma respecto del encontrado a 60 días de edad. Con respecto a los niveles de testosterona circulante encontramos que sólo el fenotipo HPanov presentó altos niveles de la misma, mientras que a 60 días ambos fenotipos HP presentaban un incremento en los niveles de testosterona sérica. En cuanto a los niveles de estradiol encontramos que ambos fenotipos HP presentaron bajos niveles séricos. Asimismo, ambos fenotipos HP presentaron un desbalance en el índice estradiol/testosterona. Esto indica que si bien cambia el perfil hormonal entre 60 y 90 días, el desbalance hormonal permanece.

En el contexto de este desbalance hormonal encontramos que la morfología ovárica también permanece alterada en ambos grupos HP, presentando ambos, un exceso de folículos preantrales e inmaduros y la presencia de quistes. En los grupos HP encontramos cuerpos lúteos, tal cual habíamos hallado a 60 días, pero a 90 días, sin embargo, no se vieron alteraciones en los niveles de progesterona. Tal cual se comentó en el capítulo anterior, la presencia de cuerpos lúteos suele ser indicador de ovulación, sin embargo, las ratas clasificadas como anovulatorias permanecieron en diestro o metaestro, sin poder encontrar en los extendidos vaginales, que se tomaron a diario, señales del estadio estro. Estos resultados sugieren que se podrían formar cuerpos lúteos sin ovulación detectable al ciclar las ratas diariamente, por lo que que estos animales podrían tener ovulaciones de ciclos muy cortos, indetectables mediante la citología vaginal diaria. Lo que indicaría que sería necesario ciclar a los animales más de una vez al día o, que existiría formación de cuerpos lúteos sin un

acompañamiento de la citología vaginal. Asimismo, es de resaltar que en el período de 60 a 90 días, en las ratas clasificadas como anovulatorias, hemos detectado extendidos vaginales que presentaban tres tipos celulares diferentes en simultáneo (ver Fig. 3.3 en la sección III- Metodología) en los que se encontraron leucocitos, células nucleadas y algunas células cornificadas. Estos extendidos que fueron considerados como una transición de metaestro a diestro podrían, en realidad, estar indicando señales de pasajes por estros espontáneos y cortos, lo que se correspondería con la presencia de cuerpos lúteos en los cortes histológicos.

En concordancia con estos resultados, se ha demostrado que mujeres con SOP tienen tendencia a responder a los tratamientos de estimulación hormonal en forma anómala, presentando una luteinización prematura, dada por una alta y precoz respuesta a gonadotrofinas. Lo que conlleva a que pequeños folículos presenten la misma diferenciación y respuesta que folículos de mayor tamaño en pacientes con SOP (Willis et al., 1998). Hemos encontrado en ovario de ratas de 60 días de edad un aumento en los receptores de LH, lo que podría estar causando una alta respuesta a LH con una consecuente “luteinización prematura” como se ve en mujeres con SOP que, a pesar de eso, presentan anovulación. Este fenómeno de luteinización prematura ha sido relacionado con alteraciones en la esteroidogénesis (Willis et al., 1998). De acuerdo con esto, en el caso de los fenotipos HP, el fenotipo ovulatorio irregular presenta una esteroidogénesis incrementada que se puede ver reflejada en los niveles de StAR aumentados, mientras que en el fenotipo anovulatorio encontramos un aumento de la esteroidogénesis en cuanto a la síntesis de andrógenos.

La esteroidogénesis es un proceso dependiente de colesterol (Miller y Bose, 2011; Strauss, 2019). El tejido ovárico puede sintetizar colesterol *de novo*, en un proceso en el que interviene HMGCR, pero la demanda para la síntesis de esteroides es tan alta que la sola síntesis no alcanza, y este proceso depende también, y en gran parte, del colesterol que es capturado desde el plasma vía dos receptores: LDL-R y SR-B1 (Wang y Menon, 2005; Miller y Bose, 2011; Lai et al., 2013). Se ha demostrado que tanto HMGCR como los receptores lipídicos (LDL-R y SR-B1) pueden responder a los niveles de LH y de la gonadotrofina coriónica humana (hCG) (Wang y Menon, 2005; Chang et al., 2017). En roedores, se demostró que ambos receptores son importantes para el tráfico de colesterol en ovario (Chang et al., 2017). Ratones hembras *knock out* de *Sr-b1* presentan infertilidad y defectos en los oocitos (Miettinen et al., 2001) mientras que animales *knock out* para *Ldl-r* muestran una disminución en la síntesis de estradiol y progesterona así como alteraciones en la foliculogénesis y ciclo estral (Guo et al., 2015). En humanos también se ha demostrado que ambos receptores son importantes para la

obtención de colesterol para la esteroidogénesis, principalmente para la esteroidogénesis luteal (Azhar et al., 1998).

Nuestros resultados muestran una alteración en la expresión dichos receptores. El fenotipo HPiov presentó una disminución en los niveles de ARNm de *Sr-b1* sin alteraciones en el receptor *Ldl-r*, mientras que el fenotipo HPanov mostró un aumento en los niveles de *Ldl-r*, sin alteraciones en el receptor *Sr-b1*. Estos resultados sugieren que en ambos fenotipos HP, la vía de ingreso de colesterol al ovario se encuentra alterada respecto del grupo control de forma fenotipo-específica. En el fenotipo HPanov estaría facilitada por aumento de los receptores LDL-R, mientras que, en el fenotipo HPiov se encontraría disminuida por la baja expresión de los receptores de HDL.

En los grupos HP, encontramos un aumento de *Acat1*, lo que llevaría a alteraciones en el almacenamiento de colesterol, que en el fenotipo HPanov se vio reflejado en un incremento de ésteres de colesterol. Por otro lado, observamos una disminución de los niveles de ARNm de *Hmgcr*, lo que limitaría la síntesis *de novo* de colesterol en los animales HPanov.

A pesar de todas las alteraciones descriptas, no vimos afectados los niveles de colesterol libre en ninguno de los dos fenotipos HP. Estos resultados reflejan que, en el caso del fenotipo HPanov habría un exceso de colesterol que pasaría, vía ACAT1, a formar gotas lipídicas y que el colesterol biodisponible sería el suficiente para la esteroidogénesis, dado que no se observan alteraciones en los niveles de ARNm de *StAR* (proteína limitante en el proceso) en dicho fenotipo.

Por otro lado, en el caso del fenotipo HPiov, a pesar de la limitación en el ingreso y síntesis de colesterol, como ya mencionamos, tampoco se vieron alterados los niveles de colesterol libre ováricos. Más aún, encontramos un aumento en los niveles de ARNm de *StAR*, lo que sugiere una estimulación de la esteroidogénesis ovárica a partir del colesterol disponible. Es importante resaltar que se han encontrado mutaciones en el gen *Sr-b1* de células de la granulosa que afectan su expresión (disminuyéndola), las cuales se asocian a bajos niveles de estradiol (Strauss, 2019). De acuerdo con esto, nuestros resultados mostraron bajos niveles de *Sr-b1* y de estradiol circulante en el fenotipo HPiov. Esto reflejaría que alteraciones en este receptor lipídico tendrían una relación con las perturbaciones observadas en la esteroidogénesis ovárica.

Tomando en cuenta todos estos resultados, vemos que la hiperandrogenización prenatal altera la esteroidogénesis ovárica desde los primeros pasos, afectando la vía del colesterol intra ovárico. Estas alteraciones son fenotipo-específicas.

En cuanto al proceso esteroidogénico, en sí mismo, también encontramos alteraciones en el mismo afectando la síntesis de hormonas. Particularmente, en el fenotipo HPanov se vio un aumento de los niveles de *CYP17A1* y una disminución de los niveles de ARNm de aromatasa lo que se condice con un aumento de testosterona circulante, y una disminución de los niveles de estradiol. En el caso del fenotipo HPiov encontramos una alteración en la relación testosterona/estradiol, observándose un desbalance hormonal. Sin embargo, en este fenotipo dicho desbalance fue menor que en el grupo HPanov, siendo que sólo encontramos disminuidos los niveles de estradiol circulantes. En cuanto a la expresión de enzimas esteroidogénicas sólo observamos una alteración en los niveles de *17BHSD*, enzima que participa de la síntesis de andrógenos, particularmente de testosterona. Esta disminución en *17BHSD* podría estar previniendo la formación de testosterona en exceso, siendo que en circulación no detectamos un incremento de la misma respecto del grupo control. Sin embargo, debido a que los primeros pasos de la esteroidogénesis sí se encuentran aumentados, este fenotipo podría estar presentando altos niveles de otros andrógenos no medidos en este trabajo.

Es de destacar que si bien el desbalance hormonal encontrado a 60 días permanece, así como también la vía esteroidogénica sigue estando alterada, en la etapa adulta (90 días) se produjeron cambios en cuanto a dicha desregulación.

Teniendo en cuenta que a 90 días de edad también encontramos alteraciones en la esteroidogénesis, desde sus primeros pasos y en la morfología ovárica y perfil hormonal, el siguiente paso fue profundizar en el estudio del sistema de sensores energéticos PPAR γ y quemerina en el ovario.

Resumen visual del capítulo 3

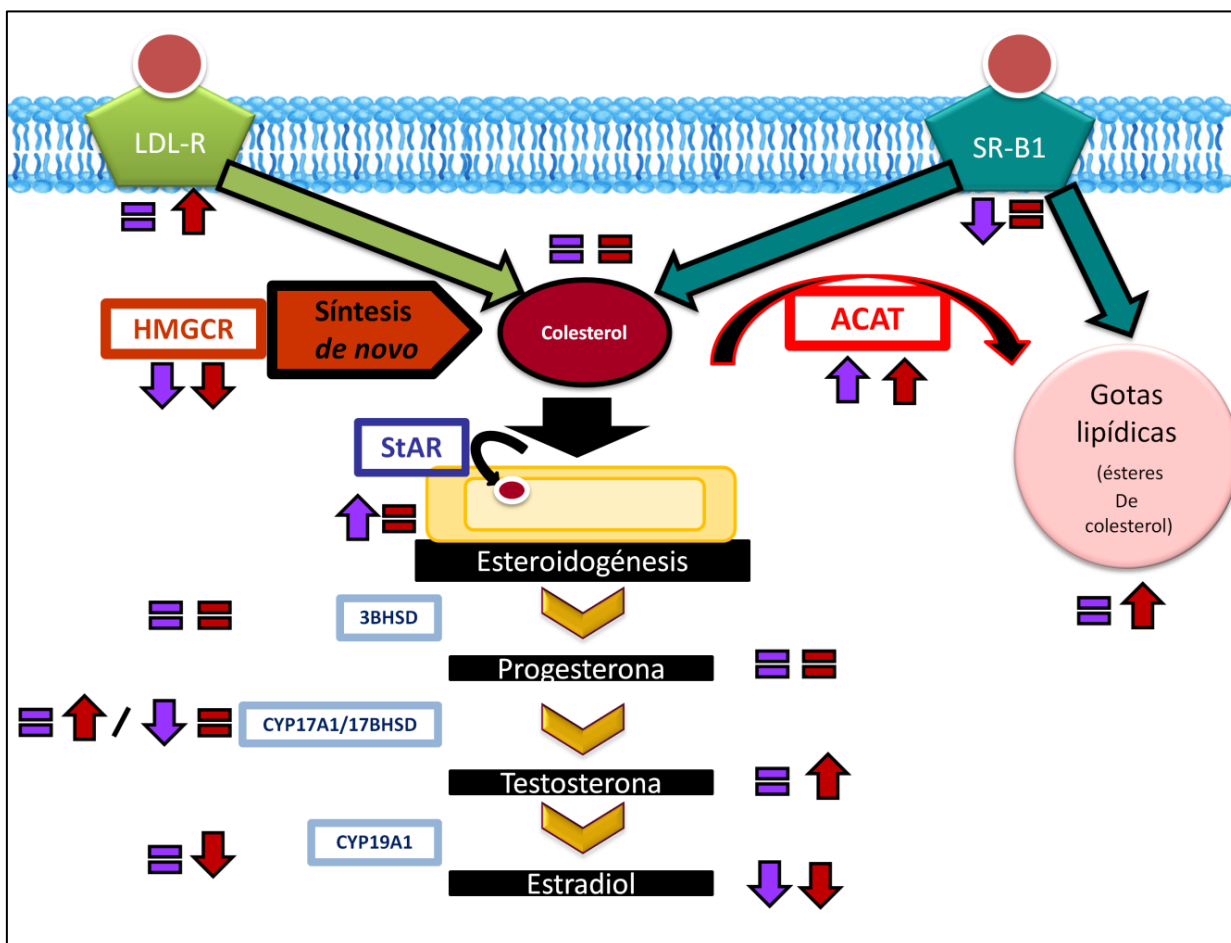


Figura 6.8: Alteraciones en la vía del colesterol y esteroidogénesis ovárica en animales de 90 días de edad. Flechas y signos igual indican la desregulación (en el caso de flechas) o no (signos iguales) respecto del grupo control en los fenotipos HPiov (violeta) y HPanov (rojo).

VII. Capítulo 4: Efectos de la hiperandrogenización prenatal sobre el sistema de sensores energéticos PPARg y quemerina en edad adulta.

Capítulo 4

Efectos de la hiperandrogenización prenatal sobre el sistema de sensores energéticos PPARg y quemerina en edad adulta

Debido a que la regulación de la funcionalidad ovárica, y en particular de la esteroidogénesis, depende de la biodisponibilidad de colesterol y del sistema energético local, en este capítulo nos propusimos evaluar el sistema energético-metabólico PPARg/quemerina en animales a 90 días de edad.

Resultados

Expresión de PPARg y su co-activador, PGC1a

Los niveles de ARNm y proteicos de PPARg se encuentran disminuidos en ambos fenotipos HP (Fig. 7.1, A y B, respectivamente). Asimismo los niveles de ARNm y proteína de PGC1a, co-activador de PPARg, se encontraron también disminuidos en el fenotipo HPiov, y con una tendencia a su disminución en el fenotipo HPanov (Fig. 7.1, C y D).

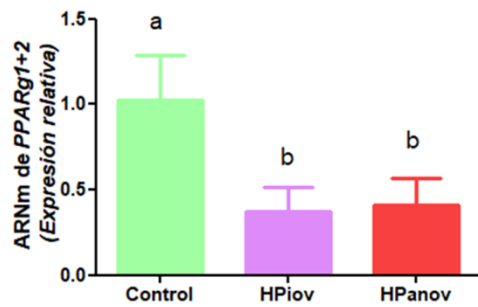
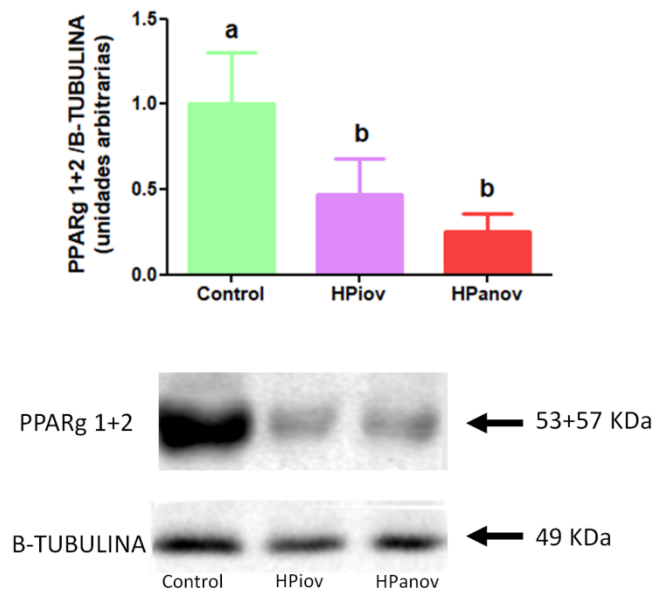
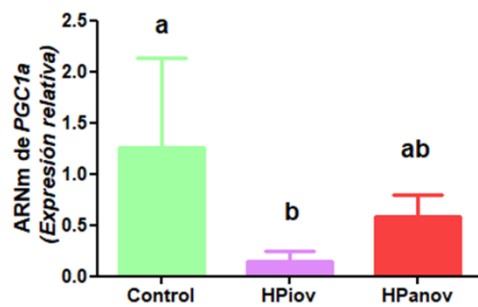
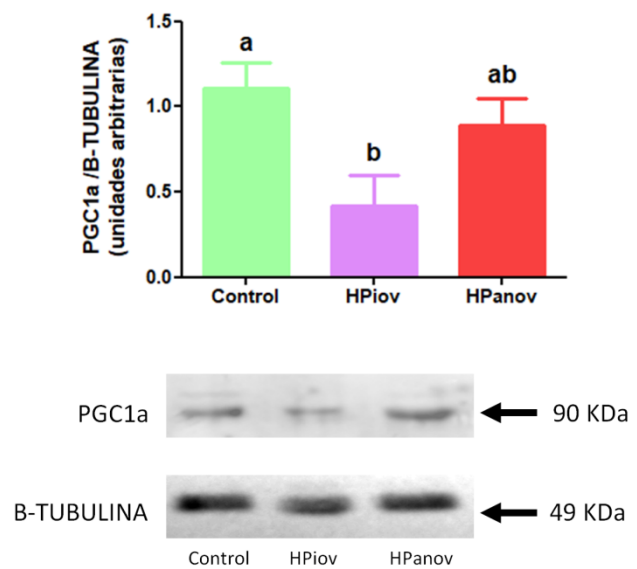
A**B****C****D**

Figura 7.1: Expresión de PPARγ y su co-activador PGC1α en el ovario. A) Expresión de ARNm de *PPARγ1+2*, B) Expresión proteica de *PPARγ1+2*, C) Expresión de ARNm de *PGC1α*, D) Expresión proteica de *PGC1α*. Cada columna representa la media + D.E. de grupos Control e Hiperandrogenizado prenatalmente (HP) en 6 muestras por grupo; a vs b $P < 0,05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey.

Formación del complejo PPARg/PGC1a

Al evaluar la formación de PPARg con su co-activador, los resultados de la co-inmuno precipitación demuestran que la asociación entre PPARg y PGC1a se encuentra disminuida en los fenotipos HP (Fig. 7.2), lo que refleja una reducción en la activación de PPARg por acción de la androgenización prenatal.

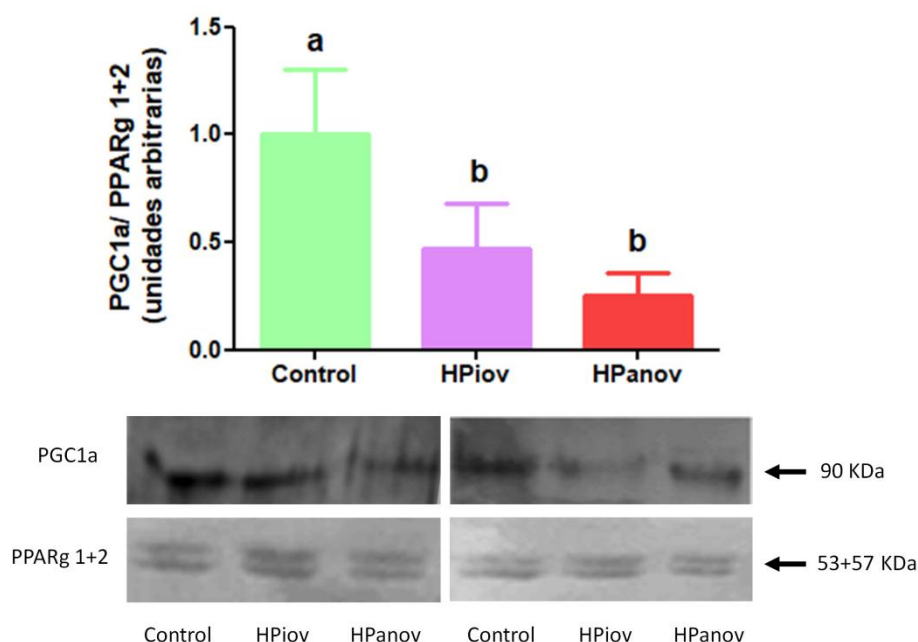


Figura 7.2: co-inmuno precipitación de PPARg1+2 con su co-activador, PGC1a en ovario. Cada columna representa la media + D.E. de grupos Control e Hiperandrogenizado prenatalmente (HP) en 5 muestras por grupo; a vs b $P < 0,05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey.

Expresión de Quemerina y su receptor, CMKLR1

Nuestros resultados a 60 días mostraron que la hiperandrogenización prenatal conlleva a alteraciones en las adipoquinas ováricas. En particular, en este capítulo nos interesó evaluar los niveles de quemerina, una nueva adipoquina cuyo rol en SOP es desconocido, de la cual se sabe que participa en la regulación de la foliculogénesis y esteroidogénesis ovárica y que presenta elementos de respuesta a PPARg en su promotor, pudiendo estar regulada por el mismo.

Nuestros resultados muestran que los niveles de ARNm de quemerina se encontraron disminuidos en ambos fenotipos HP (Fig 7.3, A). Mientras que no encontramos alteraciones en

los niveles proteicos de la misma. Asimismo encontramos que el principal receptor de quemerina, CMKLR1, también se presenta disminuido en los niveles de ARNm (Fig. 7.4).

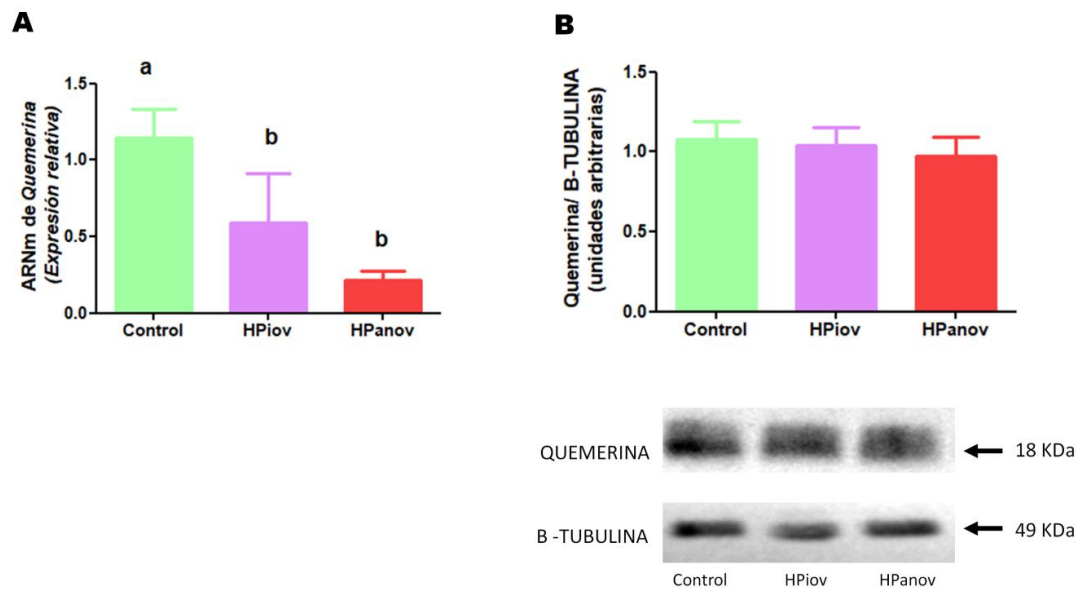


Figura 7.3: Expresión de ARNm y proteica de Quemerina. A) Expresión de ARNm de *Quemerina*, B) Expresión proteica de Quemerina. Cada columna representa la media + D.E. de grupos Control e Hiperandrogenizado prenatalmente (HP) en 6 muestras por grupo; a vs b $P < 0,05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey.

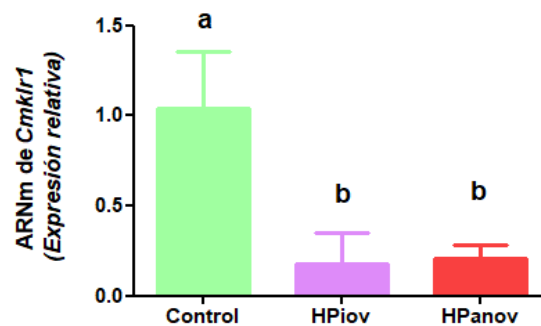


Figura 7.4: Expresión de ARNm de *Cmk1r1*. Cada columna representa la media + D.E. de grupos Control e Hiperandrogenizado prenatalmente (HP) en 6 muestras por grupo; a vs b $P < 0,05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey.

Discusión

En este capítulo nos propusimos profundizar en la regulación del sistema PPARg/quemerina en la adultez. El sistema PPARg es de gran interés en el estudio de SOP. Tradicionalmente se han utilizado ligandos sintéticos de este factor de transcripción como son las tiazoldinenionas (TZDs), por ejemplo: pioglitazona y rosiglitazona, en el tratamiento de pacientes con SOP obteniendo buenos resultados tanto en la regulación metabólica como en las funciones reproductivas (Koo et al., 2007; Minge et al., 2008b).

En este trabajo, encontramos que, en ratas de edad adulta el perfil de expresión de PPARg en el ovario es contrario al encontrado en la etapa de transición pubertad-adultez. Si bien a 60 días de edad se encontraba incrementada la expresión PPARg, en la edad adulta se encuentran reducidos no solo los niveles del factor de transcripción, sino también de su co-activador PGC1a, así como también se encuentra una menor interacción entre ambos, lo que implica una menor activación en el sistema PPARg, pudiendo llevar entonces a una incorrecta modulación de los genes dianas de este factor.

Previamente, en nuestro laboratorio hemos demostrado que en dosis mayores de hiperandrogenismo prenatal (2mg de testosterona, vs. 1mg usado en este trabajo) ya a 60 días de edad observábamos una inhibición en la transcripción de *Pparg* (Heber et al., 2013). Estos resultados concuerdan parcialmente con los de Ortega et al. (2010), donde estos autores muestran que los niveles de PPARg aumentan durante estadios tempranos pero luego, en la adultez (10 meses y 21 meses ovejas), no se ven alteraciones. Resaltando así que PPARg es uno de los mediadores tempranos de las alteraciones de programación del desarrollo asociadas a alteraciones foliculares y esteroidogénicas, y que su desregulación en sistemas androgénicos puede ser variable en el tiempo ; posiblemente estando influenciado por los cambios hormonales que ocurren a lo largo de la vida.

El efecto de los andrógenos sobre PPARg en el ovario también ha sido estudiado en nuestro laboratorio en otros modelos de hiperandrogenización. En un modelo de hiperandrogenización aguda de ratas pre púberes observamos que el tratamiento con andrógenos a corto plazo induce una inhibición de PPARg y su co-activador, PGC1a, afectando la esteroidogénesis, y que el tratamiento con pioglitazonas previene dichos efectos (Velez et al., 2015, 2018). Por otro lado, otros autores han encontrado que el tratamiento con DHT postnatal prolongado (por 90 días consecutivos desde el día 21 de vida hasta la adultez) lleva a un aumento de PPARg en ovario (Kim et al., 2013; Chen et al., 2015). Sin embargo, el tratamiento con DHEA prolongado (desde día 21 por 90 días consecutivos) no altera los

niveles de PPARg (Chen et al., 2015). Tomados en conjunto, estos resultados revelan que el sistema PPARg presenta una función importante en la foliculogénesis y esteroidogénesis ovárica y en SOP, y que son susceptibles de una modulación por andrógenos tanto a corto, como a largo plazo.

Debido al efecto del hiperandrogenismo prenatal sobre PPARg, los genes diana del mismo también pueden verse alterados. En concordancia con esto, en capítulos anteriores mostramos que las enzimas esteroidogénicas, blancos de PPARg en ovario, también se encuentran alteradas así como también algunas adipoquinas ováricas. Entre las adipoquinas estudiadas, quemerina ha sido propuesta como reguladora de la esteroidogénesis, la inflamación, la proliferación celular y de la angiogénesis (Reverchon et al., 2014b), procesos que se encuentran alterados en SOP (Sander et al., 2011; Scotti et al., 2014; Mikaeili et al., 2016; Cai et al., 2017; Artimani et al., 2018). Teniendo en cuenta la implicancia de quemerina en dichos procesos, y debido a que se conoce muy poco sobre su regulación en ovario y en contextos androgénicos, es que decidimos profundizar en su estudio en este trabajo.

Nuestros resultados revelan que si bien los niveles de ARNm de quemerina se encuentran disminuidos, los niveles proteicos de la misma permanecen inalterados en los grupos HP respecto del grupo control. Esta diferencia entre los niveles ováricos de ARNm y proteína pueden deberse a alteraciones en los mecanismos de secreción y exocitosis de quemerina en los grupos HP. Se sabe que las adipoquinas, como quemerina, se secretan mediante vesículas reguladas de diversas formas (Xie et al., 2006, 2008; Ye et al., 2010), sin embargo, el mecanismo de secreción de quemerina se desconoce. En el capítulo 2 de este trabajo de tesis hemos demostrado este efecto sobre leptina, otra de las adipoquinas estudiada, sobre la cual observamos que la hiperandrogenización prenatal generaba el mismo patrón de expresión, encontrándose alterados los niveles de expresión del ARNm pero no los proteicos. Por lo que, la posible desregulación de la secreción de quemerina (y también de leptina) podrían deberse a alteraciones mediadas por el hiperandrogenismo prenatal, que afectaría a diversas adipoquinas ováricas y su señalización.

Por otro lado, quemerina ejerce su acción en el ovario principalmente mediante su receptor CMKLR1 (Kim et al., 2013; Reverchon et al., 2014a; Tang et al., 2016). En este trabajo también encontramos que el mismo se halla disminuido a nivel ARNm, lo que refleja una posible alteración en la vía de señalización ovárica de quemerina mediada por el mismo. La estimulación de quemerina vía CMKLR1 es capaz de estimular la vía de fosforilación de AKT y ERK e inhibir la esteroidogénesis (Reverchon et al., 2012, 2014b). En un modelo de *knock out* de *Cmk1r1* se observó que los efectos que induce el tratamiento con DHT se hayan atenuados.

Esto revela que una inhibición en la señalización de la vía de quemerina ovárica podría afectar más levemente la esteroidogénesis en contextos androgénicos. Sin embargo, otros estudios han demostrado que un déficit de CMKLR1 en otros tejidos, como en tejido adiposo y en músculo esquelético, también conllevan a alteraciones en la vía de la glucosa e insulina (Ernst et al., 2012). En relación a estos hallazgos, resultados recientes de nuestro laboratorio demuestran que a 90 días de edad la fosforilación sobre AKT no se encuentra alterada por efectos del hiperandrogenismo prenatal. Sin embargo, sí lo está la vía de insulina y glucosa intraovárica (Heber et al., 2019). Por lo que, teniendo en cuenta todos estos resultados, las alteraciones sobre quemerina y su señalización, en el ovario de ratas hiperandrogenizadas prenatalmente podrían deberse no solo a un efecto androgénico, sino también al efecto de los cambios sobre la vía de insulina y glucosa ovárica dadas por el hiperandrogenismo, ya que se ha demostrado que quemerina regula el metabolismo de glucosa (Helfer y Wu, 2018) y que, en células de la granulosa de bovinos, los niveles de quemerina son susceptibles al estímulo por insulina (Reverchon et al., 2014a).

Los resultados en cuanto a quemerina y su receptor son contrarios a los encontrados por otros autores en un modelo de androgenización crónica post natal con DHT (Wang et al., 2012b; Kim et al., 2013) y en otro modelo de tratamiento post natal con valerato de estradiol (que también induce características de tipo SOP (Kabiri et al., 2014)). En cuanto a estos resultados, es importante resaltar que todos estos animales, tratados postnatalmente, presentaron sobrepeso, lo cual no ocurre en nuestro modelo. Por lo que, tal cual sugieren Kabiri y colaboradores (2014), la relación positiva entre los niveles incrementados de expresión de quemerina y el aumento del peso corporal puede deberse al aumento de mediadores inflamatorios secretados por el tejido adiposo circundante que promueven la transcripción ovárica de quemerina. Lo cual no se daría en nuestro modelo. Asimismo, Kim y colaboradores (2013) ha demostrado que DHT, en un mecanismo mediado por altos niveles de quemerina ovárica, inhibiría la proliferación de células de la granulosa, y promovería la de las células de la teca en un mecanismo mediado por alteraciones en la fosforilación de AKT (aumentando la fosforilación en las células de la teca y disminuyendo en granulosa). Sin embargo, y en relación a estos resultados, como ya hemos mencionado, los niveles ováricos de fosforilación de AKT no se ven alterados en edad adulta por el hiperandrogenismo prenatal en nuestro modelo (Heber et al., 2019).

Es importante resaltar que estos modelos, de androgenización post natal, estudian animales en la vida adulta por lo que, los consideramos adecuados para comparar con nuestros resultados de ratas adultas. Al comparar nuestros resultados con dichos modelos,

además de las alteraciones respecto de quemerina, hemos encontrado otras diferencias en cuanto a la esteroidogénesis ovárica. Por ejemplo, en el modelo de DHT tanto StAR como Aromatasa se encuentran disminuidas (Wang et al., 2012b; Tang et al., 2016); mientras que, en nuestro modelo de hiperandrogenización prenatal encontramos que los niveles de aromatasa se encuentran disminuidos en el fenotipo HPanov mientras que los niveles de StAR se encuentran incrementados en el fenotipo HPiov en edad adulta. En congruencia con nuestros resultados, modelos de hiperandrogenismo prenatal en ovejas (tanto con testosterona como con DHT) revelaron que los niveles ováricos de StAR se encuentran incrementados en dichos animales y los niveles de CYP19 disminuidos en etapas adultas postnatales (Padmanabhan et al., 2014). Estos resultados también coinciden con los encontrados en ovarios y células foliculares de pacientes con SOP, en los que se presenta un incremento en la expresión de StAR y una disminución de CYP19A1 (Kahsar-Miller et al., 2001; Sander et al., 2011). Las diferencias encontradas entre los modelos pre y postnatales pueden deberse a que los tratamientos están apuntando a diferentes estadios de la vida. Los modelos prenatales actúan en los momentos cuando la diferenciación ovárica está ocurriendo e inducen efectos en la organización del tejido, mientras que los modelos de intervención en la vida prepuberal o puberal afectan al tejido regulando su actividad y la activación de los factores que modulan al mismo, y muchas veces los efectos desaparecen cuando cesa el tratamiento (Padmanabhan et al., 2014).

Teniendo en cuenta la evidencia hasta el momento, podemos concluir que los andrógenos afectan al sistema PPARg/quemerina y modulan la esteroidogénesis ovárica. Los andrógenos postnatales promueven un aumento de PPARg (Chen et al., 2015) y de los niveles ováricos de quemerina (Wang et al., 2012b; Kim et al., 2013) junto con una disminución en la esteroidogénesis ovárica. Mientras que, el hiperandrogenismo prenatal conlleva, como mostramos en este trabajo, en edad adulta, a una inhibición del sistema PPARg y una disminución de la vía de señalización de quemerina ovárica con alteraciones en la esteroidogénesis. Estos resultados tomados en conjunto revelan que existiría una regulación de PPARg sobre quemerina en el ovario, y que conjuntamente afectan a la esteroidogénesis.

Resumen visual del capítulo 4

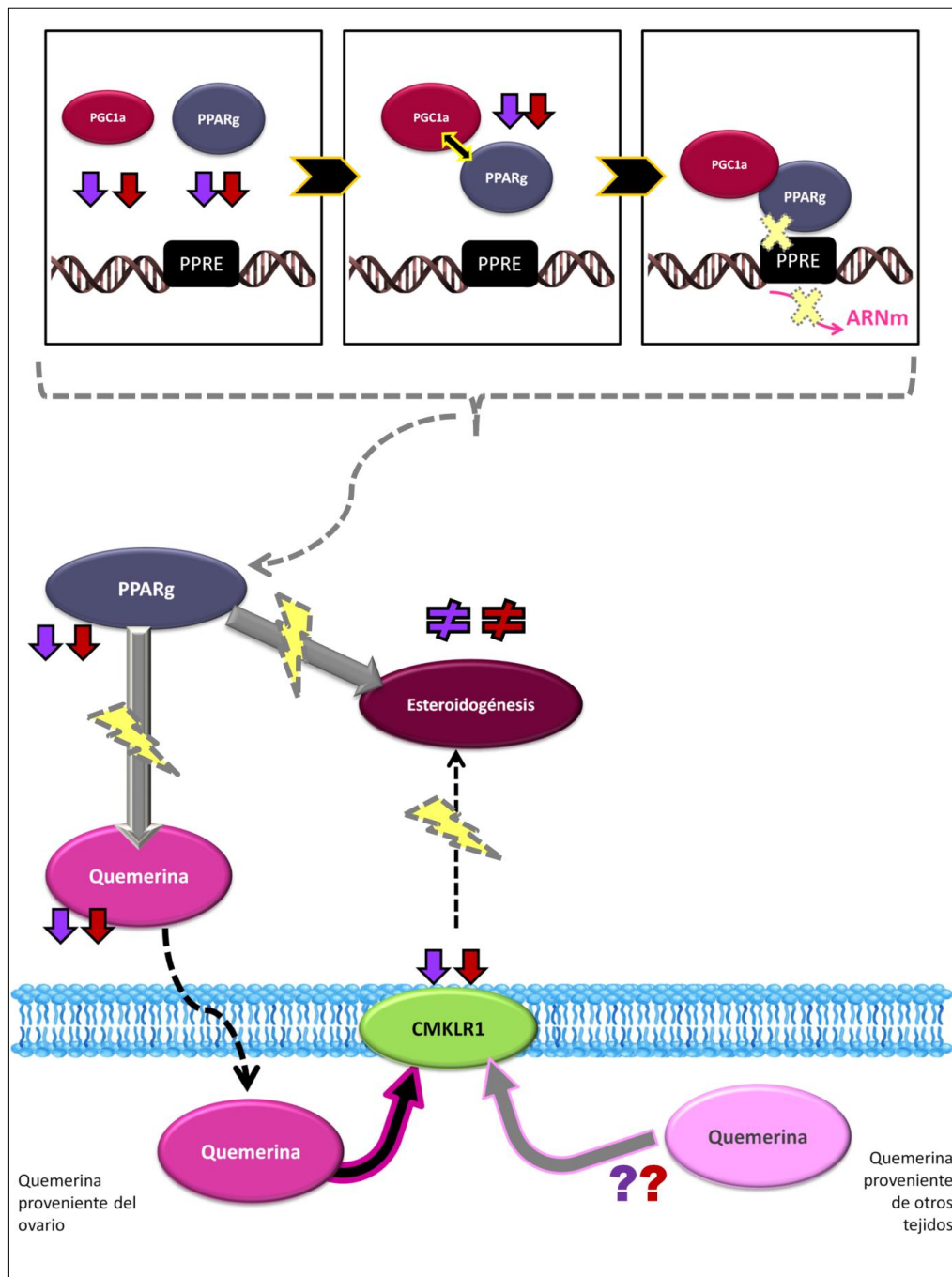


Figura 7.5: Alteraciones en el sistema PPARg/quemerina y su influencia sobre la esteroidogénesis ovárica. Flechas, signos de desigualdad y signos igual indican la desregulación (en el caso de flechas y signos de desigualdad) o no (signos iguales) respecto del grupo control en los fenotipos HPiov (violeta) y HPanov (rojo). Los rayos indican alteración en la vía indicada. Los signos de interrogación indican que dicha vía no fue estudiada.

VIII. Capítulo 5: Alteraciones metabólicas y quemerina como biomarcador en una población local de mujeres con SOP.

Capítulo 5

Alteraciones metabólicas y quemerina como biomarcador en una población local de mujeres con SOP

Teniendo en cuenta la multifactorialidad de SOP y que poco se sabe sobre el síndrome en poblaciones latinoamericanas nos propusimos caracterizar una población local de pacientes con SOP. Asimismo, tomando en consideración el rol de quemerina sobre el metabolismo y la reproducción y su posible rol en la patogenia de SOP, evaluamos a quemerina como potencial biomarcador asociado al síndrome en nuestra población.

Resultados

Caracterización metabólica de una población local de SOP y determinación de LAP y VAI como posibles marcadores de RCV

La clasificación de las pacientes con SOP se basó en el criterio Rotterdam (2003). Existe una controversia en torno al cuarto fenotipo establecido sólo por el criterio diagnóstico de Rotterdam y no contemplado por los criterios diagnósticos de NIH (1990) y ASRM (2006). En particular, se conoce muy poco sobre SOP en poblaciones latinoamericanas. Decidimos entonces, agrupar a las pacientes con SOP según presenten cualquiera de los tres fenotipos hiperandrogénicos contemplados por los tres criterios (fenotipos hiperandrogénicos, HA), o en el fenotipo normoandrogénico (NHA), sólo contemplado por el criterio de Rotterdam (2003). En primer lugar realizamos una caracterización de la población SOP en cuanto a los parámetros metabólicos, cuyos valores se volcaron en la tabla 8.1.

	Control (n=88)	NHA-SOP (n=17)	HA-SOP (n=93)	<i>p</i>	**<i>p</i> ctl vs NHA	**<i>p</i> ctl vs HA	**<i>p</i> NHA vs HA
Edad	27,81±5,1	26,11 ± 5,38	26,23 ± 5,38	0,1205	--	--	--
IMC	21,5±1,89 ^a	28,77± 6,41 ^b	29,09± 7,56 ^b	<0,001	--	--	--
Circunferencia Cintura	71,35±6,46 ^a	92,31±14,82 ^b	91,47±18,74 ^b	<0,001	0,05	0,125	0,326
Presión sistólica*	110(110-120)	110(100-120)	110(100-120)	0,98	0,008	0,009	0,760
Presión diastólica*	70(70-80)	70(70-80)	70(70-80)	0,98	0,016	0,017	0,760
Perfil lipídico							
CT	160,71±29,14 ^a	180,78±33,73 ^b	193,49±40,57 ^b	<0,001	0,018	<0,01	0,316
HDL	55,32±12,75 ^a	53,04±14,15 ^{ab}	48,82 ± 13,02 ^b	0,01	0,231	0,547	0,425
LDL	91,12 ± 22,5 ^a	111,81±28,11 ^b	117,3 ± 32,78 ^b	<0,001	0,024	0,001	0,898
TG	67,34±28,52 ^a	98,38 ± 39,73 ^b	124,33±87,64 ^b	0,04	0,115	0,003	0,595
Metabolismo de glucosa e insulina							
Glucosa	80,04± 6,72 ^a	86,72 ± 7,62 ^b	88,43 ± 9,38 ^b	<0,001	0,93	0,150	0,167
Insulina	7,49 ± 3,61 ^a	12,58± 7,97 ^b	16,02± 10,14 ^b	<0,001	0,372	0,941	0,967
Glucosa/Insulina	14,14 ± 8,84 ^a	8,04 ± 2,54 ^b	10,85 ± 8,36 ^b	0,002	0,451	0,180	0,180
Quicki	0,37 ± 0,03 ^a	0,33 ± 0,02 ^b	0,34 ± 0,04 ^b	<0,001	0,183	0,312	0,312
HOMA-IR	1,48 ± 0,73 ^a	2,83 ± 1,83 ^b	2,84 ± 1,88 ^b	<0,001	0,383	0,315	0,967
Riesgo Cardiovascular							
CT/HDL	2,98 ± 0,56 ^a	3,64 ± 0,96 ^a	4,19 ± 1,43 ^b	<0,001	0,671	0,029	0,239
TG/HDL	1,26 ± 0,55 ^a	2,11 ± 1,02 ^b	3,04 ± 3,02 ^b	0,005	0,557	0,121	0,588
LAP	8,96 (6,57-11,86) ^a	36,34 (19,32-53,40) ^b	41,85 (15,82-71,70) ^b	0,002	0,014	0,001	0,915
VAI [¥]	1,49 ± 0,69 ^a	4,06 ± 2,14 ^b	5,96 ± 6,00 ^b	<0,001	0,001	<0,001	0,731

Tabla 8.1: Características de mujeres controles y SOP divididas según fenotipos. Valores expresados como media ± D,E, (ANOVA y test post-hoc con corrección de Tukey-Kramer o Dunnett-T3 dependiendo si se presenta homogeneidad de la varianza o no, respectivamente), *Mediana y rango intercuartil 25-75 (Kruskal-Wallis test). Letras diferentes implican diferencias significativas estadísticamente entre los grupos analizados en análisis univariado, ** p-valor ajustado por edad e IMC (regresión lineal múltiple o GLM) para controles vs, fenotipos de SOP o entre fenotipos SOP. El marcador VAI solo se ajustó por edad para evitar la colinealidad con el IMC, ya que el mismo forma parte de los términos del cálculo del marcador. p<0,05 se consideró como estadísticamente significativo.

La tabla 8.1 muestra que ambos fenotipos SOP (NHA y HA) presentan altos valores de IMC, CC, CT, LDL y TG respecto del grupo de pacientes control. Los niveles de colesterol HDL se encontraron disminuidos sólo en el grupo de pacientes con SOP con fenotipo HA, respecto del grupo control.

En cuanto a los parámetros asociados con el metabolismo de glucosa e insulina, el grupo SOP presentó diferencias significativas respecto de las pacientes control. Encontramos que los valores de glucosa e insulina se hallaron incrementados en las mismas, mostrando una alteración en estas vías metabólicas. Aún más, los índices de insulino sensibilidad (GLC/INS y QUICKI) y el índice de insulino resistencia, HOMA-IR, se encontraron alterados en las pacientes con SOP, respecto del grupo control, mostrando un desbalance en estas pacientes de la homeostasis de la insulina.

Al realizar un análisis multivariado, ajustando por edad e IMC, encontramos que respecto del grupo control las pacientes con SOP presentaron alta presión arterial, y alteraciones en los niveles de CT y colesterol LDL. En cuanto a los niveles de colesterol HDL, no se encontraron diferencias significativas entre las pacientes con SOP y las controles. Asimismo, el análisis multivariado reveló que los niveles de TG solo se encontraron alterados entre el fenotipo HA-SOP y el grupo control. Respecto de los parámetros asociados al metabolismo de glucosa e insulina, no encontramos diferencias significativas entre los grupos analizados mediante el análisis multivariado.

En cuanto al riesgo cardiovascular, evaluamos 4 parámetros. Dos de ellos: CT/HDL y TG/HDL, los cuales son marcadores de RCV tradicionales, ampliamente utilizados en la clínica. Otros dos: LAP y VAI, son marcadores de RCV nuevos. Los 4 parámetros evaluados se encontraron incrementados en las pacientes con SOP respecto de las pacientes control. Particularmente, los índices TG/HDL, LAP y VAI se encontraron incrementados independientemente del fenotipo SOP. Al realizar un análisis multivariado, ajustando por edad e IMC, estas diferencias persistieron, salvo en cuanto al marcador TG/HDL, para el cual no se encontraron diferencias significativas entre los grupos estudiados. Respecto del marcador CT/HDL, sólo se encontraron diferencias significativas entre el fenotipo SOP-HA y el grupo control, tanto en el análisis univariado como en el multivariado.

Para evaluar las potenciales diferencias en riesgo metabólico entre ambos fenotipos SOP, analizamos la presencia de los distintos componentes del síndrome metabólico según el criterio ATP III. Nuestro análisis reveló que no existen diferencias significativas entre los fenotipos HA y NHA en las pacientes con SOP argentinas para la presencia de bajo colesterol

HDL, altos niveles de TG, altos valores de glucemia, alta circunferencia de cintura y alta presión arterial (Tabla 8.2).

	NHA-SOP	HA-SOP	<i>p</i>
IMC>25	70,00%	60,95%	0,44
SM (%)	23,78%	28,68%	0,72
HDL<50 mg/dl	52,94%	61,64%	0,51
TG≥150 mg/dl	16,67%	23,68%	0,52
GLC≥110 mg/dl	15,00%	6,00%	0,16
CC>88 cm	66,67%	58,23%	0,50
PAS≥85 mm Hg	11,76%	19,35%	0,47
PAD≥130 mm Hg	5,88%	11,29%	0,51

Tabla 8.2: Síndrome metabólico: parámetros de acuerdo a ATP III. Comparaciones entre fenotipos SOP. Comparaciones entre fenotipos SOP de la prevalencia de características del síndrome metabólico, Test chi-cuadrado, $p < 0,05$ fue considerado como significativo estadísticamente.

Con el objetivo de evaluar a LAP y VAI como marcadores de alteraciones metabólicas en nuestra población local, estudiamos su correlación con marcadores conocidos de síndrome metabólico, de riesgo cardiovascular y de homeostasis de glucosa e insulina (Tabla 8.3).

		LAP				VAI			
		Coeficiente no ajustado		Coeficiente ajustado por edad e IMC		Coeficiente no ajustado		Coeficiente ajustado por edad	
		<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>R</i>	<i>P</i>
Parámetros ATP III asociados con SM	Circunferencia de Cintura	0,917	<0,001	0,320	<0,001	0,736	<0,001	0,560	<0,001
	Presión Sistólica	--	0,387	--	0,082	--	0,880	--	0,080
	Presión Diastólica	---	0,643	--	0,99	---	0,845	--	0,91
	HDL	-0,478	<0,001	-0,210	0,008	-0,617	<0,001	-0,520	<0,001
	TG	0,799	<0,001	0,860	<0,001	0,905	<0,001	0,940	<0,001
	Glucosa	0,354	<0,001	--	0,34	0,389	<0,001	0,260	<0,001
Marcadores de RCV y disfuncionalidad adiposa	CT/HDL	0,663	<0,001	0,380	<0,001	0,778	<0,001	0,710	<0,001
	TG/HDL	0,828	<0,001	0,820	<0,001	0,958	<0,001	0,940	<0,001
	LAP	--	--	--	--	0,892	<0,001	0,890	<0,001
Marcadores del metabolismo de insulina y glucosa	Glucosa/Insulina	-0,525	<0,001	-0,260	0,001	-0,458	<0,001	-0,290	<0,001
	Quicki	-0,626	<0,001	-0,200	0,010	-0,580	<0,001	-0,460	<0,001
	HOMA-IR	0,626	<0,001	0,220	0,006	0,579	<0,001	0,420	<0,001

Tabla 8.3: Correlación entre LAP y VAI y características del Síndrome metabólico, y marcadores de IR y RCV. LAP y VAI como marcadores asociados a riesgo cardiovascular e índices de homeostasis de glucosa e insulina, Coeficiente de correlación de Spearman (*r*) y *p* valor para modelos ajustados y no ajustados, $p < 0,05$ fue considerado como significativo estadísticamente.

LAP y VAI, mostraron en ambos grupos SOP y control, una correlación positiva con los parámetros de ATPIII para síndrome metabólico: CC, TG y niveles de glucosa. Asimismo presentaron una correlación negativa con el colesterol HDL. En cuanto a los marcadores tradicionales de RCV (CT/HDL y TG/HDL) presentaron una correlación positiva. Asimismo, al evaluar la correlación de LAP y VAI con diversos marcadores de homeostasis de insulina, encontramos que ambos presentaron una correlación negativa con los índices de insulino sensibilidad GLC/INS y QUICKI y una correlación positiva con el índice de insulino resistencia, HOMA-IR.

En el análisis multivariado, dichas correlaciones se mantuvieron para el caso de VAI. Mientras que para el caso de LAP se encontró que el mismo correlacionaba con los mismos parámetros con los que se había presentado asociación significativa en el análisis univariado, exceptuando a los niveles de glucosa.

Asimismo, LAP y VAI presentaron correlación entre ellos, tanto en el análisis univariado como en el multivariado.

Estos resultados en conjunto, muestran que tanto LAP como VAI podrían ser buenos marcadores de riesgo metabólico en población Argentina. Por ello, decidimos establecer un valor de corte para LAP y VAI en nuestra población local tomando como referencia el valor de corte de HOMA-IR establecido por Graffigna y colaboradores (2005) para Argentina.

El análisis mediante curva ROC (Fig. 8.1) reveló que el mejor valor de corte para LAP y VAI para la presencia de IR fue de 18,24 (sensibilidad: 81,43% especificidad: 73,49 %) y de 2,19 (sensibilidad: 81,16% especificidad: 72,15%), respectivamente. La comparación entre las curvas ($LAP_{AUC}: 0,84 \pm 0,03$; $VAI_{AUC}: 0,82 \pm 0,04$; $p > 0,05$) no mostraron diferencias significativas. Por lo que, ambos marcadores con sus respectivos valores de corte, son buenos indicadores de IR.

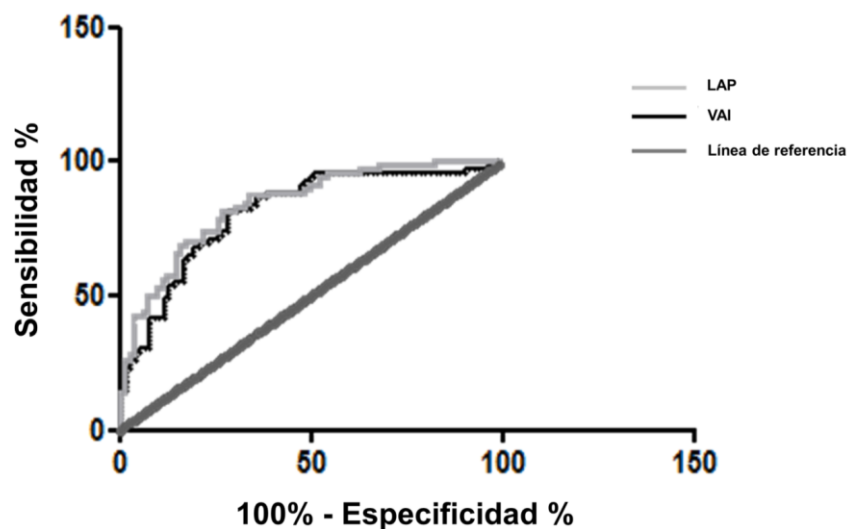


Figura 8. 1: Análisis de curva ROC para LAP y VAI tomando como referencia de IR el HOMA-IR con un valor de corte $> 2,3$.

Los valores predictivos de IR y RCV de acuerdo al índice HOMA-IR en pacientes con SOP mostró que los valores predictivos positivos y negativos fueron: VPP: 75% y VPN: 77,27% para el caso de $LAP > 18,24$, ($p < 0,01$) y VPP: 74,65% y VPN: 72,22% para el caso de $VAI > 2,19$, ($p < 0,01$).

Comparamos estos valores con los encontrados para los marcadores de RCV tradicionales. Para el caso del índice $TC/HDL > 3,25$ los VP fueron: VPP: 73,24% VPN: 65,22%, ($p < 0,01$) y para el caso de $TG/HDL > 2,5$, VPP: 77,50% y VPN: 47,7%, ($p < 0,05$).

Estos resultados revelan que LAP y VAI con sus respectivos valores de corte establecidos serían marcadores más precisos de RCV asociado a IR en población SOP que los parámetros de RCV tradicionales.

Quemerina como marcador de riesgo metabólico

Debido a que quemerina ha sido sugerida como un nuevo marcador de riesgo metabólico, evaluamos los niveles séricos de dicha adipoquina en la población local de pacientes con SOP teniendo en cuenta la presencia de hiperandrogenismo y comparando con población control.

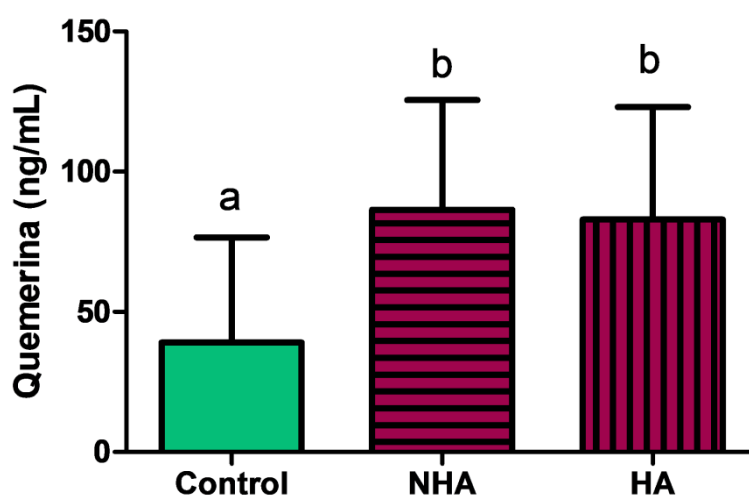


Figura 8.2: valores de quemerina en suero. Cada barra corresponde a la media + D.E. a vs. b, $p < 0,05$ por ANOVA con test post-hoc Tukey.

El análisis univariado reveló que los niveles de quemerina se hallan alterados en ambos fenotipos SOP, independientemente de la presencia de hiperandrogenismo (Fig. 8.2). Al hacer un análisis multivariado ajustando por IMC y edad, se observó el mismo resultado. Se encontraron diferencias significativas para los valores de quemerina entre el grupo Control y NHA ($p=0,023$) y el grupo Control y HA ($p<0,001$) pero no se encontraron diferencias entre los fenotipos SOP NHA y HA ($p=0,643$).

A continuación, realizamos un análisis de correlación entre quemerina y distintos marcadores conocidos de riesgo metabólico. El análisis de correlación univariado reveló que quemerina correlaciona positivamente con la circunferencia de cintura, los niveles de triglicéridos, la glucemia, el índice TG/HDL, el índice LAP y el índice HOMA-IR y asimismo correlaciona negativamente con el índice Quicki. El análisis ajustado por edad e IMC reveló que quemerina correlaciona positivamente con la circunferencia de cintura, la glucemia y el índice LAP. Estos resultados revelan entonces, que quemerina presenta una correlación con marcadores de alteraciones metabólicas (Tabla 8.4).

		Quemerina			
		Coeficiente no ajustado		Coeficiente ajustado por edad e IMC	
		<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Parámetros ATPIII asociados a SM	Circunferencia de cintura	0.241	0.033	0.343	0.006
	Presión sistólica	--	0.671	--	0.95
	Presión diastólica	--	0.188	--	0.258
	HDL	--	0.904	--	
	TG	0.24	0.043	<i>0.25</i>	<i>0.065</i>
	Glucosa	0.25	0.0272	0.55	0.001
Marcadores de RCV y disfuncionalidad adiposa	TC/HDL	--	0.5324	--	0.461
	TG/HDL	0.26	0.034	--	0.65
	LAP	0.34	0.008	0.517	0.001
	VAI	--	0.119	--	0.545
Marcadores del metabolismo de insulina y glucosa	Glucosa/Insulina	--	0.334	--	0.313
	Quicki	-0.28	0.0140	<i>-0.29</i>	<i>0.083</i>
	HOMA-IR	0.28	0.0136	<i>0.29</i>	<i>0.076</i>

Tabla 8.4: Correlación entre quemerina y características del síndrome metabólico , y marcadores de RCV e IR. Coeficiente de correlación de Spearman (*r*) y *p* valor para modelos ajustados y no ajustados. $p < 0,05$ fue considerado como significativo estadísticamente.

Dada la correlación de quemerina con marcadores de alteraciones metabólicas, se decidió hacer un análisis teniendo en cuenta los valores de cortes de los mismos conocidos para nuestra población (Fig. 8.3).

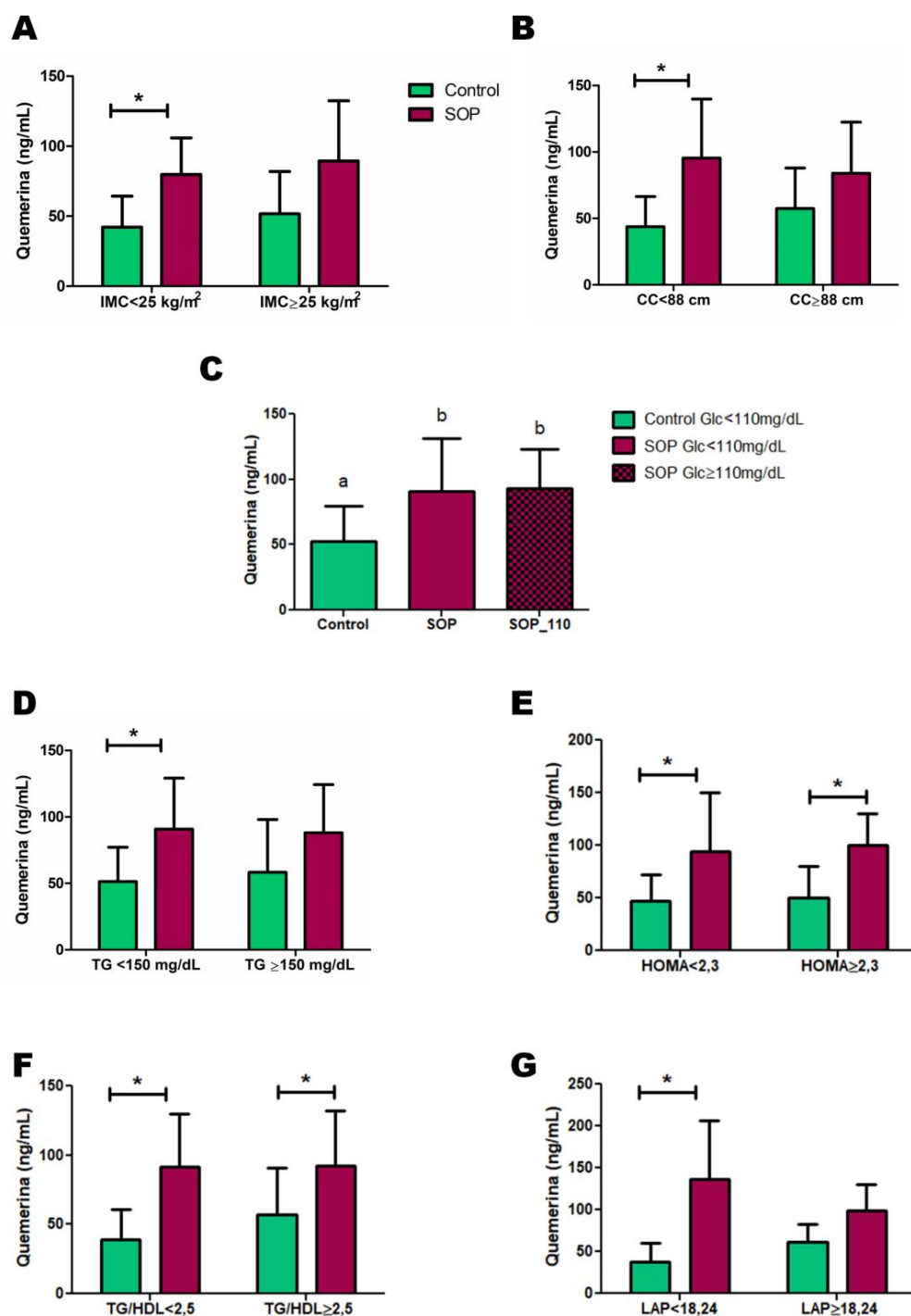


Figura 8.3: Análisis de los valores séricos de quemerina en población control (verde) y SOP (violeta) teniendo en cuenta los distintos valores de corte de los parámetros analizados en la tabla 8.4 con los que quemerina presentó correlación. A) IMC, B) CC, C) glucosa, D) TG, E) HOMA-IR, F) TG/HDL y G) LAP. Cada barra corresponde a la media + D.E.. Se realizaron análisis por ANOVA de dos factores con post-hoc test Tukey, para los casos de IMC, CC, TG, HOMA-IR, TG/HDL y LAP, * indica diferencias significativas, $p < 0,05$, entre los grupos señalizados. En el caso de la glucemia sérica se realizó un ANOVA de un factor con post-hoc test Tukey (a vs. b, $p < 0,05$).

Los resultados revelan que en la población con $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$, $CC < 88 \text{ cm}$, $TG < 150 \text{ mg/dL}$ o $LAP < 18,24$ los niveles de quemerina se encuentran más altos en el caso de pacientes con SOP respecto de la población control. Mientras que, en el caso de que dichos marcadores se presenten por encima del valor de corte, no se encontraron diferencias entre la población SOP y la población control. Sin embargo, en el caso del marcador de insulino resistencia HOMA-IR y del marcador de RCV (asociado de IR) TG/HDL , encontramos que los niveles de quemerina sérica siempre son más altos en pacientes con SOP respecto de la población control.

En el caso de los niveles de glucosa no pudimos evaluar los niveles de quemerina en pacientes control que presenten una glucemia mayor a 110 mg/dL , debido a que ninguna de las pacientes control presentó dichos parámetros. Y se hallaron altos niveles de quemerina en las pacientes SOP independientemente de sus valores de glucemia.

Discusión

Como hemos mencionado a lo largo de este trabajo, la etiología de SOP se considera multifactorial, y la diversidad étnica y genética contribuyen tanto a SOP como al riesgo cardiovascular, afectando a las distintas poblaciones en diferente medida (Dasgupta y Reddy, 2008; Miranda et al., 2013; Zhao y Qiao, 2013). Existen pocos trabajos asociados al estudio de desórdenes metabólicos en pacientes con SOP latinoamericanas, estando la mayor parte de los estudios enfocados en pacientes caucásicas europeas o estadounidenses.

La población Argentina, es muy heterogénea a lo largo del país (Catelli et al., 2011). Particularmente, la ciudad de Buenos Aires y el Gran Buenos Aires si bien tienen un alto aporte europeo, siendo éste de entre 78-80% de contribución principalmente de Italia y España, presentan asimismo un relevante componente indígena (15-19%) y africano (2-4%) (Seldin et al., 2007; Avena et al., 2012). Por lo que, esta población no puede considerarse enteramente caucásica. Incluso, dentro de Latinoamérica cada población es particular. Un estudio reciente que compara una población SOP de Argentina con una de Chile, muestra que las alteraciones metabólicas son diferentes. Esto pone en relevancia la influencia e importancia de tener en cuenta en el abordaje de patologías multifactoriales a la constitución étnica, así como también al estilo de vida, que incluye la situación económica y el estatus nutricional de las poblaciones de estudio (Ladrón de Guevara et al., 2014). Por todo lo dicho, es importante estudiar cada situación particular de las diferentes poblaciones latinoamericanas.

En los últimos años, estudios regionales han puesto en evidencia que los niveles de HDL, la presión arterial elevada y la obesidad son los principales contribuyentes a las enfermedades cardiovasculares (ECV) en Latinoamérica (Miranda et al., 2013) y principalmente en Sudamérica (Rubinstein et al., 2015). Estos factores están presentes frecuentemente en mujeres con SOP (Motta, 2012; Wild, 2012). Existe evidencia de que las pacientes con SOP jóvenes presentan ECV como aterosclerosis (Carmina, 2009) y está establecido que las ECV aumentan con la edad, de forma independiente a la presencia de otras patologías (Jousilahti et al., 1999). Por lo dicho, en nuestro estudio nos concentramos en mujeres en periodo reproductivo temprano (18 y 35 años) debido a la relevancia e importancia de poder identificar a mujeres jóvenes con SOP que presentan alto riesgo metabólico.

En nuestra población mostramos que el fenotipo NHA presentó, en el análisis ajustado por edad e IMC, un riesgo metabólico equivalente al del fenotipo HA. Estos datos revelan la importancia de utilizar los criterios de Rotterdam para el diagnóstico de SOP porque el mismo incluye al fenotipo NHA. Como las mujeres NHA de nuestra población presentan el mismo RCV y alteraciones metabólicas comparables a los fenotipos HA, la aplicación de otros criterios diagnósticos como NIH (1990) y AES (2006) (Guastella et al., 2010; Dunaif y Fauser, 2013) hubieran dejado de lado a estas pacientes para la prevención de RCV, tal como también muestran Amato y colaboradores (2011) en una población de mujeres de Italia (Amato et al., 2011). Estos datos están en concordancia con lo que fue descripto para otra población argentina de la provincia de Córdoba, donde el fenotipo NHA mostró una prevalencia de SM similar a los fenotipos HA. Estos resultados resaltan la importancia del hecho de que SOP debe ser considerado más allá de una condición hiperandrogénica, ya que involucra varios desórdenes metabólicos, como fue expresado por la Sociedad de Exceso de andrógenos y SOP (*AE-PCOS Society*) en los años pasados (Wild et al., 2010) destacando la importancia del rol de la vía de la insulina en la patogénesis de SOP y sus riesgos metabólicos asociados.

En este trabajo demostramos que tanto LAP como VAI serían buenos marcadores en una población de etnia mixta, mostrando que pueden ser utilizados como parámetros de RCV e IR. Los índices LAP y VAI han demostrado ser buenos marcadores de RCV en diferentes poblaciones de mujeres caucásicas y también en mujeres con SOP (Kahn, 2005; Wiltgen et al., 2009; Amato et al., 2010, 2011; Ramezani Tehrani et al., 2014), y pueden ser usados como predictores del desarrollo de ECV.

Nuestros resultados muestran que LAP y VAI presentan correlación no solo con los factores definidos por el ATP III como contribuyentes al SM e IR, sino también con otros marcadores tradicionales de RCV como son CT/HDL y TG/HDL. Es interesante mencionar que

las diferencias entre los valores de cortes comparado con otros estudios (Wiltgen et al., 2009; Amato et al., 2011; Oh et al., 2013; Nascimento et al., 2015) pueden deberse no solo a la diversidad étnica presente en nuestra población de estudio sino también, a la edad de las mujeres consideradas, ya que otros estudios contemplan una rango más amplio, tomando en cuenta mujeres de hasta 45 años, lo que incluye mujeres en etapa peri menopáusica (Wiltgen et al., 2009; Amato et al., 2011; Oh et al., 2013; Nascimento et al., 2015). Como fue mencionado, el perfil metabólico cambia a lo largo de la vida en todas las mujeres y empeora a medida que la mujer avanza en edad, (Echiburú et al., 2016) pudiendo influenciar entonces los valores de corte. Esto resalta la necesidad de buscar valores de corte que contemplen la etapa reproductiva temprana de las pacientes para así poder detectar, de forma temprana, mujeres jóvenes con riesgo de padecer trastornos metabólicos. A pesar de que LAP y VAI han sido discutidos como herramientas diagnósticas para evaluar eventos cardio y cerebro vasculares, porque incluyen parámetros antropométricos y metabólicos, sí reflejan desórdenes que fueron asociados con incremento del RCV. Entre ellos: los perfiles dislipidémicos y las alteraciones del metabolismo glucémico (Wiltgen et al., 2009; Amato et al., 2010; Hosseinpanah et al., 2014).

En conclusión, nuestros datos sugieren que tanto VAI como LAP son buenos marcadores para evaluar RCV e IR en pacientes con SOP de una población local con etnicidad mixta. El análisis de los parámetros metabólicos entre los fenotipos SOP (HA y NHA) muestra que el RCV se presenta de forma independiente a la condición androgénica.

Por otro lado, una vez caracterizada nuestra población y determinado el riesgo metabólico asociado a los fenotipos NHA y HA, evaluamos a la adipoquina quemerina como posible marcador de alteraciones metabólicas en SOP.

Se conoce que la adiposidad está asociada a la insulino resistencia y que las pacientes con SOP presentan obesidad en un alto porcentaje así como también, alteraciones en el tejido adiposo (Motta, 2012; Martínez-García et al., 2013). Si bien se conoce que existe una relación entre SOP y adiposidad, poco se sabe del rol de las adipoquinas en SOP. En particular, quemerina ha sido descrita como una adipoquina que no sólo es secretada por tejido adiposo sino también por otros tejidos, entre ellos el hígado y el ovario (Bozaoglu et al., 2007; Ernst y Sinal, 2010; Reverchon et al., 2014b; Helfer y Wu, 2018). Como hemos mencionado en capítulos anteriores, quemerina ha sido involucrada en la regulación de la función ovárica y por ello el interés por la misma en el contexto de SOP (Reverchon et al., 2014b). Muy pocos estudios han caracterizado hasta el momento, a quemerina en SOP, y ninguno ha abordado su estudio en poblaciones latinoamericanas. Hasta el día de hoy, solo constan estudios en Turquía (Ademoglu et al., 2014; Guzel et al., 2014; Guvenc et al., 2016), Egipto (El-Omda et al., 2018),

China (Wang et al., 2014; Huang et al., 2015; Yang et al., 2016), Reino Unido (Tan et al., 2009) y Estados Unidos (Kort et al., 2015) y los resultados entre esos estudios no son consistentes. Esto nos lleva a pensar, nuevamente, que dadas las características multifactoriales de SOP, la secreción, los niveles y el rol de quemerina en el síndrome, podrían estar dependiendo de diversos factores como son: el estilo de vida y el trasfondo genético (*genetic background*), tal cual mencionamos previamente. En particular, encontramos que los niveles de quemerina son elevados en nuestras pacientes con SOP, independientemente de la presencia de hiperandrogenismo. Asimismo, encontramos que quemerina correlaciona, en nuestra población, con marcadores de riesgo metabólico. Estos resultados concuerdan con lo anteriormente dicho, mostrando que quemerina, como posible marcador de riesgo metabólico, se encuentra aumentada en ambos fenotipos y resaltando así que, tanto los fenotipos HA como NHA presentan un alto riesgo metabólico. Sin embargo, estos resultados se contradicen con lo demostrado por Wang y colaboradores (2014), quienes reportaron que los niveles de quemerina, en una población china, sólo se encuentran aumentados en el fenotipo hiperandrogénico (Wang et al., 2014). No obstante, estos autores también encontraron que dicho fenotipo es el que presenta el peor perfil metabólico. Por lo que, estos resultados tomados en conjunto reflejan que, en perfiles metabólicos alterados de pacientes SOP, los niveles de quemerina se encuentran incrementados, destacando así su posible rol en los mismos.

Otros estudios han demostrado que quemerina correlaciona con varios parámetros de SM y de IR. Sorprendentemente, si tomamos en cuenta sólo nuestra población SOP encontramos que quemerina correlaciona únicamente con el IMC. Pero en otras poblaciones SOP también se vio correlación con otros parámetros metabólicos. Por ejemplo, en una población china, quemerina correlacionó con HOMA-IR, IMC y TG (Huang et al., 2015) mientras que en otro estudio en China se mostró que correlaciona no sólo con los parámetros anteriores sino también con CC, LDL y HDL (Yang et al., 2016). En el caso de la población estadounidense, se encontró que quemerina correlaciona con el IMC, HOMA-IR y con los niveles de adiposidad subcutánea (Kort et al., 2015); mientras que, en la población de Reino Unido sólo correlaciona con HOMA-IR (Tan et al., 2009), y en la población egipcia se encontró que quemerina correlaciona con el IMC, el HOMA-IR, los niveles de insulina, de colesterol total y de colesterol HDL (El-Omda et al., 2018). Finalmente, para el caso de Turquía se ha visto en un estudio que quemerina correlaciona con la edad, el IMC, el HOMA-IR, TG y el índice cintura cadera (Guzel et al., 2014) y en otro, que también correlaciona con los niveles de insulina y HDL (Guvenc et al., 2016). Por lo que, teniendo en cuenta todos los estudios hasta el

momento, quemerina se sugiere como un marcador de alteraciones metabólicas, pero la correlación con cada uno de los parámetros metabólicos dependería de la población en cuestión y sus características, destacándose su asociación con un IMC elevado en todas las poblaciones SOP en cuestión.

En nuestra población, al considerar los valores de corte según ATP III para el síndrome metabólico, sobrepeso y obesidad según IMC y marcadores de riesgo cardiovascular con los que encontramos correlación con quemerina, hallamos que las pacientes con SOP presentan mayores niveles de quemerina circulante que las pacientes control, aún cuando dichos marcadores están dentro de los límites normales, según los valores de corte considerados. Asimismo, encontramos que los niveles de quemerina son siempre mayores en las pacientes con SOP que en la población control independientemente de la presencia de riesgo cardiovascular medida por LAP y TG/HDL. Estos resultados sugieren que los niveles circulantes de quemerina en nuestra población SOP se encuentran incrementados independientemente del estado metabólico alterado detectable por los marcadores estudiados. Esto podría indicar que la alteración en la secreción de quemerina estaría asociada a la patogénesis de SOP, relacionada a alteraciones del tejido adiposo, tal como también sugiere su correlación con el IMC, (Martínez-García et al., 2013; Spritzer et al., 2015) o incluso a alteraciones reproductivas propias del síndrome. En relación a este último punto, Yang y colaboradores (2018) mostraron que valores incrementados de quemerina sérica se encuentra en co-ocurrencia de abortos (Yang et al., 2018); y Huang y colaboradores (2015) mostraron que quemerina correlaciona con el volumen ovárico, el contero folicular y los niveles de SHBG (Huang et al., 2015). Asimismo El-Omda y colaboradores (2018) encontraron una correlación entre quemerina y los niveles de AMH (El-Omda et al., 2018), la cual ha sido asociada a alteraciones en el desarrollo folicular en SOP (Mohammad y Seghinsara, 2017). En este estudio no pudimos profundizar el análisis hormonal dado que no contábamos con el perfil hormonal completo de las pacientes control.

En conclusión, estos resultados suman evidencia al rol de quemerina en una población SOP, mostrando su relación con alteraciones metabólicas y la posibilidad de usarlo como marcador para detectarlas tempranamente. Por otro lado, los hallazgos de este trabajo, ponen en evidencia la presencia de trastornos metabólicos en las pacientes con SOP, aún en edades tempranas e independientemente de la presencia de hiperandrogenismo. Las inconsistencias entre distintos resultados en torno al rol de quemerina en SOP, al evaluar diversas poblaciones, pueden deberse, como han alertado Kort y colaboradores (2015), a la heterogeneidad en la adiposidad y de los distintos niveles de hiperandrogenismo presente en las diferentes poblaciones de pacientes con SOP estudiadas. Asimismo, estos resultados

resaltan la importancia de tener en cuenta el origen de la población de interés en el estudio de patologías complejas y heterogéneas.

IX. Conclusiones

IX. Conclusiones

Parte A: modelo animal de hiperandrogenización prenatal

SOP es una endocrinopatía común, que afecta a mujeres en edad fértil. Los síntomas de SOP incluyen no sólo alteraciones reproductivas sino también metabólicas. Su etiología no se conoce con certeza y se propone un origen multifactorial, donde los andrógenos jugarían un rol importante. Particularmente, en los últimos años se ha postulado que el efecto de andrógenos durante estadios prenatales y perinatales podrían inducir características tipo SOP en hembras en la vida postnatal (Revisado en (Padmanabhan y Veiga-Lopez, 2013; Abruzzese et al., 2018)). La hipótesis de que una hiperandrogenización prenatal conllevaría a características tipo SOP se ha probado en diversos modelos animales, entre ellos primates no humanos (Abbott et al., 2005), roedores (Demissie et al., 2008; Amalfi et al., 2012; Yan et al., 2014) y ovejas (Ortega et al., 2010; Padmanabhan et al., 2014). En el caso particular de los modelos en roedores, la mayoría de los trabajos utiliza dosis de andrógenos que llevan a una defeminización de los animales, alterando la apertura vaginal (Wolf, 2002; Amalfi et al., 2012; Sun et al., 2012). Por lo que, en el presente trabajo utilizamos una dosis más baja de testosterona que induce alteraciones reproductivas y metabólicas sin provocar defeminización en los órganos.

En este trabajo nos propusimos estudiar los efectos a largo plazo de la androgenización prenatal sobre la funcionalidad metabólica y ovárica en dos etapas de la vida: la transición de la pubertad a la adultez (60 días de edad) y la adultez (90 días de edad). En particular nos interesó estudiar los efectos que el androgenismo prenatal podría causar sobre el sistema PPAR γ , el cual actúa modulando diversas funciones reproductivas y ováricas (Vélez et al., 2013; Bogacka et al., 2015). Principalmente, nos centramos en la modulación sobre la esteroidogénesis ovárica, la cual se sabe puede ser regulada a distintos niveles y por diversos mecanismos.

Nuestros resultados mostraron que la hiperandrogenización prenatal:

- 1) En la dosis usada de testosterona prenatal, conduce al desarrollo de dos fenotipos detectables por el seguimiento del ciclo estral de los animales. Algunos de ellos permanecen acíclicos pudiéndose detectar solo los estadios diestro o metaestro (o una combinación de ambos), mientras que, otro grupo de animales presenta ciclos irregulares.

- 2) Induce alteraciones metabólicas como son: hiperinsulinemia, hiperglucemia, insulino resistencia y dislipidemia, que pueden detectarse desde los 60 días de edad y permanecen (y aún empeoran en ciertos aspectos) a los 90 días de edad.
- 3) Provoca afecciones en el tejido hepático, conduciendo a estrés oxidativo y alteraciones en la lipogénesis que varían a lo largo de la vida siendo el más afectado, el fenotipo clasificado como anovulatorio.
- 4) Altera la foliculogénesis y esteroidogénesis ovárica de forma fenotipo dependiente.
- 5) Afecta la funcionalidad ovárica. No sólo repercute negativamente en la esteroidogénesis sino también sobre mediadores energéticos ováricos que la regulan, demostrando entonces un compromiso entre el balance energético y las funciones reproductivas.
- 6) Modula el tráfico de colesterol intraovárico, condicionando la esteroidogénesis.
- 7) Conduce a alteraciones en la vía de PPAR γ y de la adipoquina ovárica quequerina, modificando su expresión, modulación y señalización intraovárica.

Resumen visual final parte A

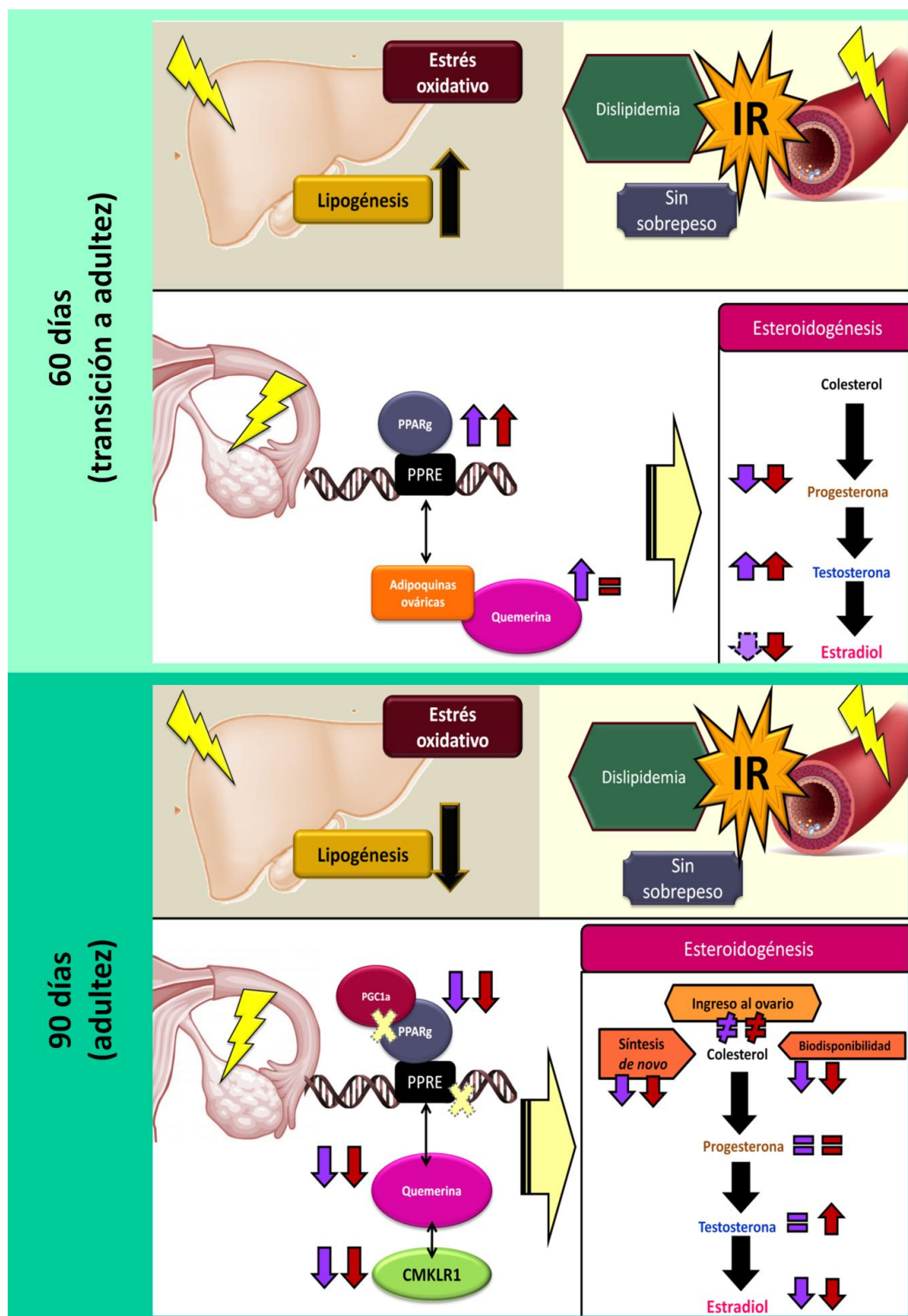


Figura 9.1: Esquema resumen de los efectos del hiperandrogenismo prenatal a 60 y 90 días de edad. Los rayos indican los sistemas afectados por el efecto prenatal de andrógenos. Flechas y signos de desigualdad y signos igual indican la desregulación (en el caso de flechas y signos de desigualdad) o no (signos iguales) respecto del grupo control en los fenotipos HPiov (violeta) y HPanov (rojo).

Parte B: estudio de alteraciones metabólicas en una población local de pacientes con SOP

SOP es una patología multifactorial donde el trasfondo genético (*genetic background*), la etnicidad y el estilo de vida contribuyen a su desarrollo y manifestación (Franks, 1995; Filippou y Homburg, 2017). Poco se conoce acerca de las mujeres con SOP en poblaciones latinoamericanas. Teniendo en cuenta que nuestra población tiene una historia y contribución genética diferente a las poblaciones europeas, norteamericanas y asiáticas (que son las que principalmente se han estudiado en SOP); y que las condiciones socioeconómicas, el estilo y la calidad de vida en nuestro país resultan diferentes de las poblaciones tomadas como referencia, decidimos entonces abordar el estudio de SOP y su caracterización asociada al riesgo metabólico en la población local. Los resultados de este trabajo revelan que:

- 1) Las mujeres con SOP de la ciudad de Buenos Aires y conurbano bonaerense muestran alteraciones metabólicas independientemente del fenotipo presentado. Por lo que, resulta importante el diagnóstico de SOP en nuestra población según los criterios de Rotterdam, por ser éste el más inclusivo.
- 2) LAP y VAI se establecen como marcadores de fácil aplicación y bajo costo para la clínica con el objetivo de establecer riesgo metabólico, y particularmente riesgo cardiovascular, en las pacientes con SOP.
- 3) Quemerina es un buen marcador de SOP y está asociado a alteraciones metabólicas.

Resumen visual final parte B

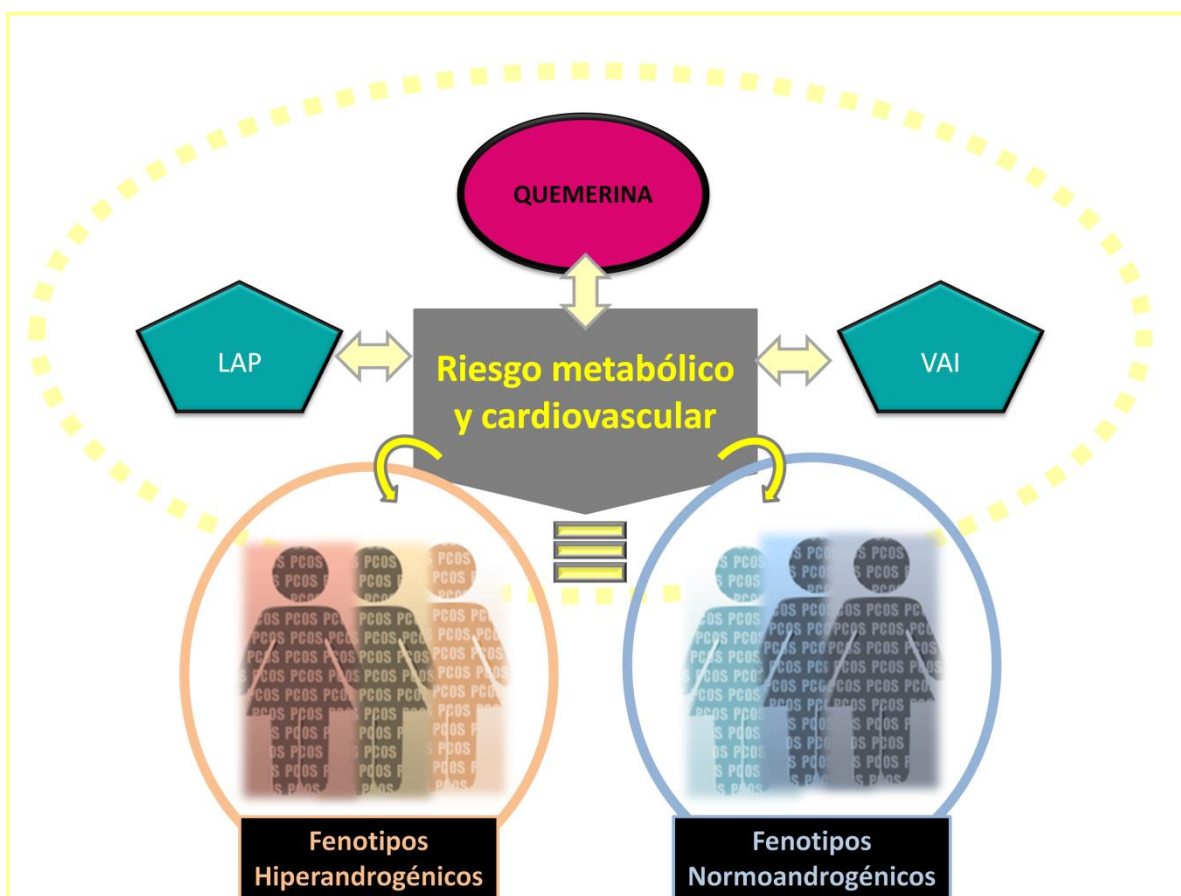


Figura 9.2 : Esquema resumen del estudio de pacientes con SOP locales. Nuestros resultados reflejaron un riesgo cardiovascular y alteraciones metabólicas equivalentes y similares en los grupos hiperandrogénicos y normoandrogénicos. LAP, VAI y quemerina se pueden establecer como marcadores e indicadores de dichas alteraciones metabólicas encontradas.

X. Referencias

- Abbasi A, Moghadam AA, Kahrarian Z, Abbsavaran R, Yari K, Alizadeh E. 2017. Molecular effects of leptin on peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR- γ) mRNA expression in rat's adipose and liver tissue. *Cell. Mol. Biol. Noisy--Gd. Fr.* 63:89-93.
- Abbott DH, Barnett DK, Bruns CM, Dumesic DA. 2005. Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome? *Hum. Reprod. Update* 11:357-374.
- Abbott DH, Dumesic DA, Franks S. 2002. Developmental origin of polycystic ovary syndrome - a hypothesis. *J. Endocrinol.* 174:1-5.
- Abbott DH, Dumesic DA, Levine JE, Dunaif A, Padmanabhan V. 2007. Animal Models and Fetal Programming of the Polycystic Ovary Syndrome. En: Azziz R, Nestler JE, Dewailly D, editores. *Androgen Excess Disorders in Women: Polycystic Ovary Syndrome and Other Disorders. Contemporary Endocrinology.* Totowa, NJ: Humana Press. p 259-272. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-59745-179-6_23
- Abbott DH, Rayome BH, Dumesic DA, Lewis KC, Edwards AK, Wallen K, Wilson ME, Appt SE, Levine JE. 2017. Clustering of PCOS-like traits in naturally hyperandrogenic female rhesus monkeys. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 32:923-936.
- Abbott DH, Tarantal AF, Dumesic DA. 2009. Fetal, infant, adolescent and adult phenotypes of polycystic ovary syndrome in prenatally androgenized female rhesus monkeys. *Am. J. Primatol.* 71:776-784.
- Ables GP. 2012. Update on Ppar α and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *PPAR Res.* [Internet]. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ppar/2012/912351/abs/>
- Abraham GE, Swerdloff R, Tulchinsky D, Odell WD. 1971. Radioimmunoassay of Plasma Progesterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 32:619-624.
- Abramovich D, Irusta G, Bas D, Cataldi NI, Parborell F, Tesone M. 2012. Angiopoietins/TIE2 System and VEGF Are Involved in Ovarian Function in a DHEA Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrinology* 153:3446-3456.
- Abramovich DR, Wade AP. 1969. Transplacental passage of steroids: the presence of corticosteroids in amniotic fluid. *J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw.* 76:610-614.
- Abruzzese GA, Crisosto N, De Grava Kempinas W, Sotomayor-Zárate R. 2018. Developmental programming of the female neuroendocrine system by steroids. *J. Neuroendocrinol.* 30:e12632.
- Abruzzese GA, Heber MF, Ferreira SR, Velez LM, Reynoso R, Pignataro OP, Motta AB. 2016. Prenatal hyperandrogenism induces alterations that affect liver lipid metabolism. *J. Endocrinol.* 230:67-79.
- Adams LA, Angulo P, Lindor KD. 2005. Nonalcoholic fatty liver disease. *CMAJ Can. Med. Assoc. J.* 172:899-905.

- Ademoglu E, Berberoglu Z, Carlioglu A, Dellal F, Gorar S, Alphan Z, Uysal S, Karakurt F. 2014. Higher levels of circulating chemerin in both lean and obese patients with polycystic ovary syndrome. *Minerva Ginecol.* 66:535-542.
- Almond D, Currie J. 2011. Killing Me Softly: The Fetal Origins Hypothesis. *J. Econ. Perspect. J. Am. Econ. Assoc.* 25:153-172.
- Amalfi S, Velez LM, Heber MF, Vighi S, Ferreira SR, Orozco AV, Pignataro O, Motta AB. 2012. Prenatal Hyperandrogenization Induces Metabolic and Endocrine Alterations Which Depend on the Levels of Testosterone Exposure. *PLOS ONE* 7:e37658.
- Amato MC, Giordano C, Galia M, Criscimanna A, Vitabile S, Midiri M, Galluzzo A, AlkaMeSy Study Group. 2010. Visceral Adiposity Index: a reliable indicator of visceral fat function associated with cardiometabolic risk. *Diabetes Care* 33:920-922.
- Amato MC, Verghi M, Galluzzo A, Giordano C. 2011. The oligomenorrhoeic phenotypes of polycystic ovary syndrome are characterized by a high visceral adiposity index: a likely condition of cardiometabolic risk. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 26:1486-1494.
- Arnold AP. 2009. The organizational-activational hypothesis as the foundation for a unified theory of sexual differentiation of all mammalian tissues. *Horm. Behav.* 55:570-578.
- Aroda VR, Ciaraldi TP, Burke P, Mudaliar S, Clopton P, Phillips S, Chang RJ, Henry RR. 2009. Metabolic and Hormonal Changes Induced by Pioglitazone in Polycystic Ovary Syndrome: A Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94:469-476.
- Artimani T, Karimi J, Mehdizadeh M, Yavangi M, Khanlarzadeh E, Ghorbani M, Asadi S, Kheiripour N. 2018. Evaluation of pro-oxidant-antioxidant balance (PAB) and its association with inflammatory cytokines in polycystic ovary syndrome (PCOS). *Gynecol. Endocrinol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Endocrinol.* 34:148-152.
- Asunción M, Calvo RM, San Millán JL, Sancho J, Avila S, Escobar-Morreale HF. 2000. A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85:2434-2438.
- Avena S, Via M, Ziv E, Pérez-Stable EJ, Gignoux CR, Dejean C, Huntsman S, Torres-Mejía G, Dutil J, et al. 2012. Heterogeneity in Genetic Admixture across Different Regions of Argentina. *PLOS ONE* 7:e34695.
- Azhar S, Tsai L, Medicherla S, Chandrasekher Y, Giudice L, Reaven E. 1998. Human Granulosa Cells Use High Density Lipoprotein Cholesterol for Steroidogenesis. 83:9.
- Azziz R. 2004. PCOS: a diagnostic challenge. *Reprod. Biomed. Online* 8:644-648.
- Azziz R. 2005. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: a reappraisal. *Fertil. Steril.* 83:1343-1346.
- Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Janssen OE, Legro RS, Norman RJ, et al. 2006. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91:4237-4245.

- Baranova A, Tran TP, Afendy A, Wang L, Shamsaddini A, Mehta R, Chandhoke V, Birerdinc A, Younossi ZM. 2013. Molecular signature of adipose tissue in patients with both non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and polycystic ovarian syndrome (PCOS). *J. Transl. Med.* 11:133.
- Barkan D, Jia H, Dantes A, Vardimon L, Amsterdam A, Rubinstein M. 1999. Leptin Modulates the Glucocorticoid-Induced Ovarian Steroidogenesis. *Endocrinology* 140:1731-1738.
- Barker DJ. 1995. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ* 311:171-174.
- Barker DJP. 2007. The origins of the developmental origins theory. *J. Intern. Med.* 261:412-417.
- Barnes RB, Rosenfield RL, Ehrmann DA, Cara JF, Cuttler L, Levitsky LL, Rosenthal IM. 1994. Ovarian hyperandrogenism as a result of congenital adrenal virilizing disorders: evidence for perinatal masculinization of neuroendocrine function in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79:1328-1333.
- Barnett KR, Schilling C, Greenfeld CR, Tomic D, Flaws JA. 2006. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Hum. Reprod. Update* 12:537-555.
- Barouki R, Gluckman PD, Grandjean P, Hanson M, Heindel JJ. 2012. Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. *Environ. Health Glob. Access Sci. Source* 11:42.
- Bateson P, Gluckman P, Hanson M. 2014. The biology of developmental plasticity and the Predictive Adaptive Response hypothesis. *J. Physiol.* 592:2357-2368.
- Baum MJ, Woutersen PJA, Slob AK. 1991. Sex Difference in Whole-Body Androgen Content in Rats on Fetal Days 18 and 19 Without Evidence that Androgen Passes from Males to Females. *Biol. Reprod.* 44:747-751.
- Bharati J, Bharti MK, Kar D, Sahoo PR. 2016. Adipokines as metabolic modulators of ovarian functions in livestock: A mini-review. *J. Adv. Vet. Anim. Res.* 3:206-213.
- Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917.
- den Boer M, Voshol PJ, Kuipers F, Havekes LM, Romijn JA. 2004. Hepatic steatosis: a mediator of the metabolic syndrome. Lessons from animal models. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24:644-649.
- Bogacka I, Kurzynska A, Bogacki M, Chojnowska K. 2015. Peroxisome proliferator-activated receptors in the regulation of female reproductive functions. *Folia Histochem. Cytobiol.* 53:189-200.
- Bondue B, Wittamer V, Parmentier M. 2011. Chemerin and its receptors in leukocyte trafficking, inflammation and metabolism. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22:331-338.
- Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggiani F, Zenere MB, Monauni T, Muggeo M. 2000. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care* 23:57-63.

- Boomsma CM, Eijkemans MJC, Hughes EG, Visser GHA, Fauser BCJM, Macklon NS. 2006. A meta-analysis of pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod. Update* 12:673-683.
- Boots CE, Jungheim ES. 2015. Inflammation and Human Ovarian Follicular Dynamics. *Semin. Reprod. Med.* 33:270.
- Bozaoglu K, Bolton K, McMillan J, Zimmet P, Jowett J, Collier G, Walder K, Segal D. 2007. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology* 148:4687-4694.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brettenthaler N, De Geyter C, Huber PR, Keller U. 2004. Effect of the insulin sensitizer pioglitazone on insulin resistance, hyperandrogenism, and ovulatory dysfunction in women with polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89:3835-3840.
- Brooks RV. 1975. Androgens. *Clin. Endocrinol. Metab.* 4:503-520.
- Browning JD, Horton JD. 2004. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J. Clin. Invest.* 114:147-152.
- Budak E, Sánchez MF, Bellver J, Cerveró A, Simón C, Pellicer A. 2006. Interactions of the hormones leptin, ghrelin, adiponectin, resistin, and PYY3-36 with the reproductive system. *Fertil. Steril.* 85:1563-1581.
- Buege JA, Aust SD. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52:302-310.
- Burgert TS, Taksali SE, Dziura J, Goodman TR, Yeckel CW, Papademetris X, Constable RT, Weiss R, Tamborlane WV, et al. 2006. Alanine aminotransferase levels and fatty liver in childhood obesity: associations with insulin resistance, adiponectin, and visceral fat. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91:4287-4294.
- Cabrero A, Cubero M, Llaverías G, Alegret M, Sánchez R, Laguna JC, Vázquez-Carrera M. 2005. Leptin down-regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma) mRNA levels in primary human monocyte-derived macrophages. *Mol. Cell. Biochem.* 275:173-179.
- Cai G, Ma X, Chen B, Huang Y, Liu S, Yang H, Zou W. 2017. MicroRNA-145 Negatively Regulates Cell Proliferation Through Targeting IRS1 in Isolated Ovarian Granulosa Cells From Patients With Polycystic Ovary Syndrome. *Reprod. Sci. Thousand Oaks Calif* 24:902-910.
- Capobianco E, White V, Higa R, Martínez N, Jawerbaum A. 2008. Effects of natural ligands of PPARgamma on lipid metabolism in placental tissues from healthy and diabetic rats. *Mol. Hum. Reprod.* 14:491-499.
- Carmina E. 2009. Cardiovascular risk and events in polycystic ovary syndrome. *Climacteric J. Int. Menopause Soc.* 12 Suppl 1:22-25.

- Cash JL, Hart R, Russ A, Dixon JPC, Colledge WH, Doran J, Hendrick AG, Carlton MBL, Greaves DR. 2008. Synthetic chemerin-derived peptides suppress inflammation through ChemR23. *J. Exp. Med.* 205:767-775.
- Catelli ML, Alvarez-Iglesias V, Gómez-Carballa A, Mosquera-Miguel A, Romanini C, Borosky A, Amigo J, Carracedo A, Vullo C, et al. 2011. The impact of modern migrations on present-day multi-ethnic Argentina as recorded on the mitochondrial DNA genome. *BMC Genet.* 12:77.
- Chaffin CL, Vandevoort CA. 2013. Follicle growth, ovulation, and luteal formation in primates and rodents: a comparative perspective. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 238:539-548.
- Chang RJ, Cook-Andersen H. 2013. Disordered follicle development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 373:51-60.
- Chang X-L, Liu L, Wang N, Chen Z-J, Zhang C. 2017. The function of high-density lipoprotein and low-density lipoprotein in the maintenance of mouse ovarian steroid balance. *Biol. Reprod.* 97:862-872.
- Chen M-J, Chou C-H, Chen S-U, Yang W-S, Yang Y-S, Ho H-N. 2015. The effect of androgens on ovarian follicle maturation: Dihydrotestosterone suppress FSH-stimulated granulosa cell proliferation by upregulating PPAR γ -dependent PTEN expression. *Sci. Rep.* 5:18319.
- Chen X, Jia X, Qiao J, Guan Y, Kang J. 2013. Adipokines in reproductive function: a link between obesity and polycystic ovary syndrome. *J. Mol. Endocrinol.* 50:R21-R37.
- Chen Z-J, Zhao H, He L, Shi Y, Qin Y, Shi Y, Li Z, You L, Zhao J, et al. 2011. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for polycystic ovary syndrome on chromosome 2p16.3, 2p21 and 9q33.3. *Nat. Genet.* 43:55-59.
- Chow JDY, Jones MEE, Prella K, Simpson ER, Boon WC. 2011. A selective estrogen receptor α agonist ameliorates hepatic steatosis in the male aromatase knockout mouse. *J. Endocrinol.* 210:323-334.
- Clark JM. 2006. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J. Clin. Gastroenterol.* 40 Suppl 1:S5-10.
- Conneely OM, Mulac-Jericevic B, DeMayo F, Lydon JP, O'Malley BW. 2002. Reproductive functions of progesterone receptors. *Recent Prog. Horm. Res.* 57:339-355.
- Connelly MA, Williams DL. 2003. SR-BI and cholesterol uptake into steroidogenic cells. *Trends Endocrinol. Metab.* 14:467-472.
- Considine RV. 2001. Regulation of leptin production. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 2:357-363.
- Conti M, Hsieh M, Zamah AM, Oh JS. 2012. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 356:65.
- Corbier P, Kerdelhue B, Picon R, Roffi J. 1978. Changes in Testicular Weight and Serum Gonadotropin and Testosterone Levels before, during, and after Birth in the Perinatal Rat. *Endocrinology* 103:1985-1991.

- Cornejo MP, Hentges ST, Maliqueo M, Coirini H, Becu-Villalobos D, Elias CF. 2016. Neuroendocrine Regulation of Metabolism. *J. Neuroendocrinol.* [Internet] 28. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jne.12395>
- Crisosto N, Echiburú B, Maliqueo M, Luchsinger M, Rojas P, Recabarren S, Sir-Petermann T. 2017. Reproductive and metabolic features during puberty in sons of women with polycystic ovary syndrome. *Endocr. Connect.* 6:607-613.
- Crisosto N, Echiburú B, Maliqueo M, Pérez V, Ladrón de Guevara A, Preisler J, Sánchez F, Sir-Petermann T. 2012. Improvement of hyperandrogenism and hyperinsulinemia during pregnancy in women with polycystic ovary syndrome: possible effect in the ovarian follicular mass of their daughters. *Fertil. Steril.* 97:218-224.
- Cruz G, Foster W, Paredes A, Yi KD, Uzumcu M. 2014. Long-term effects of early-life exposure to environmental oestrogens on ovarian function: role of epigenetics. *J. Neuroendocrinol.* 26:613-624.
- Cui Y, Miyoshi K, Claudio E, Siebenlist UK, Gonzalez FJ, Flaws J, Wagner K-U, Hennighausen L. 2002. Loss of the Peroxisome Proliferation-activated Receptor gamma (PPAR γ) Does Not Affect Mammary Development and Propensity for Tumor Formation but Leads to Reduced Fertility. *J. Biol. Chem.* 277:17830-17835.
- Cussons AJ, Watts GF, Burke V, Shaw JE, Zimmet PZ, Stuckey BGA. 2008. Cardiometabolic risk in polycystic ovary syndrome: a comparison of different approaches to defining the metabolic syndrome. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 23:2352-2358.
- Dasgupta S, Reddy BM. 2008. Present status of understanding on the genetic etiology of polycystic ovary syndrome. *J. Postgrad. Med.* 54:115-125.
- Davison SL, Davis SR. 2003. Androgens in women. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 85:363-366.
- Day CP, James OFW. 1998. Steatohepatitis: A tale of two "hits"? *Gastroenterology* 114:842-845.
- Demeestere I, Centner J, Gervy C, Englert Y, Delbaere A. 2005. Impact of various endocrine and paracrine factors on in vitro culture of preantral follicles in rodents. *Reprod. Camb. Engl.* 130:147-156.
- Demissie M, Lazic M, Foecking EM, Aird F, Dunaif A, Levine JE. 2008. Transient prenatal androgen exposure produces metabolic syndrome in adult female rats. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 295:E262-E268.
- Dewailly D, Robin G, Peigne M, Decanter C, Pigny P, Catteau-Jonard S. 2016. Interactions between androgens, FSH, anti-Müllerian hormone and estradiol during folliculogenesis in the human normal and polycystic ovary. *Hum. Reprod. Update* 22:709-724.
- Diamanti-Kandarakis E, Piperi C, Kalofoutis A, Creatsas G. 2005. Increased levels of serum advanced glycation end-products in women with polycystic ovary syndrome. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 62:37-43.
- Dobrzyn K, Smolinska N, Kiezun M, Szeszko K, Rytelewska E, Kisielewska K, Gudelska M, Kaminski T. 2018. Adiponectin: A New Regulator of Female Reproductive System. *Int. J.*

Endocrinol. [Internet]. Available from:
<https://www.hindawi.com/journals/ije/2018/7965071/>

- Donner NC, Lowry CA. 2013. Sex differences in anxiety and emotional behavior. *Pflugers Arch.* 465:601-626.
- Drummond AE. 2006. The role of steroids in follicular growth. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 4:16.
- Dunaif A. 1997. Insulin Resistance and the Polycystic Ovary Syndrome: Mechanism and Implications for Pathogenesis. *Endocr. Rev.* 18:774-800.
- Dunaif A, Fauser BCJM. 2013. Renaming PCOS--a two-state solution. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98:4325-4328.
- Dunaif A, Scott D, Finegood D, Quintana B, Whitcomb R. 1996. The insulin-sensitizing agent troglitazone improves metabolic and reproductive abnormalities in the polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81:3299-3306.
- Dupont J, Chabrolle C, Ramé C, Tosca L, Coyral-Castel S. 2008. Role of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptors, Adenosine Monophosphate-Activated Kinase, and Adiponectin in the Ovary. *PPAR Res.* [Internet] 2008. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2225459/>
- Dupont J, Pollet-Villard X, Reverchon M, Mellouk N, Levy R. 2015. Adipokines in human reproduction. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* 24:11-24.
- Dupont J, Reverchon M, Cloix L, Froment P, Ramé C. 2012. Involvement of adipokines, AMPK, PI3K and the PPAR signaling pathways in ovarian follicle development and cancer. *Int. J. Dev. Biol.* 56:959-967.
- Echiburú B, Crisosto N, Maliqueo M, Pérez-Bravo F, de Guevara AL, Hernández P, Cavada G, Rivas C, Clavel A, et al. 2016. Metabolic profile in women with polycystic ovary syndrome across adult life. *Metabolism.* 65:776-782.
- Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. 2009. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr. Rev.* 30:624-712.
- Ehrmann DA. 2005. Polycystic ovary syndrome. *N. Engl. J. Med.* 352:1223-1236.
- Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL, Cavaghan MK, Imperial J. 1999. Prevalence of impaired glucose tolerance and diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care* 22:141-146.
- Eisner JR, Dumesic DA, Kemnitz JW, Abbott DH. 2000. Timing of prenatal androgen excess determines differential impairment in insulin secretion and action in adult female rhesus monkeys. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85:1206-1210.
- Elias CF, Purohit D. 2013. Leptin signaling and circuits in puberty and fertility. *Cell. Mol. Life Sci.* 70:841-862.
- El-Omda FA, Emara IA, Abdel-Latef DM. 2018. Level of Chemerin and Anti-Müllerian Hormone in Egyptian Obese Women with Polycystic Ovarian Syndrome. *Egypt. J. Hosp. Med.* 70:1097-1110.

- Eppig JJ. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reprod. Camb. Engl.* 122:829-838.
- Erickson GF, Magoffin DA, Garzo VG, Cheung AP, Chang RJ. 1992. Granulosa cells of polycystic ovaries: are they normal or abnormal? *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 7:293-299.
- Ernst MC, Haidl ID, Zúñiga LA, Dranse HJ, Rourke JL, Zabel BA, Butcher EC, Sinal CJ. 2012. Disruption of the Chemokine-Like Receptor-1 (CMKLR1) Gene Is Associated with Reduced Adiposity and Glucose Intolerance. *Endocrinology* 153:672-682.
- Ernst MC, Sinal CJ. 2010. Chemerin: at the crossroads of inflammation and obesity. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 21:660-667.
- Estall JL, Kahn M, Cooper MP, Fisher FM, Wu MK, Laznik D, Qu L, Cohen DE, Shulman GI, et al. 2009. Sensitivity of lipid metabolism and insulin signaling to genetic alterations in hepatic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha expression. *Diabetes* 58:1499-1508.
- Esteves SC, Alviggi C. 2015. The Role of LH in Controlled Ovarian Stimulation. En: Ghumman S, editor. *Principles and Practice of Controlled Ovarian Stimulation in ART*. New Delhi: Springer India. p 171-196. Available from: https://doi.org/10.1007/978-81-322-1686-5_16
- Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. 2001. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 285:2486-2497.
- Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. 2010. Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Biochemical, Metabolic and Clinical Implications. *Hepatology*. Baltimore, Md 51:679-689.
- Fajas L, Schoonjans K, Gelman L, Kim JB, Najib J, Martin G, Fruchart JC, Briggs M, Spiegelman BM, et al. 1999. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 19:5495-5503.
- Fan W, Yanase T, Morinaga H, Mu Y-M, Nomura M, Okabe T, Goto K, Harada N, Nawata H. 2005. Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ and Retinoid X Receptor Inhibits Aromatase Transcription via Nuclear Factor-κB. *Endocrinology* 146:85-92.
- Fauser BC, Van Heusden AM. 1997. Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocr. Rev.* 18:71-106.
- Ferland DJ, Watts SW. 2015. Chemerin: A Comprehensive Review Elucidating the Need for Cardiovascular Research. *Pharmacol. Res.* 99:351-361.
- Ferré P, Fougère F. 2010. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes Obes. Metab.* 12 Suppl 2:83-92.
- Filippou P, Homburg R. 2017. Is foetal hyperexposure to androgens a cause of PCOS? *Hum. Reprod. Update* 23:421-432.

- Foecking EM, McDevitt MA, Acosta-Martínez M, Horton TH, Levine JE. 2008. Neuroendocrine consequences of androgen excess in female rodents. *Horm. Behav.* 53:673-692.
- Foecking EM, Szabo M, Schwartz NB, Levine JE. 2005. Neuroendocrine Consequences of Prenatal Androgen Exposure in the Female Rat: Absence of Luteinizing Hormone Surges, Suppression of Progesterone Receptor Gene Expression, and Acceleration of the Gonadotropin-Releasing Hormone Pulse Generator. *Biol. Reprod.* 72:1475-1483.
- Forabosco A, Sforza C, De Pol A, Vizzotto L, Marzona L, Ferrario VF. 1991. Morphometric study of the human neonatal ovary. *Anat. Rec.* 231:201-208.
- Foufelle F, Ferré P. 2002. New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem. J.* 366:377-391.
- Fowden AL. 2003. The insulin-like growth factors and feto-placental growth. *Placenta* 24:803-812.
- Fowden AL, Forhead AJ. 2004. Endocrine mechanisms of intrauterine programming. *Reproduction* 127:515-526.
- Franks S. 1995. Polycystic ovary syndrome. *N. Engl. J. Med.* 333:853-861.
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. 1972. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 18:499-502.
- Froment P, Gizard F, Defever D, Staels B, Dupont J, Monget P. 2006. Peroxisome proliferator-activated receptors in reproductive tissues: from gametogenesis to parturition. *J. Endocrinol.* 189:199-209.
- Fujikura T, Froehlich LA. 1972. Organ-weight/brain-weight ratios as a parameter of prenatal growth: A balanced growth theory of viscera. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 112:896-902.
- Gambarin-Gelwan M, Kinkhabwala SV, Schiano TD, Bodian C, Yeh H-C, Futterweit W. 2007. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in women with polycystic ovary syndrome. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 5:496-501.
- Gluckman PD, Cutfield W, Hofman P, Hanson MA. 2005. The fetal, neonatal, and infant environments-the long-term consequences for disease risk. *Early Hum. Dev.* 81:51-59.
- Gluckman PD, Hanson MA, Buklijas T. 2010. A conceptual framework for the developmental origins of health and disease. *J. Dev. Orig. Health Dis.* 1:6-18.
- Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL. 2008. Effect of In Utero and Early-Life Conditions on Adult Health and Disease. *N. Engl. J. Med.* 359:61-73.
- Goralski KB, McCarthy TC, Hanniman EA, Zabel BA, Butcher EC, Parlee SD, Muruganandan S, Sinal CJ. 2007. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *J. Biol. Chem.* 282:28175-28188.

- Grossmann M, Wierman ME, Angus P, Handelsman DJ. 2018. Reproductive Endocrinology of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Endocr. Rev.*
- Graffigna MN, Litwak L, Abdala MM, Akel, Aranda C, Gutt S. 2005. Homa index in healthy subjects. Determinación del índice HOMA en sujetos presuntamente sanos. Estudio epidemiológico multicéntrico (resultados preliminares). *RAEM* 42 12-19.
- Guastella E, Longo RA, Carmina E. 2010. Clinical and endocrine characteristics of the main polycystic ovary syndrome phenotypes. *Fertil. Steril.* 94:2197-2201.
- Guo T, Zhang L, Cheng D, Liu T, An L, Li W-P, Zhang C. 2015. Low-density lipoprotein receptor affects the fertility of female mice. *Reprod. Fertil. Dev.* 27:1222-1232.
- Guvenc Y, Var A, Goker A, Kuscu NK. 2016. Assessment of serum chemerin, vaspin and omentin-1 levels in patients with polycystic ovary syndrome. *J. Int. Med. Res.* 44:796-805.
- Guzel EC, Celik C, Abali R, Kucukyalcin V, Celik E, Guzel M, Yilmaz M. 2014. Omentin and chemerin and their association with obesity in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol. Endocrinol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Endocrinol.* 30:419-422.
- Gwynne JT, Strauss JF. 1982. The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocr. Rev.* 3:299-329.
- Hanson MA, Gluckman PD. 2014. Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology? *Physiol. Rev.* 94:1027-1076.
- Hayes MG, Urbanek M, Ehrmann DA, Armstrong LL, Lee JY, Sisk R, Karaderi T, Barber TM, McCarthy MI, et al. 2015. Genome-wide association of polycystic ovary syndrome implicates alterations in gonadotropin secretion in European ancestry populations. *Nat. Commun.* 6:7502.
- He W, Barak Y, Hevener A, Olson P, Liao D, Le J, Nelson M, Ong E, Olefsky JM, et al. 2003. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:15712-15717.
- Heber MF, Ferreira SR, Abruzzese GA, Raices T, Pignataro OP, Vega M, Motta AB. 2019. Metformin improves ovarian insulin signaling alterations caused by fetal programming. *J. Endocrinol.* [Internet] 1. Available from: <https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/aop/joe-18-0520.xml>
- Heber MF, Ferreira SR, Vélez LM, Motta AB. 2013. Prenatal hyperandrogenism and lipid profile during different age stages: an experimental study. *Fertil. Steril.* 99:551-557.
- Helfer G, Wu Q-F. 2018. Chemerin: a multifaceted adipokine involved in metabolic disorders. *J. Endocrinol.* 238:R79-R94.
- Hines M. 2006. Prenatal testosterone and gender-related behaviour. *Eur. J. Endocrinol.* 155 Suppl 1:S115-121.
- Hiort O. 2013. The differential role of androgens in early human sex development. *BMC Med.* 11:152.

- Hogg K, Wood C, McNeilly AS, Duncan WC. 2011. The in utero programming effect of increased maternal androgens and a direct fetal intervention on liver and metabolic function in adult sheep. *PloS One* 6:e24877.
- Hosseinpahan F, Barzin M, Erfani H, Serahati S, Ramezani Tehrani F, Azizi F. 2014. Lipid accumulation product and insulin resistance in Iranian PCOS prevalence study. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 81:52-57.
- Hotchkiss AK, Lambright CS, Ostby JS, Parks-Saldutti L, Vandenberg JG, Gray LE. 2007. Prenatal testosterone exposure permanently masculinizes anogenital distance, nipple development, and reproductive tract morphology in female Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 96:335-345.
- Hsueh AJ. 1986. Paracrine mechanisms involved in granulosa cell differentiation. *Clin. Endocrinol. Metab.* 15:117-134.
- Hsueh AJW, Kawamura K, Cheng Y, Fauser BCJM. 2015. Intraovarian Control of Early Folliculogenesis. *Endocr. Rev.* 36:1-24.
- Huang R, Yue J, Sun Y, Zheng J, Tao T, Li S, Liu W. 2015. Increased serum chemerin concentrations in patients with polycystic ovary syndrome: Relationship between insulin resistance and ovarian volume. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 450:366-369.
- Hunzicker-Dunn M, Maizels ET. 2006. FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A. *Cell. Signal.* 18:1351-1359.
- Ishida M, Shimabukuro M, Yagi S, Nishimoto S, Kozuka C, Fukuda D, Soeki T, Masuzaki H, Tsutsui M, et al. 2014. MicroRNA-378 Regulates Adiponectin Expression in Adipose Tissue: A New Plausible Mechanism. *PLOS ONE* 9:e111537.
- Issemann I, Green S. 1990. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347:645-650.
- Jahanfar S, Eden JA, Warren P, Seppälä M, Nguyen TV. 1995. A twin study of polycystic ovary syndrome**Supported by The Academy of Finland, the University of Helsinki, the Nordisk Forsknings Kommitte and the Cancer Society of Finland (M.S.). *Fertil. Steril.* 63:478-486.
- James KC, Nicholls PJ, Roberts M. 1969. Biological half-lives of [4-14C]testosterone and some of its esters after injection into the rat. *J. Pharm. Pharmacol.* 21:24-27.
- Jamnongjit M, Hammes SR. 2006. Ovarian Steroids: The Good, the Bad, and the Signals that Raise Them. *Cell Cycle Georget. Tex* 5:1178-1183.
- Jawerbaum A, Capobianco E. 2011. Review: Effects of PPAR activation in the placenta and the fetus: implications in maternal diabetes. *Placenta* 32 Suppl 2:S212-217.
- Jenks MZ, Fairfield HE, Johnson EC, Morrison RF, Muday GK. 2017. Sex Steroid Hormones Regulate Leptin Transcript Accumulation and Protein Secretion in 3T3-L1 Cells. *Sci. Rep.* 7:8232.

- Johnson AL. 2003. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. *Anim. Reprod. Sci.* 78:185-201.
- Jones H, Sprung VS, Pugh CJA, Daousi C, Irwin A, Aziz N, Adams VL, Thomas EL, Bell JD, et al. 2012. Polycystic ovary syndrome with hyperandrogenism is characterized by an increased risk of hepatic steatosis compared to nonhyperandrogenic PCOS phenotypes and healthy controls, independent of obesity and insulin resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97:3709-3716.
- Jousilahti P, Vartiainen E, Tuomilehto J, Puska P. 1999. Sex, age, cardiovascular risk factors, and coronary heart disease: a prospective follow-up study of 14 786 middle-aged men and women in Finland. *Circulation* 99:1165-1172.
- Kabiri N, Tabandeh MR, Tabatabaie SRF. 2014. Beneficial effects of pioglitazone and metformin in murine model of polycystic ovaries via improvement of chemerin gene up-regulation. *DARU J. Pharm. Sci.* 22:39.
- Kahn HS. 2005. The «lipid accumulation product» performs better than the body mass index for recognizing cardiovascular risk: a population-based comparison. *BMC Cardiovasc. Disord.* 5:26.
- Kahsar-Miller MD, Conway-Myers BA, Boots LR, Azziz R. 2001. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in the ovaries of healthy women and those with polycystic ovary syndrome. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 185:1381-1387.
- Karamouti M, Kollia P, Kallitsaris A, Vamvakopoulos N, Kollios G, Messinis IE. 2009. Modulating effect of leptin on basal and follicle stimulating hormone stimulated steroidogenesis in cultured human lutein granulosa cells. *J. Endocrinol. Invest.* 32:415-419.
- Karim BO, Landolfi JA, Christian A, Ricart-Arbona R, Qiu W, McAlonis M, Eyabi PO, Khan KA, Dicello JF, et al. 2003. Estrous Cycle and Ovarian Changes in a Rat Mammary Carcinogenesis Model after Irradiation, Tamoxifen Chemoprevention, and Aging. *Comp. Med.* 53:532-538.
- Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, Quon MJ. 2000. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85:2402-2410.
- Kawano Y, Cohen DE. 2013. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Gastroenterol.* 48:434-441.
- Keller H, Givel F, Perroud M, Wahli W. 1995. Signaling cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor and estrogen receptor through estrogen response elements. *Mol. Endocrinol.* 9:794-804.
- Kendall NR, Gutierrez CG, Scaramuzzi RJ, Baird DT, Webb R, Campbell BK. 2004. Direct in vivo effects of leptin on ovarian steroidogenesis in sheep. *Reproduction* 128:757-765.
- Kim C-H, Jeon G-H, Kim S-R, Kim S-H, Chae H-D, Kang B-M. 2010. Effects of pioglitazone on ovarian stromal blood flow, ovarian stimulation, and in vitro fertilization outcome in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.* 94:236-241.

- Kim JB, Wright HM, Wright M, Spiegelman BM. 1998. ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:4333-4337.
- Kim JY, Xue K, Cao M, Wang Q, Liu J-Y, Leader A, Han JY, Tsang BK. 2013. Chemerin suppresses ovarian follicular development and its potential involvement in follicular arrest in rats treated chronically with dihydrotestosterone. *Endocrinology* 154:2912-2923.
- Kim WR, Flamm SL, Di Bisceglie AM, Bodenheimer HC, Public Policy Committee of the American Association for the Study of Liver Disease. 2008. Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease. *Hepatology*. Baltimore, MD 47:1363-1370.
- Kitawaki J, Kusuki I, Koshiba H, Tsukamoto K, Honjo H. 1999. Leptin directly stimulates aromatase activity in human luteinized granulosa cells. *Mol. Hum. Reprod.* 5:708-713.
- Kjerulff LE, Sanchez-Ramos L, Duffy D. 2011. Pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome: a metaanalysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 204:558.e1-6.
- Kjøtrød SB, Carlsen SM, Rasmussen PE, Holst-Larsen T, Mellembakken J, Thurin-Kjellberg A, Haapaniemi-Kouru K, Morin-Papunen L, Humaidan P, et al. 2011. Use of metformin before and during assisted reproductive technology in non-obese young infertile women with polycystic ovary syndrome: a prospective, randomized, double-blind, multi-centre study. *Hum. Reprod.* 26:2045-2053.
- Komar CM. 2005. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and ovarian function – implications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue remodeling. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3:41.
- Komar CM, Braissant O, Wahli W, Jr C, E T. 2001. Expression and Localization of PPARs in the Rat Ovary During Follicular Development and the Perioovulatory Period. *Endocrinology* 142:4831-4838.
- Koo Y-A, Shin S-Y, Yoon B-K, Choi D. 2007. Pioglitazone for treating polycystic ovary syndrome in non-obese women of reproductive age with different clinical presentations. *Gynecol. Endocrinol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Endocrinol.* 23:461-467.
- Kort DH, Kostolias A, Sullivan C, Lobo RA. 2015. Chemerin as a marker of body fat and insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol. Endocrinol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Endocrinol.* 31:152-155.
- Kottronen A, Yki-Järvinen H. 2008. Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28:27-38.
- Lacau de Mengido I, Becú-Villalobos D, Libertun C. 1987. Sexual differences in the dopaminergic control of luteinizing hormone secretion in the developing rat. *Dev. Brain Res.* 35:91-95.
- Lacau-Mengido IM, Libertun C, Becú-Villalobos D. 1996. Different Serotonin Receptor Types Participate in 5-Hydroxytryptophan-Induced Gonadotropins and Prolactin Release in the Female Infantile Rat. *Neuroendocrinology* 63:415-421.

- Ladrón de Guevara A, Fux-Otta C, Crisosto N, Szafryk de Mereshian P, Echiburú B, Iraci G, Perez-Bravo F, Sir-Petermann T. 2014. Metabolic profile of the different phenotypes of polycystic ovary syndrome in two Latin American populations. *Fertil. Steril.* 101:1732-1739.e1-2.
- Lai W-A, Yeh Y-T, Lee M-T, Wu L-S, Ke F-C, Hwang J-J. 2013. Ovarian granulosa cells utilize scavenger receptor SR-BI to evade cellular cholesterol homeostatic control for steroid synthesis. *J. Lipid Res.* 54:365-378.
- Lara HE, Dissen GA, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler JL, Ojeda SR. 2000. An Increased Intraovarian Synthesis of Nerve Growth Factor and Its Low Affinity Receptor Is a Principal Component of Steroid-Induced Polycystic Ovary in the Rat. 141:14.
- Lebbe M, Woodruff TK. 2013. Involvement of androgens in ovarian health and disease. *Mol. Hum. Reprod.* 19:828-837.
- Ledoux S, Campos DB, Lopes FL, Dobias-Goff M, Palin M-F, Murphy BD. 2006. Adiponectin Induces Periovulatory Changes in Ovarian Follicular Cells. *Endocrinology* 147:5178-5186.
- Legro RS, Finegood D, Dunaif A. 1998. A fasting glucose to insulin ratio is a useful measure of insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83:2694-2698.
- Legro RS, Kusanman AR, Dodson WC, Dunaif A. 1999. Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84:165-169.
- Lin Z, Cai F, Lin N, Ye J, Zheng Q, Ding G. 2014. Effects of glutamine on oxidative stress and nuclear factor- κ B expression in the livers of rats with nonalcoholic fatty liver disease. *Exp. Ther. Med.* 7:365-370.
- Liu L, Yin T-L, Chen Y, Li Y, Yin L, Ding J, Yang J, Feng H-L. 2019. Follicular dynamics of glycerophospholipid and sphingolipid metabolisms in polycystic ovary syndrome patients. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 185:142-149.
- Lovekamp-Swan T, Jetten AM, Davis BJ. 2003. Dual activation of PPAR α and PPAR γ by mono-(2-ethylhexyl) phthalate in rat ovarian granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 201:133-141.
- Lucas A. 1991. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found. Symp.* 156:38-50; discussion 50-55.
- da Luz PL, Favarato D, Faria-Neto JR, Lemos P, Chagas ACP. 2008. High ratio of triglycerides to HDL-cholesterol predicts extensive coronary disease. *Clin. Sao Paulo Braz.* 63:427-432.
- Macut D, Božić-Antić I, Bjekić-Macut J, Tziomalos K. 2017. MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Polycystic ovary syndrome and nonalcoholic fatty liver disease. *Eur. J. Endocrinol.* 177:R145-R158.
- Maliqueo M, Sir-Petermann T, Pérez V, Echiburú B, de Guevara AL, Gálvez C, Crisosto N, Azziz R. 2009. Adrenal function during childhood and puberty in daughters of women with polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94:3282-3288.

- Manikkam M, Steckler TL, Welch KB, Inskeep EK, Padmanabhan V. 2006. Fetal programming: prenatal testosterone treatment leads to follicular persistence/luteal defects; partial restoration of ovarian function by cyclic progesterone treatment. *Endocrinology* 147:1997-2007.
- Mao J, DeMayo FJ, Li H, Abu-Elheiga L, Gu Z, Shaikenov TE, Kordari P, Chirala SS, Heird WC, et al. 2006. Liver-specific deletion of acetyl-CoA carboxylase 1 reduces hepatic triglyceride accumulation without affecting glucose homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:8552-8557.
- Marino L, Jornayvaz FR. 2015. Endocrine causes of nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol. WJG* 21:11053-11076.
- Martinez Calejman C, Astort F, Di Gruccio JM, Repetto EM, Mercau M, Giordanino E, Sanchez R, Pignataro O, Arias P, et al. 2011. Lipopolysaccharide stimulates adrenal steroidogenesis in rodent cells by a NFkB-dependent mechanism involving COX-2 activation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 337:1-6.
- Martínez-García MÁ, Montes-Nieto R, Fernández-Durán E, Insenser M, Luque-Ramírez M, Escobar-Morreale HF. 2013. Evidence for masculinization of adipokine gene expression in visceral and subcutaneous adipose tissue of obese women with polycystic ovary syndrome (PCOS). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98:E388-396.
- Martos-Moreno GÁ, Chowen JA, Argente J. 2010. Metabolic signals in human puberty: Effects of over and undernutrition. *Mol. Cell. Endocrinol.* 324:70-81.
- Mason HD, Willis DS, Beard RW, Winston RM, Margara R, Franks S. 1994. Estradiol production by granulosa cells of normal and polycystic ovaries: relationship to menstrual cycle history and concentrations of gonadotropins and sex steroids in follicular fluid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79:1355-1360.
- Matsuda S, Kobayashi M, Kitagishi Y. 2013. Expression and Function of PPARs in Placenta. *PPAR Res.* [Internet] 2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3583145/>
- Mattern A, Zellmann T, Beck-Sickinger AG. 2014. Processing, signaling, and physiological function of chemerin: Processing, Signaling, and Physiological Function of Chemerin. *IUBMB Life* 66:19-26.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28:412-419.
- McCarthy M, McCarthy MM. 2011. Sex and the Developing Brain. Morgan & Claypool Publishers.
- McCutcheon JE, Marinelli M. 2009. Age matters. *Eur. J. Neurosci.* 29:997-1014.
- Mcgee EA, Hsueh AJW. 2000. Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles. 21:15.
- McLaughlin T, Reaven G, Abbasi F, Lamendola C, Saad M, Waters D, Simon J, Krauss RM. 2005. Is there a simple way to identify insulin-resistant individuals at increased risk of cardiovascular disease? *Am. J. Cardiol.* 96:399-404.

- Melo AS, Ferriani RA, Navarro PA. 2015. Treatment of infertility in women with polycystic ovary syndrome: approach to clinical practice. *Clinics* 70:765-769.
- Michalakakis KG, Segars JH. 2010. The role of adiponectin in reproduction: from polycystic ovary syndrome to assisted reproduction. *Fertil. Steril.* 94:1949-1957.
- Michaliszyn SF, Lee S, Tfayli H, Arslanian S. 2013. Polycystic ovary syndrome and nonalcoholic fatty liver in obese adolescents: association with metabolic risk profile. *Fertil. Steril.* 100:1745-1751.
- Miettinen HE, Rayburn H, Krieger M. 2001. Abnormal lipoprotein metabolism and reversible female infertility in HDL receptor (SR-BI)-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 108:1717-1722.
- Mikaeili S, Rashidi BH, Safa M, Najafi A, Sobhani A, Asadi E, Abbasi M. 2016. Altered FoxO3 expression and apoptosis in granulosa cells of women with polycystic ovary syndrome. *Arch. Gynecol. Obstet.* 294:185-192.
- Millán J, Pintó X, Muñoz A, Zúñiga M, Rubiés-Prat J, Pallardo LF, Masana L, Mangas A, Hernández-Mijares A, et al. 2009. Lipoprotein ratios: Physiological significance and clinical usefulness in cardiovascular prevention. *Vasc. Health Risk Manag.* 5:757-765.
- Miller WL. 2017. Disorders in the initial steps of steroid hormone synthesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 165:18-37.
- Miller WL, Auchus RJ. 2011. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr. Rev.* 32:81-151.
- Miller WL, Bose HS. 2011. Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. *J. Lipid Res.* 52:2111-2135.
- Minge CE, Robker RL, Norman RJ. 2008a. PPAR Gamma: Coordinating Metabolic and Immune Contributions to Female Fertility. *PPAR Res.* [Internet] 2008. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2246065/>
- Minge CE, Robker RL, Norman RJ. 2008b. PPAR Gamma: Coordinating Metabolic and Immune Contributions to Female Fertility. *PPAR Res.* [Internet]. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ppar/2008/243791/>
- Miranda JJ, Herrera VM, Chirinos JA, Gómez LF, Perel P, Pichardo R, González A, Sánchez JR, Ferreccio C, et al. 2013. Major Cardiovascular Risk Factors in Latin America: A Comparison with the United States. The Latin American Consortium of Studies in Obesity (LASO). *PLOS ONE* 8:e54056.
- Mircea CN, Lujan ME, Pierson RA. 2007. Metabolic Fuel and Clinical Implications for Female Reproduction. *J. Obstet. Gynaecol. Can.* 29:887-902.
- Mirzaei K, Hossein-nezhad A, Keshavarz SA, Koohdani F, Saboor-Yaraghi AA, Hosseini S, Eshraghian MR, Djalali M. 2013. Crosstalk between circulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma, adipokines and metabolic syndrome in obese subjects. *Diabetol. Metab. Syndr.* 5:79.
- Mitchell M, Armstrong DT, Robker RL, Norman RJ. 2005. Adipokines: implications for female fertility and obesity. *Reproduction* 130:583-597.

- Mitropoulos G., Scurry J., Cussen L. 2008. Organ weight/bodyweight ratios: Growth rates of fetal organs in the latter half of pregnancy with a simple method for calculating mean organ weights. *J. Paediatr. Child Health* 28:236-239.
- Mohammad MB, Seghinsara AM. 2017. Polycystic Ovary Syndrome (PCOS), Diagnostic Criteria, and AMH. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 18:17-21.
- Mohsen IA. 2012. A randomized controlled trial of the effect of rosiglitazone and clomiphene citrate versus clomiphene citrate alone in overweight/obese women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol. Endocrinol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Endocrinol.* 28:269-272.
- Molyneaux KA, Stallock J, Schaible K, Wylie C. 2001. Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration. *Dev. Biol.* 240:488-498.
- Moran LJ, Misso ML, Wild RA, Norman RJ. 2010. Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update* 16:347-363.
- Motta AB. 2010. Dehydroepiandrosterone to induce murine models for the study of polycystic ovary syndrome. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 119:105-111.
- Motta AB. 2012. The role of obesity in the development of polycystic ovary syndrome. *Curr. Pharm. Des.* 18:2482-2491.
- Muruganandan S, Parlee SD, Rourke JL, Ernst MC, Goralski KB, Sinal CJ. 2011. Chemerin, a Novel Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ) Target Gene That Promotes Mesenchymal Stem Cell Adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 286:23982-23995.
- Nascimento JXPT, Chein MB da C, de Sousa RML, Ferreira A dos S, Navarro PA, Brito LMO. 2015. Importance of lipid accumulation product index as a marker of CVD risk in PCOS women. *Lipids Health Dis.* 14:62.
- Noroozzadeh M, Behboudi-Gandevani S, Zadeh-Vakili A, Ramezani Tehrani F. 2017. Hormone-induced rat model of polycystic ovary syndrome: A systematic review. *Life Sci.* 191:259-272.
- Nuñez SB, Medin JA, Braissant O, Kemp L, Wahli W, Ozato K, Segars JH. 1997. Retinoid X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor activate an estrogen responsive gene independent of the estrogen receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 127:27-40.
- Oh J-Y, Sung Y-A, Lee HJ. 2013. The visceral adiposity index as a predictor of insulin resistance in young women with polycystic ovary syndrome. *Obes. Silver Spring Md* 21:1690-1694.
- Ortega HH, Rey F, Velazquez MML, Padmanabhan V. 2010. Developmental Programming: Effect of Prenatal Steroid Excess on Intraovarian Components of Insulin Signaling Pathway and Related Proteins in Sheep. *Biol. Reprod.* 82:1065-1075.
- Padmanabhan V, Cardoso RC, Puttabyatappa M. 2016. Developmental Programming, a Pathway to Disease. *Endocrinology* 157:1328-1340.

- Padmanabhan V, Salvetti NR, Matiller V, Ortega HH. 2014. Developmental programming: prenatal steroid excess disrupts key members of intraovarian steroidogenic pathway in sheep. *Endocrinology* 155:3649-3660.
- Padmanabhan V, Veiga-Lopez A. 2013. Animal models of the polycystic ovary syndrome phenotype. *Steroids* 78:734-740.
- Paixão L, Ramos RB, Lavarda A, Morsh DM, Spritzer PM. 2017. Animal models of hyperandrogenism and ovarian morphology changes as features of polycystic ovary syndrome: a systematic review. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE [Internet]* 15. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5301391/>
- Pan J-X, Zhang J-Y, Ke Z-H, Wang F-F, Barry JA, Hardiman PJ, Qu F. 2015. Androgens as double-edged swords: Induction and suppression of follicular development. *Horm. Athens Greece* 14:190-200.
- Pan M, Cederbaum AI, Zhang Y-L, Ginsberg HN, Williams KJ, Fisher EA. 2004. Lipid peroxidation and oxidant stress regulate hepatic apolipoprotein B degradation and VLDL production. *J. Clin. Invest.* 113:1277-1287.
- Park J-H, Kim S-H, Park S, Park MJ. 2014. Alanine aminotransferase and metabolic syndrome in adolescents: the Korean National Health and Nutrition Examination Survey Study. *Pediatr. Obes.* 9:411-418.
- Paschos P, Paletas K. 2009. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia* 13:9-19.
- Penzias A, Bendikson K, Butts S, Coutifaris C, Falcone T, Fossum G, Gitlin S, Gracia C, Hansen K, et al. 2017. Role of metformin for ovulation induction in infertile patients with polycystic ovary syndrome (PCOS): a guideline. *Fertil. Steril.* 108:426-441.
- Pepling ME, Spradling AC. 2001. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Dev. Biol.* 234:339-351.
- Phoenix CH, Goy RW, Gerall AA, Young WC. 1959. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology* 65:369-382.
- Rajah R, Glaser EM, Hirshfield AN. 1992. The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis. *Dev. Dyn.* 194:177-192.
- Raju GAR, Chavan R, Deenadayal M, Gunasheela D, Gutgutia R, Haripriya G, Govindarajan M, Patel NH, Patki AS. 2013. Luteinizing hormone and follicle stimulating hormone synergy: A review of role in controlled ovarian hyper-stimulation. *J. Hum. Reprod. Sci.* 6:227-234.
- Ramezani Tehrani F, Minoos S, Azizi F. 2014. Comparison of various adiposity indexes in women with polycystic ovary syndrome and normo-ovulatory non-hirsute women: a population-based study. *Eur. J. Endocrinol.* 171:199-207.
- Regueira E, Dávila C, Hermida GN. 2016. Morphological Changes in Skin Glands During Development in *Rhinella Arenarum* (Anura: Bufonidae). *Anat. Rec. Hoboken NJ* 2007 299:141-156.

- Reverchon M, Bertoldo MJ, Ramé C, Froment P, Dupont J. 2014a. CHEMERIN (RARRES2) Decreases In Vitro Granulosa Cell Steroidogenesis and Blocks Oocyte Meiotic Progression in Bovine Species. *Biol. Reprod.* [Internet] 90. Available from: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/90/5/102, 1-15/2514299>
- Reverchon M, Cornuau M, Ramé C, Guerif F, Royère D, Dupont J. 2012. Chemerin inhibits IGF-1-induced progesterone and estradiol secretion in human granulosa cells. *Hum. Reprod.* 27:1790-1800.
- Reverchon M, Ramé C, Bertoldo M, Dupont J. 2014b. Adipokines and the Female Reproductive Tract. *Int. J. Endocrinol.* [Internet]. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ije/2014/232454/>
- Roland AV, Nunemaker CS, Keller SR, Moenter SM. 2010. Prenatal androgen exposure programs metabolic dysfunction in female mice. *J. Endocrinol.* 207:213-223.
- Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. 2004. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.* 81:19-25.
- Rubinstein AL, Irazola VE, Calandrelli M, Elorriaga N, Gutierrez L, Lanas F, Manfredi JA, Mores N, Olivera H, et al. 2015. Multiple cardiometabolic risk factors in the Southern Cone of Latin America: a population-based study in Argentina, Chile, and Uruguay. *Int. J. Cardiol.* 183:82-88.
- Ryan BC, Vandenbergh JG. 2002. Intrauterine position effects. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26:665-678.
- Saffery R, Novakovic B. 2014. Epigenetics as the mediator of fetal programming of adult onset disease: what is the evidence? *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 93:1090-1098.
- Salazar MR, Carbajal HA, Espeche WG, Leiva Sisniegues CE, Balbín E, Dulbecco CA, Aizpurúa M, Marillet AG, Reaven GM. 2012. Relation among the plasma triglyceride/high-density lipoprotein cholesterol concentration ratio, insulin resistance, and associated cardio-metabolic risk factors in men and women. *Am. J. Cardiol.* 109:1749-1753.
- Sander VA, Hapon MB, Sícario L, Lombardi EP, Jahn GA, Motta AB. 2011. Alterations of folliculogenesis in women with polycystic ovary syndrome. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 124:58-64.
- Savage DB, Choi CS, Samuel VT, Liu Z-X, Zhang D, Wang A, Zhang X-M, Cline GW, Yu XX, et al. 2006. Reversal of diet-induced hepatic steatosis and hepatic insulin resistance by antisense oligonucleotide inhibitors of acetyl-CoA carboxylases 1 and 2. *J. Clin. Invest.* 116:817-824.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9:671-675.
- Schwimmer JB, Khorram O, Chiu V, Schwimmer WB. 2005. Abnormal aminotransferase activity in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.* 83:494-497.

- Scotti L, Parborell F, Irusta G, De Zuñiga I, Bisioli C, Pettorossi H, Tesone M, Abramovich D. 2014. Platelet-derived growth factor BB and DD and angiopoietin1 are altered in follicular fluid from polycystic ovary syndrome patients. *Mol. Reprod. Dev.* 81:748-756.
- Seldin MF, Tian C, Shigeta R, Scherbarth HR, Silva G, Belmont JW, Kittles R, Gamron S, Allevi A, et al. 2007. Argentine population genetic structure: large variance in Amerindian contribution. *Am. J. Phys. Anthropol.* 132:455-462.
- Seli E, Duleba AJ. 2004. Treatment of PCOS with metformin and other insulin-sensitizing agents. *Curr. Diab. Rep.* 4:69-75.
- Sengupta P. 2013. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int. J. Prev. Med.* 4:624-630.
- Shi Y, Zhao H, Shi Y, Cao Y, Yang D, Li Z, Zhang B, Liang X, Li T, et al. 2012. Genome-wide association study identifies eight new risk loci for polycystic ovary syndrome. *Nat. Genet.* 44:1020-1025.
- Sibley C, Glazier J, D'Souza S. 1997. Placental transporter activity and expression in relation to fetal growth. *Exp. Physiol.* 82:389-402.
- Simitsidellis I, Saunders PTK, Gibson DA. 2018. Androgens and endometrium: New insights and new targets. *Mol. Cell. Endocrinol.* 465:48-60.
- Siniawski DA, Mason W, Sorroche P, Casañas L, Kraus J, Cagide A. 2011. Correlación entre las razones apolipoproteína B/apolipoproteína A1 y colesterol total/colesterol-HDL en una población saludable: ¿debería actualizarse el índice de Castelli? *Rev. Argent. Cardiol.* 79:0-0.
- Sirmans SM, Pate KA. 2013. Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome. *Clin. Epidemiol.* 6:1-13.
- Sir-Petermann T, Codner E, Maliqueo M, Echiburú B, Hitschfeld C, Crisosto N, Pérez-Bravo F, Recabarren SE, Cassorla F. 2006. Increased anti-Müllerian hormone serum concentrations in prepubertal daughters of women with polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91:3105-3109.
- Sir-Petermann T, Codner E, Pérez V, Echiburú B, Maliqueo M, Ladrón de Guevara A, Preisler J, Crisosto N, Sánchez F, et al. 2009. Metabolic and reproductive features before and during puberty in daughters of women with polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94:1923-1930.
- Skov V, Glinborg D, Knudsen S, Jensen T, Kruse TA, Tan Q, Brusgaard K, Beck-Nielsen H, Højlund K. 2007. Reduced expression of nuclear-encoded genes involved in mitochondrial oxidative metabolism in skeletal muscle of insulin-resistant women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 56:2349-2355.
- Skov V, Glinborg D, Knudsen S, Tan Q, Jensen T, Kruse TA, Beck-Nielsen H, Højlund K. 2008. Pioglitazone Enhances Mitochondrial Biogenesis and Ribosomal Protein Biosynthesis in Skeletal Muscle in Polycystic Ovary Syndrome. *PLOS ONE* 3:e2466.
- Smith SA. 2002. Peroxisome proliferator-activated receptors and the regulation of mammalian lipid metabolism. *Biochem. Soc. Trans.* 30:1086-1090.

- Sotomayor-Zarate R, Cruz G, Renard GM, Espinosa P, Ramirez VD. 2014. Sex hormones and brain dopamine functions. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* 14:62-71.
- Sotomayor-Zárate R, Tiszavari M, Cruz G, Lara HE. 2011. Neonatal exposure to single doses of estradiol or testosterone programs ovarian follicular development-modified hypothalamic neurotransmitters and causes polycystic ovary during adulthood in the rat. *Fertil. Steril.* 96:1490-1496.
- Spear LP. 2000. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24:417-463.
- Spritzer PM, Lecke SB, Satler F, Morsch DM. 2015. Adipose tissue dysfunction, adipokines, and low-grade chronic inflammation in polycystic ovary syndrome. *Reprod. Camb. Engl.* 149:R219-227.
- Strable MS, Ntambi JM. 2010. Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 45:199-214.
- Strauss JF. 2019. Organization of Ovarian Steroidogenic Cells and Cholesterol Metabolism. En: *The Ovary.* Elsevier. p 83-94. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128132098000054>
- Sullivan SD, Moenter SM. 2004. Prenatal androgens alter GABAergic drive to gonadotropin-releasing hormone neurons: implications for a common fertility disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:7129-7134.
- Sun M, Maliqueo M, Benrick A, Johansson J, Shao R, Hou L, Jansson T, Wu X, Stener-Victorin E. 2012. Maternal androgen excess reduces placental and fetal weights, increases placental steroidogenesis, and leads to long-term health effects in their female offspring. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 303:E1373-E1385.
- Tan BK, Chen J, Farhatullah S, Adya R, Kaur J, Heutling D, Lewandowski KC, O'Hare JP, Lehnert H, et al. 2009. Insulin and metformin regulate circulating and adipose tissue chemerin. *Diabetes* 58:1971-1977.
- Tan S, Bechmann LP, Benson S, Dietz T, Eichner S, Hahn S, Janssen OE, Lahner H, Gerken G, et al. 2010. Apoptotic markers indicate nonalcoholic steatohepatitis in polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95:343-348.
- Tang M, Huang C, Wang Y-F, Ren P-G, Chen L, Xiao T-X, Wang B-B, Pan Y-F, Tsang BK, et al. 2016. CMKLR1 deficiency maintains ovarian steroid production in mice treated chronically with dihydrotestosterone. *Sci. Rep.* 6:21328.
- Tehrani FR, Noroozzadeh M, Zahediasl S, Piryaee A, Azizi F. 2014. Introducing a rat model of prenatal androgen-induced polycystic ovary syndrome in adulthood: Prenatal testosterone and rat model of polycystic ovary syndrome. *Exp. Physiol.* 99:792-801.
- Tietze F. 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27:502-522.
- Tilg H, Moschen AR. 2010. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatol. Baltim. Md* 52:1836-1846.

- Torchen LC. 2017. Cardiometabolic Risk in PCOS: More than a Reproductive Disorder. *Curr. Diab. Rep.* 17:137.
- Torre SD, Benedusi V, Fontana R, Maggi A. 2014. Energy metabolism and fertility—a balance preserved for female health. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10:13-23.
- Tyagi S, Gupta P, Saini AS, Kaushal C, Sharma S. 2011. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 2:236-240.
- Vassilatou E. 2014. Nonalcoholic fatty liver disease and polycystic ovary syndrome. *World J. Gastroenterol.* WJG 20:8351-8363.
- Vassilatou E, Lafoyianni S, Vryonidou A, Ioannidis D, Kosma L, Katsoulis K, Papavassiliou E, Tzavara I. 2010. Increased androgen bioavailability is associated with non-alcoholic fatty liver disease in women with polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 25:212-220.
- Veiga-Lopez A, Moeller J, Abbott DH, Padmanabhan V. 2016. Developmental programming: rescuing disruptions in preovulatory follicle growth and steroidogenesis from prenatal testosterone disruption. *J. Ovarian Res.* 9:39.
- Veiga-Lopez A, Moeller J, Patel D, Ye W, Pease A, Kinns J, Padmanabhan V. 2013. Developmental programming: impact of prenatal testosterone excess on insulin sensitivity, adiposity, and free fatty acid profile in postpubertal female sheep. *Endocrinology* 154:1731-1742.
- Veldhuis JD, Zhang G, Garmey JC. 2002. Troglitazone, an Insulin-Sensitizing Thiazolidinedione, Represses Combined Stimulation by LH and Insulin of de Novo Androgen Biosynthesis by Thecal Cells in Vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87:1129-1133.
- Velez LM, Abruzzese GA, Heber MF, Ferreira SR, Motta AB. 2018. Treatment with the synthetic PPAR γ ligand pioglitazone ameliorates early ovarian alterations induced by dehydroepiandrosterone in prepubertal rats. *Pharmacol. Rep.* PR 71:96-104.
- Vélez LM, Abruzzese GA, Motta AB. 2013. The biology of the peroxisome proliferator-activated receptor system in the female reproductive tract. *Curr. Pharm. Des.* 19:4641-4646.
- Velez LM, Heber MF, Ferreira SR, Abruzzese GA, Reynoso RM, Motta AB. 2015. Effect of hyperandrogenism on ovarian function. *Reproduction* 149:577-585.
- Vitti M, Di Emidio G, Di Carlo M, Carta G, Antonosante A, Artini PG, Cimini A, Tatone C, Benedetti E. 2016. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Female Reproduction and Fertility. *PPAR Res.* [Internet] 2016. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4983391/>
- Wakil SJ, Abu-Elheiga LA. 2009. Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *J. Lipid Res.* 50:S138-S143.
- Walker DM, Gore AC. 2011. Transgenerational neuroendocrine disruption of reproduction. *Nat. Rev. Endocrinol.* 7:197-207.

- Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ. 2012. Rodent models for human polycystic ovary syndrome. *Biol. Reprod.* 86:149, 1-12.
- Wang L, Menon KMJ. 2005. Regulation of Luteinizing Hormone/Chorionic Gonadotropin Receptor Messenger Ribonucleic Acid Expression in the Rat Ovary: Relationship to Cholesterol Metabolism. *Endocrinology* 146:423-431.
- Wang L, Shao YY, Ballock RT. 2012a. Leptin Antagonizes Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Signaling in Growth Plate Chondrocytes. *PPAR Res.* [Internet] 2012. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3458404/>
- Wang L, Zhong Y, Ding Y, Shi X, Huang J, Zhu F. 2014. Elevated serum chemerin in Chinese women with hyperandrogenic PCOS. *Gynecol. Endocrinol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Endocrinol.* 30:746-750.
- Wang Q, Kim JY, Xue K, Liu J, Leader A, Tsang BK. 2012b. Chemerin, a Novel Regulator of Follicular Steroidogenesis and Its Potential Involvement in Polycystic Ovarian Syndrome. *Endocrinology* 153:5600-5611.
- Wang Q, Leader A, Tsang BK. 2013. Inhibitory Roles of Prohibitin and Chemerin in FSH-Induced Rat Granulosa Cell Steroidogenesis. *Endocrinology* 154:956-967.
- Weisz J, Ward IL. 1980. Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. *Endocrinology* 106:306-316.
- Wild RA. 2012. Dyslipidemia in PCOS. *Steroids* 77:295-299.
- Wild RA, Carmina E, Diamanti-Kandarakis E, Dokras A, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Lobo R, Norman RJ, Talbott E, et al. 2010. Assessment of cardiovascular risk and prevention of cardiovascular disease in women with the polycystic ovary syndrome: a consensus statement by the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome (AE-PCOS) Society. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95:2038-2049.
- Willis DS, Watson H, Mason HD, Galea R, Brincat M, Franks S. 1998. Premature Response to Luteinizing Hormone of Granulosa Cells from Anovulatory Women with Polycystic Ovary Syndrome: Relevance to Mechanism of Anovulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83:3984-3991.
- Wiltgen D, Benedetto IG, Mastella LS, Spritzer PM. 2009. Lipid accumulation product index: a reliable marker of cardiovascular risk in polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 24:1726-1731.
- Wolf CJ. 2002. Effects of Prenatal Testosterone Propionate on the Sexual Development of Male and Female Rats: A Dose-Response Study. *Toxicol. Sci.* 65:71-86.
- Wood JR, Strauss JF. 2002. Multiple signal transduction pathways regulate ovarian steroidogenesis. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 3:33-46.
- Woodruff TK, Lyon RJ, Hansen SE, Rice GC, Mather JP. 1990. Inhibin and activin locally regulate rat ovarian folliculogenesis. *Endocrinology* 127:3196-3205.

- Wu X-Y, Li Z-L, Wu C-Y, Liu Y-M, Lin H, Wang S-H, Xiao W-F. 2010. Endocrine Traits of Polycystic Ovary Syndrome in Prenatally Androgenized Female Sprague-Dawley Rats. *Endocr. J.* 57:201-209.
- Xie L, Boyle D, Sanford D, Scherer PE, Pessin JE, Mora S. 2006. Intracellular trafficking and secretion of adiponectin is dependent on GGA-coated vesicles. *J. Biol. Chem.* 281:7253-7259.
- Xie L, O'Reilly CP, Chapes SK, Mora S. 2008. Adiponectin and Leptin are Secreted Through Distinct Trafficking Pathways in Adipocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1782:99-108.
- Xu N, Taylor KD, Azziz R, Goodarzi MO. 2010. Variants in the HMG-CoA Reductase (HMGCR) Gene Influence Component Phenotypes in Polycystic Ovary Syndrome. *Fertil. Steril.* 94:255-60.e1-2.
- Xu S, Linher-Melville K, Yang BB, Wu D, Li J. 2011. Micro-RNA378 (miR-378) Regulates Ovarian Estradiol Production by Targeting Aromatase. *Endocrinology* 152:3941-3951.
- Yan X, Dai X, Wang J, Zhao N, Cui Y, Liu J. 2013. Prenatal androgen excess programs metabolic derangements in pubertal female rats. *J. Endocrinol.* 217:119-129.
- Yan X, Yuan C, Zhao N, Cui Y, Liu J. 2014. Prenatal androgen excess enhances stimulation of the GnRH pulse in pubertal female rats. *J. Endocrinol.* 222:73-85.
- Yanase T, Mu YM, Nishi Y, Goto K, Nomura M, Okabe T, Takayanagi R, Nawata H. 2001. Regulation of aromatase by nuclear receptors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 79:187-192.
- Yang S, Wang Q, Huang W, Song Y, Feng G, Zhou L, Tan J. 2016. Are serum chemerin levels different between obese and non-obese polycystic ovary syndrome women? *Gynecol. Endocrinol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Endocrinol.* 32:38-41.
- Yang X, Quan X, Lan Y, Wei Q, Ye J, Yin X, Ji Z, Xing H, Yang Y. 2018. Serum chemerin level in women with PCOS and its relation with the risk of spontaneous abortion. *Gynecol. Endocrinol. Off. J. Int. Soc. Gynecol. Endocrinol.* 34:864-867.
- Ye F, Than A, Zhao Y, Goh KH, Chen P. 2010. Vesicular storage, vesicle trafficking, and secretion of leptin and resistin: the similarities, differences, and interplays. *J. Endocrinol.* 206:27-36.
- Zhang W, Sun Q, Zhong W, Sun X, Zhou Z. 2016. Hepatic peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling contributes to alcohol-induced hepatic steatosis and inflammation in mice. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 40:988-999.
- Zhao Y, Qiao J. 2013. Ethnic differences in the phenotypic expression of polycystic ovary syndrome. *Steroids* 78:755-760.
- Zielinski WJ, Vandenberg JG, Montano MM. 1991. Effects of social stress and intrauterine position on sexual phenotype in wild-type house mice (*Mus musculus*). *Physiol. Behav.* 49:117-123.