

Tesis Doctoral

Mecanismos moleculares asociados a insulino resistencia en distintos tejidos en un modelo de programación fetal. Acción de la metformina como tratamiento

Heber, María Florencia

2019

Este documento forma parte de las colecciones digitales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en bibliotecadigital.exactas.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

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

Cita tipo APA:

Heber, María Florencia. (2019). Mecanismos moleculares asociados a insulino resistencia en distintos tejidos en un modelo de programación fetal. Acción de la metformina como tratamiento. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6646_Heber

Cita tipo Chicago:

Heber, María Florencia. "Mecanismos moleculares asociados a insulino resistencia en distintos tejidos en un modelo de programación fetal. Acción de la metformina como tratamiento". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2019.
https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6646_Heber

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento Química Biológica

**Mecanismos moleculares asociados a insulino resistencia en
distintos tejidos en un modelo de programación fetal. Acción de la
metformina como tratamiento**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área de Ciencias Biológicas

Lic. María Florencia Heber

Director de tesis: Dra. Alicia Beatriz Motta

Consejero de Estudios: Dra. Cecilia Varone

Lugar de trabajo: Laboratorio de Fisiopatología ovárica, Centro de Estudios
Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos
Aires

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2019

“Mecanismos moleculares asociados a insulino resistencia en distintos tejidos en un modelo de programación fetal. Acción de la metformina como tratamiento”

Resumen

La insulino resistencia se define como la baja habilidad de la insulina para ejercer sus acciones metabólicas. Se sabe que este estado metabólico alterado es capaz de afectar a los tejidos de manera diferente.

El período prenatal es un momento crítico del desarrollo en el cual el feto es vulnerable a alteraciones en el ambiente materno que predisponen al desarrollo de patologías durante la vida adulta. Con un modelo murino de programación fetal por exceso de andrógenos hemos logrado emular en ratas adultas características de tipo síndrome de ovario poliquístico, dando dos fenotipos característicos uno ovulatorio irregular y otro anovulatorio. Estos dos fenotipos presentan un estado metabólico alterado caracterizado por una hiperglucemia, hiperinsulinemia e insulino resistencia sérica; y una insulino resistencia hepática que afecta tanto el metabolismo de la glucosa como la lipogénesis.

A su vez encontramos alteraciones en la vía de señalización de la insulina en el ovario de manera fenotipo dependiente; estas alteraciones conllevan a una disminución de la respuesta metabólica a la insulina que es capaz de comprometer la fisiología del ovario y que se traduce en las alteraciones ovulatorias encontradas. Estas alteraciones encontradas tanto a nivel metabólico como reproductivo son reversibles a distintos niveles luego de un tratamiento con metformina.

Palabras claves: insulino resistencia; programación fetal; síndrome de ovario poliquístico; señalización insulina; metformina.

“Molecular mechanisms of insulin resistance caused by fetal programming. Metformin action as treatment”.

Abstract

Insulin resistance has been defined the decreased ability of insulin to mediate its metabolic actions resulting in a requirement for increased amounts of insulin to achieve a given metabolic action. It is known that this altered metabolic state affects tissues differently.

It is well known that alterations in fetal nutrition and endocrine status result in developmental adaptations that permanently change the structure, physiology and metabolism of the fetus, predisposing to disease during the adult life. Using a murine model of fetal programming by androgen excess, we have been able to emulate polycystic ovarian syndrome traits in adult rats, giving two characteristic phenotypes: irregular ovulatory and anovulatory.

These two phenotypes present an altered metabolic state characterized by hyperglycemia, hyperinsulinemia and insulin resistance; and hepatic insulin resistance, with an altered insulin signaling pathway that affects both glucose metabolism and lipogenesis.

Moreover, we found alterations in the insulin signaling pathway at expression and functional level in the ovary, in a phenotype-dependent manner. These alterations lead to a decrease in the metabolic response to insulin that is capable of compromising ovarian physiology; which results in the ovulatory disorders found. These alterations found both at the metabolic and reproductive levels are reversible at different levels after a treatment with metformin.

Key words: insulin resistance; fetal programming; polycystic ovary syndrome; insulin pathway; metformin.

Parte del contenido de esta Tesis doctoral a sido publicado en

«Metformin Improves Ovarian Insulin Signaling Alterations Caused by Fetal Programming». Heber, Maria E., Silvana R. Ferreira, Giselle Adriana Abruzzese, Trinidad Raices, Omar Pedro Pignataro, Margarita Vega, y Alicia B. Motta. 2019. *The Journal of Endocrinology*, enero. <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0520>.

El presente trabajo ha sido financiado por:

El Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET): Beca Única de Doctorado 2014-2019

Financiamiento de la ANPCyT y CONICET

Agradecimientos

Esta Tesis es el final de un largo camino que no podría haber recorrido sola, a todas esas personas que estuvieron ahí acompañándome les digo GRACIAS!

A mi familia, en particular a mi Mamá y mis hermanas, por hacerme la persona que soy, por siempre creer en mi, por empujarme a superarme constantemente, por siempre apoyar mis decisiones y mis locuras. Y no me puedo olvidar de los pequeñines de la familia Fran, Palo y Lucio que son una fuente constante de alegrías y amor.

A Alicia, por recibirme con los brazos abiertos, por darme el lugar para poder realizar el doctorado. Por todas las enseñanzas, no solo a nivel profesional, por el apoyo en momentos de crisis.

A Sil y Gise, por la ayuda constante, el apoyo y hacer que las risas nunca falten. Por las cervezas compartidas en momentos de festejo, desahogo o crisis. Silcha gracias por aguantar todas mis locuras, te voy a extrañar!. A Lean, por bancarme al principio con toda su paciencia, y que a pesar de la distancia sigue ahí. A las nuevas adhesiones al grupo, Majo gracias por hacer que este ultimo tramo estuviese lleno de risa y diversión!

A la gente con la que compartí a diario, Eric, Ro, Lore, Nata, Masi, Flor, Raque. A Dai, gracias por todo el aguante estos últimos años. Gracias Clau, por tus enseñanzas a un principio, y por seguir estando siempre.

A Margarita y a todo su equipo , por recibirme con tanta alegría, gracias por hacer que mi experiencia allá fuese única.

Al Cefybo por abrirme las puertas para poder crecer profesionalmente.

No puedo olvidarme de la FCEN, facultad que me vio crecer, que me dio todas las herramientas para llegar hasta este lugar. Y que con ella vinieron amigas incondicionales como Sol y Flor que recorrieron este largo camino conmigo.

A mis amigas de la vida, por siempre estar para levantarme el ánimo o festejar cuando fuera necesario.

A todos ellos y otros que capaz no nombre, gracias por ayudarme a transitar esta gran etapa de mi vida.

Índice

I. INTRODUCCIÓN.....	1
Programación fetal.....	2
Andrógenos y programación fetal.....	3
Síndrome de Ovario Poliquístico.....	5
Modelos animales del SOP.....	7
Hiperandrogenización prenatal en roedores: modelo para el estudio del SOP.....	7
Insulino resistencia.....	9
Vías de señalización de la insulina.....	10
Defectos en la vía de señalización de la insulina en el SOP.....	12
Hígado, fisiología y patología.....	14
Hígado e insulina.....	14
Metabolismo de la glucosa.....	15
Lipogénesis.....	16
Insulino resistencia hepática.....	17
Ovario, fisiología y patología.....	18
Foliculogénesis.....	18
Alteraciones ovulatorias en SOP.....	21
Metabolismo de la glucosa.....	22
Acción de la insulina.....	23
Insulino resistencia y SOP en el ovario.....	24
Fisiología de los Receptores Nucleares Activados por Proliferadores Peroxisomales (PPARs)	25
Estructura y mecanismos de regulación de PPARs.....	25
Mecanismos de regulación de PPARs.....	26
PPARg y su función en el ovario.....	27
Mecanismos de regulación de PPARg.....	28
Activación del sistema PPARg y SOP.....	29
Metformina.....	30
II. Hipótesis y Objetivos.....	32
Hipótesis de trabajo.....	33
Objetivo general.....	33
Objetivos específicos.....	33
III. METODOLOGÍA.....	34
Modelo Experimental.....	35
Animales.....	35
Modelo hiperandrogenización prenatal.....	35
Determinación de fenotipo reproductivo.....	36
Establecimiento de la regularidad del ciclo estral.....	37
Obtención de tejidos.....	38
Estudios histológicos.....	39
Morfología del tejido por técnica de Hematoxilina-Eosina.....	39
Determinaciones séricas.....	40
Radioinmunoensayo de T en suero:.....	40
Análisis por ELISA de estradiol.....	41
Análisis de Progesterona por Radioinmunoensayo.....	41
Análisis por ELISA de insulina.....	41
Análisis de glucosa basal.....	41
Cálculo del índice HOMA-IR.....	42

Determinación de RNA mensajero en tejidos.....	42
Aislamiento de RNA.....	42
Obtención de cDNA.....	42
Cuantificación por PCR cuantitativa en tiempo real (Real time PCR).....	43
Determinación de los niveles proteicos.....	45
Extracción de proteínas.....	45
Corrida electroforética.....	45
Transferencia.....	45
Inmunodetección de proteínas de interés.....	46
Análisis de interacción proteica por co-IP.....	47
Evaluación del balance oxidatante/antioxidante.....	49
Determinación del contenido total del metabolito antioxidante glutatión (GSH).....	49
Índice de peroxidación lipídica por cuantificación de malondialdehído (MDA)- TBARS.....	50
Análisis estadístico.....	51
IV. Capítulo 1. Efectos de la hiperandrogenización prenatal: caracterización del modelo.....	52
Ciclo estral.....	53
Morfología ovárica.....	54
Parámetros hormonales.....	56
Parámetros metabólicos.....	57
Peso corporal.....	59
Discusión.....	59
V. Capítulo 2. Efectos de la hiperandrogenización prenatal en el metabolismo energético del hígado	63
Expresión de mediadores de la vía metabólica de señalización de la insulina.....	64
Metabolismo de la glucosa.....	65
Lipogénesis.....	67
Estrés oxidativo e insulino resistencia.....	68
Mecanismo de acción de la metformina.....	69
Discusión.....	70
VI. Capítulo 3. Vía metabólica de señalización de la insulina en el ovario: efecto de la hiperandrogenización prenatal.....	75
Mediadores vía señalización de la insulina.....	76
Actividad vía metabólica de la insulina.....	78
Mecanismo de acción de metformina en el ovario.....	80
Discusión.....	81
VII. Capítulo 4. Camino de la insulina en la reproducción femenina.....	85
Sistema PPARg.....	86
Mecanismos de regulación de PPARg.....	87
Discusión.....	91
VIII. Discusión final y conclusiones.....	94
Discusión final.....	95
Conclusiones.....	100
IX. Referencias.....	102

Abreviaturas

3TC: 3 tipos celulares

ADN: ácido desoxiribonucleico

Akt: alfa serina/treonina proteína quinasa

AMPK: proteína quinasa activada por monofosfato adenina

AMPKt: AMPK total

AR: receptor de andrógenos

ARN: ácido ribo nucleico

CDK5: ciclina dependiente de quinasa 5

CG: célula de la granulosa

ChREBP: factor de transcripción de respuesta a carbohidratos

CL: cuerpo lúteo

CT: célula de la teca

Ct: ciclo umbral

CT: colesterol total

D.E: desvío estándar

DBD: dominio de unión a ADN

DHEA: dihidroepiandrostenediona

DHT: dihidrotestosterona

DNTP: desoxitibonucleotidos

E2: estradiol

EHGNA: Enfermedad del hígado graso no alcoholico

ERK: quinasa regulada por señales extracelulares

EtOH: etanol

F Pa: folículo preantral

FA: folículo antral

FAS: ácido graso sintasa

FP: folículo primordial

FSH: hormona folículo estimulante

G6Pase: glucosa-6-fosfatasa

GLUT: transportador de glucosa

GR: glutatión reductasa

Grb2: proteína ligante del receptor del factor de crecimiento 2

GSH: glutatión

GSSG: glutatión oxidado

HA: fenotipo hiperandrogénico

HOMA-IR: índice homeostático de insulino resistencia

HP: grupo hiperandrogenizado prenatalmente

IR: receptor de insulina

IRS: sustrato del receptor de insulina

LBD: dominio de unión a ligando

LH-R: receptor de LH

LH: hormona luteinizante

MAPK: proteína quinasa mitogénica activada

MDA: malondialdehído

MEK: MAPK quinasa

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NCoR: co-represor de receptores nucleares

NcOR: co-represor nuclear

P4: progesterona

pACC: acetil-CoA carboxilasa fosforilada

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PEPCK: fosfoenol piruvato carboxiquinasa

PGC1a: co-activador de PPAR γ 1-alfa

PI3-K: fosfatidil inositol 3-quinasa

PPAR γ : receptor activado por proliferadores peroxisomales gama

PPARs: receptores activados por proliferadores peroxisomales

PPRE: secuencia de respuesta a los PPARs

PSMB2: subunidad beta 2 del proteasoma

Q: Quiste

RIA: radioinmunoensayo

RPL32: proteína ribosomal L32

RXR: receptor del ácido 9-cisretinoico

S: Serina

SOP: Síndrome de ovario poliquístico

SREBP: proteína de unión a elemento regulador de esteroides

T: testosterona

TBA: ácido tiobarbitúrico

TBARs: especies reactivas de TBA

TCA: ácido tricloroacético

TG: triglicéridos

TNB: 5-tio-2 nitro benzoato

TZDs: tiazolidinonas

WB: western blot

I. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Programación fetal

Existen ciertas etapas del desarrollo que son periodos críticos de plasticidad fenotípica, en las cuales el organismo es susceptible a alteraciones en el ambiente que pueden provocar cambios permanentes, condicionando así la vida adulta y el estado de salud (Gilbert, 2001; Hochberg et al., 2011). Estas ventanas de susceptibilidad no involucran únicamente las etapas tempranas de desarrollo (vida prenatal), se ha visto también que las primeras etapas de la vida, son periodos de plasticidad fenotípica y que diferentes factores como son: el estilo de vida, la dieta, los contaminantes ambientales, las intervenciones médicas y farmacéuticas, las hormonas entre otros; pueden afectar a los organismos alterando su desarrollo (Hanson y Gluckman, 2015). Por lo que cualquier evento que ocurra durante estos periodos puede, por lo tanto, influir permanentemente en el fenotipo del organismo, este proceso se ha denominado "programación del desarrollo" (Godfrey y Barker, 2001). Este es un fenómeno complejo en el cual perturbaciones en estímulos o insultos en el ambiente durante períodos críticos del desarrollo inducen cambios permanentes en la estructura y función de los organismos que se están desarrollando, que pueden deberse a cambios epigenéticos, adaptaciones fisiológicas o cambios estables en la expresión de los genes (Hochberg et al., 2011; Padmanabhan et al., 2016).

El desarrollo fetal, es uno de los periodos más susceptibles a los efectos de la programación, en donde los tejidos y órganos del organismo están siendo creados. Cualquier perturbación en el ambiente intrauterino puede alterar el desarrollo del feto (Barker, 2004). Estas perturbaciones pueden deberse a malnutrición materna, alteraciones ambientales, hormonales o debido a estrés, entre otras y son capaces de afectar la expresión génica, la estructura y función de órganos en desarrollo, lo que eventualmente lleva a consecuencias postnatales adaptativas y beneficiosas o a consecuencias postnatales no adaptativas que conllevan al desarrollo de patologías durante la vida postnatal (Fig 1.1) (Hakim et al., 2016).

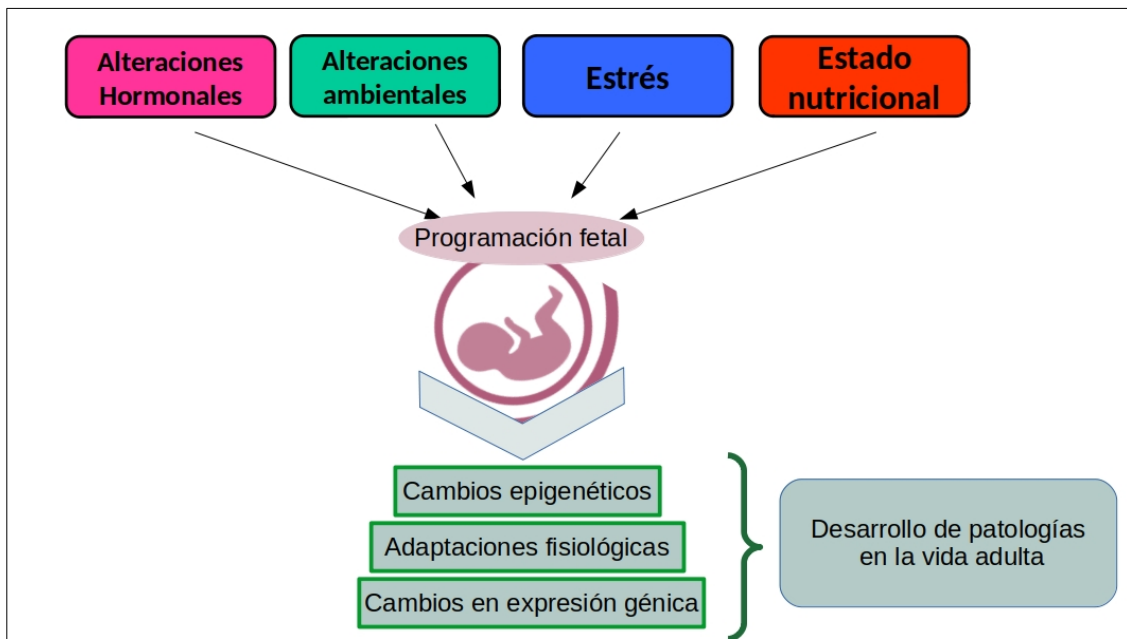


Figura 1.1. Representación de programación fetal. La exposición del feto a diferentes insultos durante períodos críticos de desarrollo puede llevar a adaptaciones que resultan ser perjudiciales y están asociadas con defectos de adultos en varios sistemas orgánicos.

Andrógenos y programación fetal

El medio hormonal materno-fetal desempeña un papel importante durante los períodos críticos de desarrollo en la diferenciación de órganos en el feto (Fowden y Forhead, 2004). Por lo tanto, un medio hormonal de esteroides sexuales alterado es un buen ejemplo de insulto *in utero*, que programa adversamente al feto.

Los andrógenos juegan un rol crucial en la fisiología femenina, afectando no solamente los órganos reproductivos, sino también el hígado, riñones, hueso y músculo (Hakim et al., 2016). Se ha demostrado que las alteraciones en los niveles de andrógenos pueden estar implicadas en trastornos como el Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP) y el cáncer de endometrio (Simitsidellis et al., 2016). La testosterona (T), que es el principal andrógeno, ejerce sus acciones principalmente a través del receptor de andrógenos (AR), pero también puede inducir efectos biológicos a través de sus principales metabolitos activos: dihidrotestosterona (DHT) y Estradiol (E2). La DHT también se une al AR pero su acción es más potente y el E2 puede actuar por sus propios receptores (Sotomayor-Zarate et al., 2014). Los andrógenos desempeñan importantes funciones durante la vida prenatal y en el período postparto temprano, siendo fundamentales para el desarrollo cerebral y la diferenciación sexual (Abruzzese et al., 2018).

Ambos sexos expresan AR, pero durante el desarrollo, las mujeres tienen una falta de andrógenos, lo que conduce a la diferenciación de los caracteres sexuales femeninos (Hiort, 2013).

Diversos estudios en modelos animales han demostrado que, durante la vida embrionaria tardía y la vida postnatal temprana, hay una ventana de programación que es susceptible a andrógenos y que estos afectarían la función de los órganos sexuales, la estructura del cerebro y el comportamiento (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).

Diversos estudios han demostrado que la exposición prenatal a andrógenos tiene una serie de consecuencias deletéreas que se expresan durante la vida adulta. Se han utilizado a lo largo de los años diferentes modelos animales para evaluar los efectos de la exposición de testosterona durante la vida intrauterina. Entre las consecuencias que se observa durante la vida postnatal se observa, una masculinización del fenotipo femenino, retardo del crecimiento intrauterino, infertilidad, obesidad, insulino resistencia y cambios en la conducta de las crías (Fig 1.2) (Wolf et al., 2002; Abbott et al., 2005; Manikkam et al., 2006; Padmanabhan et al., 2006; Nada et al., 2010).

Estudios en hembras ovinas androgenizadas prenatalmente, muestran que la exposición a testosterona durante el periodo crítico del desarrollo cerebral puede adelantar el inicio del pico característico de la secreción de hormona luteinizante (LH) que conduce a la pubertad. Más aún se ha demostrado en monos, ovejas y ratas, que una exposición prenatal a andrógenos es capaz de causar disfunciones ovulatorias que pueden llevar a anovulación. Estos defectos reproductivos frecuentemente también están acompañados por alteraciones metabólicas como por ejemplo dislipidemia e insulino resistencia (Dumesic et al., 2002; Abbott et al., 2005; Recabarren et al., 2005; Ortega et al., 2010; Padmanabhan y Veiga-Lopez, 2013)

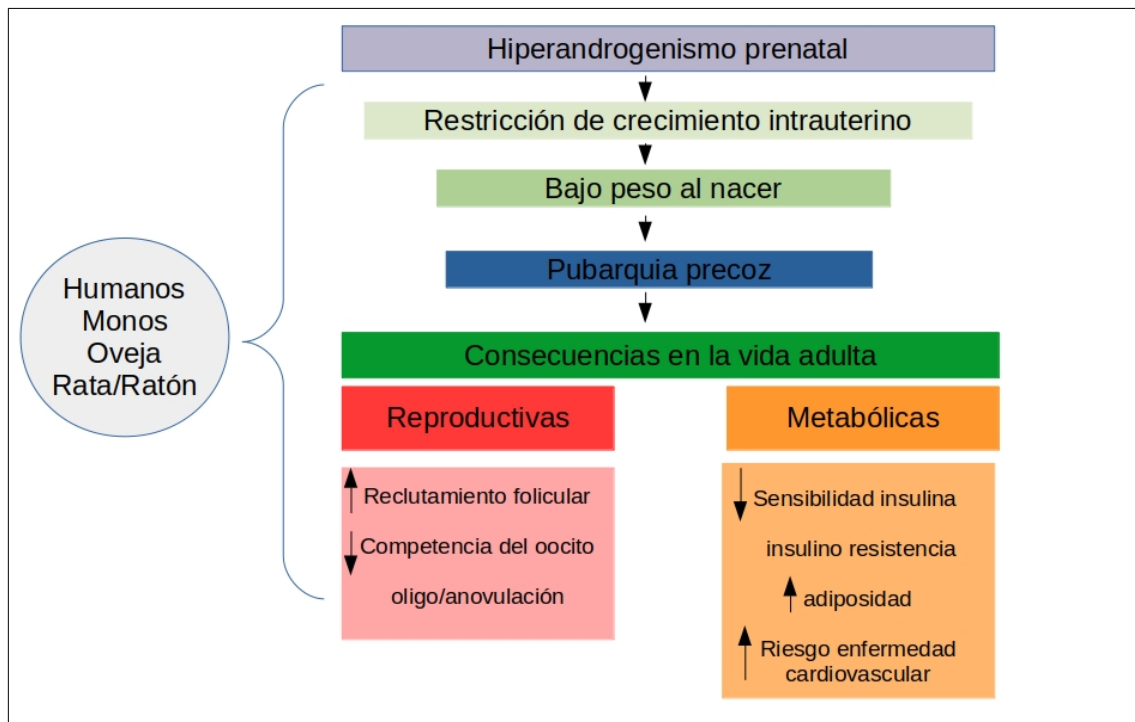


Figura 1.2. Esquema resumiendo las consecuencias del hiperandrogenismo fetal en humanos y diversos modelos animales. Figura adaptada de Hakim C, Padmanabhan V & Vyas AK 2016 Gestational Hyperandrogenism in Developmental Programming. *Endocrinology* **158** 199–212. (doi:10.1210/en.2016-1801)

Síndrome de Ovario Poliquístico

El SOP, es uno de los desórdenes endocrinos más comunes en mujeres en edad reproductiva. Es una patología de gran heterogeneidad, que conduce a una amplia gama de síntomas reproductivos, endocrinos y metabólicos (Franks, 1995; Azziz, 2004). Actualmente el diagnóstico se basa en los criterios establecidos en el consenso internacional de la reunión 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), que establece como mujeres con SOP a aquellas que presenten al menos dos de los siguientes parámetros:

- oligo- o anovulación (ciclos menstruales mayores a 35 días o amenorrea);
- hiperandrogenismo clínico o bioquímico;
- ovarios poliquísticos por ecografía.

El SOP se ha definido como una de las principales causas de subfertilidad e infertilidad anovulatoria en mujeres jóvenes. Las pacientes presentan un gran número de folículos arrestados en estadios tempranos y medios del desarrollo, que no son capaces de continuar con su maduración lo que lleva a la formación de quistes ováricos (Mason et al., 1994; Webber et al., 2003). Junto con estas alteraciones en el desarrollo folicular se ven asociados desórdenes hormonales, lo que lleva a estas pacientes a requerir tratamientos de reproducción asistida. Acompañando a estas alteraciones reproductivas, SOP se encuentra frecuentemente asociado a varios trastornos metabólicos como: hiperinsulinemia, síndrome de insulino resistencia, riesgo cardiovascular incrementado, desbalance en el metabolismo lipídico y diabetes de tipo 2 (Franks, 1995; Asunción et al., 2000; Abbott et al., 2002).

Aunque la etiología del SOP no se conoce completamente todavía, se considera una patología multifactorial (de Melo et al., 2015). Las teorías actuales hacen hincapié en orígenes genéticos e intrauterinos, junto con factores ambientales como la dieta y estilo de vida alterados (Franks, 1995; Rosenfield y Ehrmann, 2016). Dado que la genética de SOP es solamente capaz de explicar una parte de la heredabilidad del síndrome, se ha sugerido que tanto el ambiente como los cambios epigenéticos contribuyen a la patogenia del SOP. Se ha propuesto que el SOP tiene su origen en la vida fetal. Estudios en monos *rhesus* han demostrado que la exposición de los fetos a altos niveles de andrógenos durante la vida intrauterina determina la aparición de manifestaciones clínicas de SOP durante la adolescencia. Más aún estudios en ovejas han demostrado que una exposición excesiva a los andrógenos durante la vida fetal influye en la actividad folicular ovárica temprana y puede explicar la foliculogénesis alterada característica del SOP (Abbott et al., 2002; Franks et al., 2006). Se ha demostrado también que un exceso de andrógenos prenatal es capaz de inducir características de tipo ovario poliquístico en ratas (Demissie et al., 2008; Amalfi et al., 2012; Abruzzese et al., 2016), ratones (Sullivan y Moenter, 2004), monos (Eisner et al., 2000; Abbott et al., 2009) y ovejas (Manikkam et al., 2006). Y que la programación fetal mediada por exceso de andrógenos, puede llevar a hiperinsulinemia, dislipidemia, insulino resistencia, enfermedad cardiovascular y síndrome metabólico, que han sido asociados con una alta incidencia en mujeres con SOP (Demissie et al., 2008; Roland et al., 2010; Heber et al., 2013; Abruzzese et al., 2016)

Modelos animales del SOP

El uso de modelos animales para el estudio de trastornos reproductivos en humanos como es el caso del SOP, se basa en alto grado de conservación evolutiva del sistema reproductivo en mamíferos. En los últimos años se han utilizado diversos modelos animales para estudiar la patogenia del SOP. Dentro de estos, los modelos de hiperandrogenización prenatal resultan los más adecuados, dado que son capaces de emular tanto las características reproductivas como metabólicas encontradas en el SOP (Abbott et al., 2005, 2009; Padmanabhan et al., 2010). Como hemos mencionado anteriormente, esta exposición prenatal a andrógenos es capaz de inducir características de ovario poliquísticos, así como diversas consecuencias metabólicas, tales como insulina resistencia dislipidemia y síndrome metabólico entre otras, en diversas especies (Eisner et al., 2000; Manikkam et al., 2006; Demissie et al., 2008; Abbott et al., 2009). El hiperandrogenismo prenatal 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; Yan et al., 2013; Abruzzese et al., 2016; Veiga-Lopez et al., 2016).

Sin embargo ningún modelo es capaz de replicar correctamente todas las características del SOP humano. Al día de hoy no existiría un modelo por excelencia del SOP. Por ello, los diversos modelos animales podrían colaborar para el entendimiento de diferentes aspectos del síndrome.

Hiperandrogenización prenatal en roedores: modelo para el estudio del SOP

Si bien el uso de modelos de primates no humanos para el estudio de SOP es uno de los más aceptados, debido a la gran problemática y costos que implica el trabajo con monos, el uso de roedores como modelo es preferible. Estos presentan un trasfondo genético estable, son fáciles de manipular y mantener, presentan ciclos reproductivos y de vida cortos, lo que permite estudiar los efectos a largo plazo (Walters et al., 2012).

Existen diversos modelos del SOP en roedores por programación causada por andrógenos. No solo se han desarrollado modelos de hiperandrogenización prenatal, sino que también se han implementado modelos de programación en otros periodos de susceptibilidad del desarrollo como son el postnatal temprano y tardío (Walters et al., 2012; Paixão et al., 2017). La exposición postnatal a andrógenos en roedores, tanto de T como de DHT, es capaz de emular algunas de las características reproductivas y metabólicas presentes en el SOP. Sin embargo, es necesario considerar en el uso de estos modelos la ventana en la que se somete al hiperandrogenismo. Por ejemplo la exposición de DHT en ratas a 3 horas de vida postnatal, es capaz de reproducir gran parte de las características metabólicas presentes en SOP, pero no cuenta con una de las alteraciones reproductivas más características: ovarios poliquísticos. Sin embargo la inducción con DHT en una etapa prepuberal, sí presenta ovarios poliquísticos, pero carece de alguno de los componentes metabólicos del SOP (Walters et al., 2012; Padmanabhan y Veiga-Lopez, 2013).

Por otro lado, se ha demostrado que los modelos de exposición prenatal a andrógenos (tanto con T o DHT), son capaces de inducir las alteraciones reproductivas, endocrinas y metabólicas más relevantes en SOP (Demissie et al., 2008; Wu et al., 2010; Walters, 2015). Más aún debido a que estos modelos 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., 2005; Padmanabhan y Veiga-Lopez, 2013; Padmanabhan et al., 2014), por lo que en los últimos años se ha focalizado en el estudio de dichos modelos.

Si bien varios de los modelos de programación fetal por andrógenos en roedores han podido replicar varias de las alteraciones metabólicas y reproductivas del SOP humano, hay discrepancias entre las características inducidas por los distintos modelos. La diversidad de modelos se debe a las variaciones en la dosis aplicadas de andrógenos, en el tipo de andrógeno utilizado (usualmente T o DHT) y en el momento de su 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 et al., 2002; Demissie et al., 2008; Amalfi et al., 2012; Heber et al., 2013; Yan et al., 2013).

El desarrollo sexual es un proceso complejo que involucra modificaciones hormonales, genéticas y celulares, que depende tanto de la diferenciación de las gónadas como de la diferenciación sexual en el cerebro. La diferenciación de las gónadas ocurre en roedores y

humanos durante el desarrollo fetal temprano, lo que lleva a la diferenciación sexual cuando ésta gónada comienza a secretar hormonas claves. Sin embargo son necesarias señales del sistema nervioso para que la diferenciación sexual sea completa. Estas señales en las que se completa la determinación del sexo fenotípico ocurren durante la gestación tardía (Wilhelm et al., 2007). Esta ventana de desarrollo es un periodo de gran susceptibilidad, donde se determina si el cerebro es femenino o masculino. Este acontecimiento depende en gran medida de la secreción de hormonas por la gónada desarrollada, siendo los andrógenos producidos por el testículo fetal responsables de modular el cerebro masculino y la ausencia de andrógenos modulan el cerebro femenino (Foecking et al., 2008).

En 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 (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). 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 se 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 (Foecking et al., 2008).

Insulino resistencia

La insulina actúa principalmente regulando la homeostasis de la glucosa, mediante la estimulación de la entrada de glucosa a tejidos insulino sensibles, así como también inhibiendo su síntesis en el hígado (Bergman, 2007). A su vez la insulina también es capaz de regular la lipólisis (Diamanti-Kandarakis y Dunaif, 2012).

La noción de insulino resistencia se puede remontar a 1936, donde Himsworth, observó que la inyección simultánea de glucosa e insulina en pacientes diabéticos produjo uno de los

siguientes resultados: 1) algunos pacientes respondieron al desafío con niveles de glucosa en sangre estable o disminuida; estos fueron denominados sensibles a la insulina; 2) otros pacientes tuvieron un aumento considerable de glucosa en sangre luego del desafío, a estos se los considero como insensibles a la insulina (Himsworth, 1936). Hoy en día se considera a estos últimos pacientes como insulino resistentes. La insulino resistencia se define como la baja habilidad de la insulina para mediar sus acciones metabólicas. Llevando a la necesidad de una gran cantidad de insulina para poder mediar sus acciones (Diamanti-Kandarakis y Dunaif, 2012; Petersen y Shulman, 2018).

En 1980, Burghen y colaboradores, demostraron que mujeres con SOP, presentaban una hiperinsulinemia estimulada por un aumento de glucosa, que no se debía a obesidad, sugiriendo que estas podrían presentar insulino resistencia (Burghen et al., 1980). A partir de esta observación, otros autores durante los años siguientes, confirmaron no solo la presencia de insulino resistencia en pacientes con SOP, independientemente del peso, sino también la relación entre la hiperinsulinemia presente y el hiperandrogenismo (Pasquali et al., 1982; Chang et al., 1983; Shoupe et al., 1983; Stuart et al., 1986).

Hoy en día se sabe que la insulino resistencia y su subsecuente hiperinsulinemia se haya presente en el 50-80% de mujeres con SOP, sean estas delgadas o con sobrepeso (Diamanti-Kandarakis y Dunaif, 2012). Esta como otras implicaciones metabólicas presentes en pacientes con SOP, han llevado a dejar de considerar el síndrome como únicamente una patología reproductiva. La asociación entre la insulino resistencia, hiperinsulinemia compensatoria y el hiperandrogenismo ha proporcionado información sobre la patogenia del SOP (Barbieri y Hornstein, 1988; Dunaif, 1997; Diamanti-Kandarakis y Dunaif, 2012).

Vías de señalización de la insulina

La insulina ejerce sus efectos fisiológicos mediante la unión a su receptor (Di Guglielmo et al., 1998; Petersen y Shulman, 2018). El receptor de insulina (IR) es heterotetramérico con capacidad de tirosin quinasa formado por dos subunidades alfa extracelulares, que se unen a la insulina, y dos subunidades beta, cada una de las cuales contiene un dominio tirosin quinasa (Hubbard, 2013). La unión del ligando provoca un cambio conformacional en la subunidad beta

que induce la autofosforilación del receptor en sus residuos tirosina. Esta autofosforilación a su vez le concede su actividad de quinasa, permitiendo reclutar los sustratos del receptor de insulina (IRS), necesarios para la cascada de señalización (Youngren, 2007; Petersen y Shulman, 2018).

Una vez activado, el IR fosforila en residuos tirosina a sustratos intracelulares, como IRS1-4, entre otros (Cheatham y Kahn, 1995; Saltiel y Kahn, 2001), para iniciar la transducción de señales. Los IRS se fosforilan en motivos específicos, y estos sitios fosforilados son capaces de unirse moléculas de señalización, como el dominio SH2 de la fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3-K) o la molécula adaptadora, Nck (Sun et al., 1991; Saltiel y Kahn, 2001), lo que lleva a la activación de caminos de señalización río abajo.

La insulina estimula la captación de glucosa al aumentar la translocación del transportador de glucosa (GLUT) sensible a la insulina, GLUT4, de las vesículas intracelulares a la superficie celular (Cheatham y Kahn, 1995; Choi y Kim, 2010). Esta vía está mediada por la activación de PI3-K, que luego fosforila a los fosfolípidos de membrana, lo que conduce a la activación de varias proteínas quinasas, como la alfa serina/treonina proteína quinasa (Akt) (Petersen y Shulman, 2018). Akt transmite la señal por fosforilación de su sustrato de 160 kDa, AS160 que estimula la translocación de GLUT4 a la superficie celular (Saltiel y Kahn, 2001; Choi y Kim, 2010).

La insulina además de la estimulación de la captación de glucosa, tiene múltiples acciones celulares (Saltiel y Kahn, 2001). Como por ejemplo estimular el almacenamiento de lípidos y proteínas, promover el crecimiento y la diferenciación celular (Saltiel y Kahn, 2001). Los efectos sobre el crecimiento y la diferenciación celular los realiza a través de la vía de la proteína quinasa mitogénica activada (MAPK)/quinasa regulada por señales extracelulares (ERK), llamada vía mitogénica (Pearson et al., 2001; Saltiel y Kahn, 2001; Diamanti-Kandarakis y Dunaif, 2012). Esta vía se activa mediante la fosforilación mediada por el receptor de insulina de Shc o IRS, lo que lleva a la asociación con proteína ligante del receptor del factor de crecimiento 2 (Grb2) y que resulta en la activación de Ras (Saltiel y Kahn, 2001). Esta activación estimula una cascada de serina / treonina quinasa que resulta en la activación gradual de Raf, MAPK quinasa (MEK) y MAPK-ERK1/2. ERK1/2 se traslada al núcleo y fosforila los factores de transcripción necesarios para iniciar el crecimiento y la diferenciación celular (Fig. 1.3) (Saltiel y Kahn, 2001).

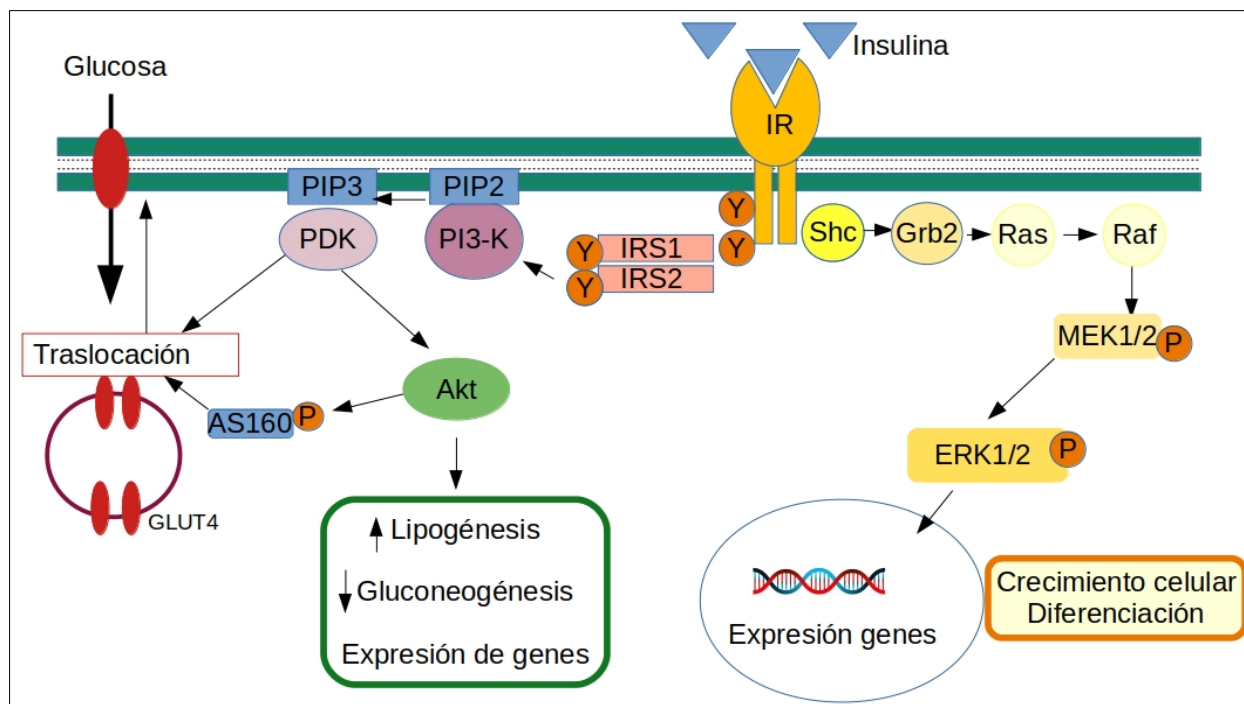


Figura 1.3. Vías de señalización de la insulina. Luego de la unión del ligando al IR, este se autofosforila en residuos tirosina (Y) y fosforila sus sustratos. IRS interactúa con PI3-K, que fosforila (P) a PIP2 para formar la quinasa PDK, que se autofosforila y es capaz de activar a Akt. Akt es capaz de fosforilar varias quinasas río abajo o factores de transcripción involucrados en los efectos metabólicos de la insulina. A su vez PDK, a través de AKT y otras quinasas, fosforila a la proteína AS160, que promueve la translocación de las vesículas de GLUT4 hacia la membrana, para permitir el ingreso de glucosa. El IR, fosforila al sustrato Shc, permitiendo su unión con Grb2, activando una cascada que involucra a Ras, Raf y MEK1/2, donde finalmente ERK1/2 son fosforilados, lo que permite su translocación al núcleo para estimular la expresión de genes mitogénicos.

Defectos en la vía de señalización de la insulina en el SOP.

Los mecanismos celulares y moleculares de la insulino resistencia han sido ampliamente investigados en el SOP en tejidos blanco de insulina como músculo esquelético, fibroblastos y tejido adiposo (Li et al., 2002; Corbould et al., 2005; Allemand et al., 2009). Se cree que este

estado de insulino resistencia se debe a un defecto en la vía de señalización de la insulina, luego de la unión de la misma a su receptor (Dunaif et al., 2001; Corbould et al., 2005).

Se ha reportado que un aumento en la fosforilación de tanto IR como de sus sustratos IRS en residuos serina, es capaz de disminuir la fosforilación de los mismos en los residuos tirosina que lleva a una acción de la insulina impedida (Saltiel y Kahn, 2001; Draznin, 2006). Primero, se hizo evidente que la fosforilación de serina de las proteínas del IRS puede reducir su capacidad para atraer a la PI3-K, minimizando así su activación (Qiao et al., 1999; White, 2002; Draznin, 2006), y también puede conducir a una degradación acelerada de la proteína del IRS-1 (Shah et al., 2004). Por lo tanto, en contraste con una señal que promueve la fosforilación de la tirosina, la fosforilación excesiva de serina de las proteínas del IRS podría volverse perjudicial para una normal señalización de la vía metabólica de la insulina, causando así insulino resistencia. Esta fosforilación excesiva en residuos serina de los IRS puede ocurrir en respuesta a varias serin quinasas intracelulares (Draznin, 2006) Más aún esta fosforilación en serina en particular de IRS-1 se sabe que es promovida por el aumento de varios metabolitos circulantes, como ácidos grasos libres, diacil glicerol y glucosa (Aguirre et al., 2002). Diversos estudios en modelos animales de insulino resistencia han demostrado la disminución en la actividad y señalización de la vía asociada a IRS-1 y PI3-K, que resulta en una disminución de la captación de glucosa (Fig. 1.4) (Qiao et al., 1999; Aguirre et al., 2002; Werner et al., 2004; Choi y Kim, 2010).

Existen evidencias de que este estado de insulino resistencia es selectivo, afectando la vía metabólica de la insulina pero no la mitogénica (Cusi et al., 2000; Wu et al., 2003) dado que las dos vías asociadas al IR son independientes una de la otra (Saltiel y Kahn, 2001). Se ha reportado que el musculo esquelético de pacientes con SOP presenta defectos en la vía metabólica de señalización de insulina, dado por una baja actividad de PI3-K, pero con una preservada actividad mitogénica (Corbould et al., 2006)

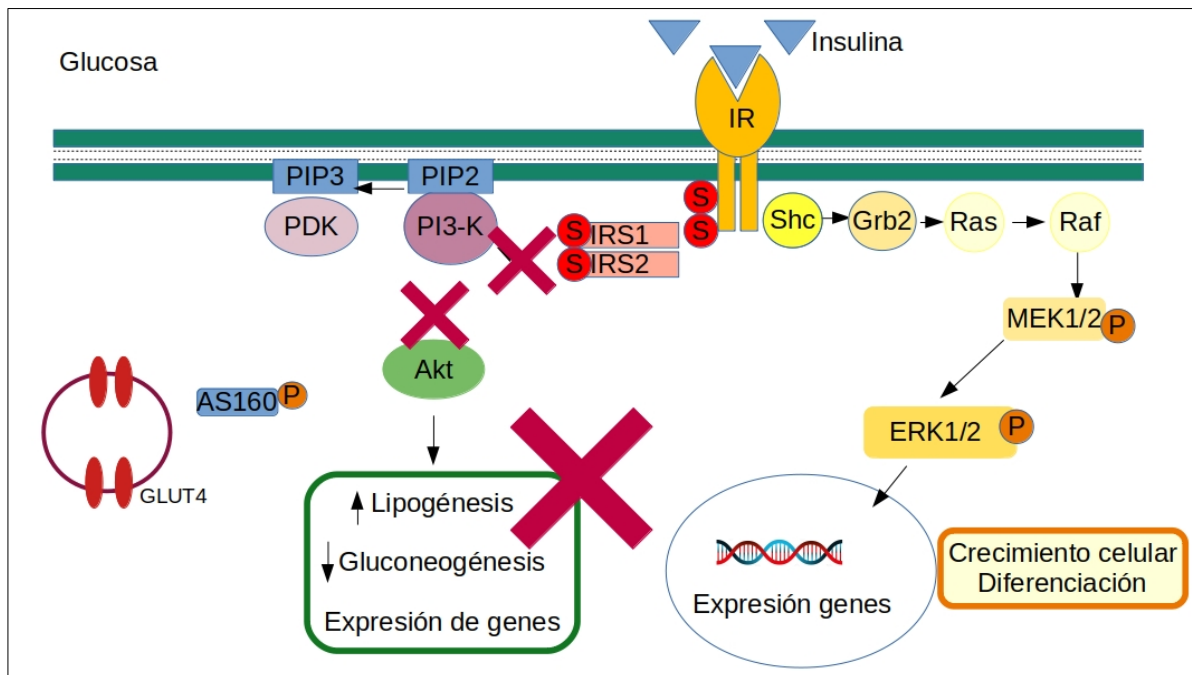


Figura 1.4. Vías de señalización de la insulina en SOP. Defectos en el IR, provocan la fosforilación del mismo en residuos serina (S) luego de la unión del ligando, lo que aumenta la fosforilación en serina de los sustratos IRS. Esto provoca la disminución de la actividad de PI3-K y los mediadores río abajo. Por lo que la acción metabólica de la insulina esta disminuida. La vía mitogénica que es independiente de los IRS no se ve afectada.

Hígado, fisiología y patología

Hígado e insulina

El hígado es un órgano metabólico clave que controla el metabolismo energético de todo el organismo. Actúa como centro metabólico de varios tejidos. Sus principales funciones son de síntesis y almacenamiento de metabolitos. El hígado es responsable del metabolismo de la glucosa e insulina, y del metabolismo y almacenamiento de lípidos (Rui, 2014). A su vez es uno de los principales órgano blanco de insulina y juega un rol importante en la homeostasis de la glucosa. Mantiene un equilibrio entre la captación y el almacenamiento de glucosa regulando, la glucogenogénesis y la producción de glucosa por glucogenólisis y gluconeogénesis (Radziuk y Pye, 2001; Rui, 2014)

En el hígado la insulina es capaz de promover la síntesis de metabolitos como glucógeno, lípidos y proteínas, además de ser capaz de reducir la producción de glucosa hepática (Cherrington et al., 1998). Estas acciones las realiza a través del IR, como en la mayoría de las células, en donde luego de la unión del ligando a su receptor, este se autofosforila y es capaz de activar y reclutar los sustratos necesarios para continuar con la cascada de señalización (Petersen y Shulman, 2018).

Los principales sustratos al receptor de insulina en hepatocitos, son IRS-1 e IRS-2, que se considera que tienen funciones similares en la vía, sin embargo se ha visto que IRS-1 tiene un papel más importante en la homeostasis de la glucosa. Dong y colaboradores (2006) demostraron que ratones *knock out* para *Irs-1*, presentaban intolerancia a la glucosa, mientras que la delección de *Irs-2* produjo síntomas más leves, con una señalización de insulina hepato-celular preservada. Sin embargo la ausencia de ambas isoformas produjo un fenotipo metabólico severo con una actividad disminuida de la vía de señalización de la insulina y una marcada hiperglucemia (Dong et al., 2006).

Metabolismo de la glucosa

La producción de glucosa hepática es esencial para mantener los valores normales de glucosa en circulación. El hígado es el sitio primario para la producción de glucosa a través de glucogenólisis y gluconeogénesis. Cuando los niveles de glucosa aumentan, sin embargo, como en el estado post-prandial, la producción de glucosa hepática se reduce rápidamente en respuesta a los valores elevados de insulina circulante. La insulina facilita la captación de glucosa activando sus transportadores tanto en tejidos periféricos como en el hígado (Eisenberg et al., 2005).

GLUT2 es el principal transportador de glucosa en hepatocitos de roedores y humanos, uno de los papeles más importantes de este transportador es captar la glucosa al tejido hepático, en estados de hiperglucemia y liberarla a circulación en estados de ayuno. En los hepatocitos, la glucosa puede almacenarse como glucógeno, degradarse a través de la vía glucolítica o convertirse en ácidos grasos mediante la vía lipogénica. La liberación de glucosa a circulación sigue a la degradación del glucógeno o gluconeogénesis (Rui, 2014; Thorens, 2015).

La insulina media sus efectos inhibidores sobre la producción de glucosa al inhibir dos enzimas gluconeogénicas claves, la fosfoenol piruvato carboxiquinasa (PEPCK) y la glucosa-6 fosfatasa (G6Pase).

La enzima PEPCK cataliza el primer paso de la gluconeogénesis. La transcripción génica de la forma citosólica de PEPCK está altamente regulada por el eje glucagón/insulina. En diabetes, la falta de insulina (diabetes de tipo 1) o la resistencia a su acción (diabetes de tipo 2) es responsable de un importante aumento en la expresión de esta enzima, y esta inducción se correlaciona con mayores tasas de gluconeogénesis en el hígado y el riñón (Gómez-Valadés et al., 2008)

Lipogénesis

La insulina también tiene efectos directos sobre el metabolismo de los lípidos. El más importante entre estos efectos es la regulación de la tasa transcripcional de varios genes involucrados en la lipogénesis *de novo*. Principalmente promoviendo el almacenamiento de lípidos en los hepatocitos y disminuyendo la disponibilidad de ácidos grasos para la oxidación en otros tejidos (Petersen y Shulman, 2018).

El principal regulador transcripcional de la lipogénesis *de novo* hepática, es la proteína de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP), que promueve la lipogénesis al aumentar la transcripción de varias enzimas lipogénicas, en particular la acetil-CoA carboxilasa, la ácido graso sintasa y glicerol-3-fosfato aciltransferasa (Frayn, 2003; Petersen y Shulman, 2018). La sobreexpresión específica en hígado de SREBP es suficiente para causar esteatosis hepática (Jelenik et al., 2017). La insulina actúa sobre SREBP principalmente al regular su transcripción, también es capaz de promover su activación mediante el clivaje y translocación al núcleo (Eberlé et al., 2004).

Existe otro regulador clave de la lipogénesis en el hígado, factor de transcripción de respuesta a carbohidratos (ChREBP). Este, a diferencia de SREBP, se activa por el aumento post-prandial de los valores de glucosa en los hepatocitos. Este incremento de glucosa en los hepatocitos aumenta la tasa de glucólisis. Los diversos metabolitos generados durante la glucólisis son capaces de estimular la activación de ChREBP, este factor transcripcional es un

inductor clave de tanto la lipogénesis como así la glucólisis (Thorens, 2015; Sanders y Griffin, 2016).

Estos dos reguladores de la lipogénesis *de novo*, muestran acciones superpuestas, pero bajo distintos estímulos esta doble regulación asegura que la síntesis de ácidos grasos se de solamente en presencia de tanto insulina como glucosa (Linden et al., 2018).

Insulino resistencia hepática

El metabolismo energético del hígado está estrechamente controlado según las necesidades fisiológicas del organismo. Se han identificado múltiples señales hormonales, neuronales y de nutrientes que regulan las funciones hepáticas, como la insulina. En estados de insulino resistencia, los niveles circulantes de insulina no son suficientes para una función normal en el hígado y otros tejidos insulino sensibles, esto se debe a aletraciones en su vía de señalización. Estos defectos en el tejido hepático y una consecuente insulino resistencia en el hígado, causarían graves consecuencias en el balance energético y el metabolismo (Meshkani y Adeli, 2009).

La insulino resistencia hepática se manifiesta por la capacidad alterada de la insulina para activar su receptor y los mediadores río abajo de este, lo que da como resultado una supresión de la producción de glucosa. La gluconeogénesis no es el único proceso afectado sino que se ha visto que también la lipogénesis, entre otros, podría estar alterada. Sin embargo, estas vías pueden verse perjudicadas de diversas maneras. Por ejemplo, la lipogénesis, que está regulada positivamente por la insulina, se ve aumentada en obesidad, diabetes de tipo 2 y síndrome metabólico, esto podría deberse a la hiperinsulinemia, mecanismo compensatorio de la insulino resistencia. Esta paradoja es denominada “insulino resistencia selectiva”, y es de gran importancia para la etiología de diferentes patologías (Biddinger et al., 2008; Petersen y Shulman, 2018).

Ovario, fisiología y patología

Foliculogénesis

El ovario es un órgano dinámico que tiene dos funciones biológicas principales: 1) se encarga de la producción y liberación del oocito; 2) producción de hormonas sexuales que son esenciales para el desarrollo folicular y las funciones reproductivas. Estas funciones están controladas tanto por señales endocrinas, como también por factores locales (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 Vandevoort, 2013). Estos dos procesos, foliculogénesis y esteroidogénesis, están asociados. Mediante la esteroidogénesis ovárica se producen progestinas, andrógenos y estrógenos, que actúan regulando el crecimiento folicular, la reproducción y manteniendo la fertilidad.

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 el desarrollo embrionario, se forman las células germinales primordiales, que luego migran hacia las gónadas, conforme avanza el desarrollo. Donde junto con células somáticas, proliferan formando estructuras de nidos de células germinales, que eventualmente pasarán a formar los folículos primordiales (FP) que 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). La mayoría de los FP se mantienen inactivos y solo una población seleccionada se activa para unirse al conjunto de folículos en crecimiento, retomando la meiosis del oocito y llevando finalmente a la ovulación (Barnett et al., 2006; Rimon-Dahari et al., 2016). 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 (Fig 1.5) (Rimon-Dahari et al., 2016).

El primer período, independiente de gonadotrofinas, comprende los primeros pasos de la foliculogénesis que involucra el desarrollo desde folículos primordiales, pasando por los

primarios hacia los secundarios. Estos pasos son de crecimiento autónomo, donde intervienen señales locales y requiere una compleja interacción entre el oocito y las células somáticas, entre ellos se encuentran los esteroides sexuales (E2 y T). Estos pasos involucran una gran variedad de cambios morfológicos (Hsueh et al., 2015). La continuidad del desarrollo de los folículos requiere en primer medida de una migración hacia una zona más vascularizada.

En el segundo período, dependiente de gonadotrofinas, los folículos adquieren una cavidad con fluido conocida como antro o cavidad antral, dando lugar al folículo antral. En esta etapa la hormona folículo estimulante (FSH) actúa sobre las células de la granulosa, regulando su supervivencia, proliferación, la producción de hormonas sexuales y también modulando 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 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 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 paracrinos y autocrinos (Conti et al., 2012). En cada ciclo ovulatorio, bajo control de las 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). 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 1.6).

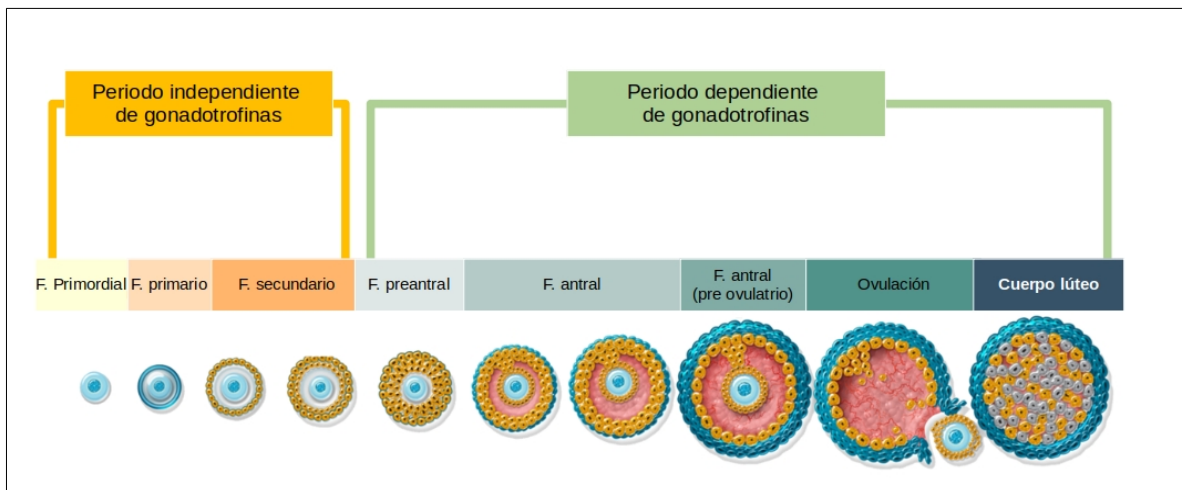
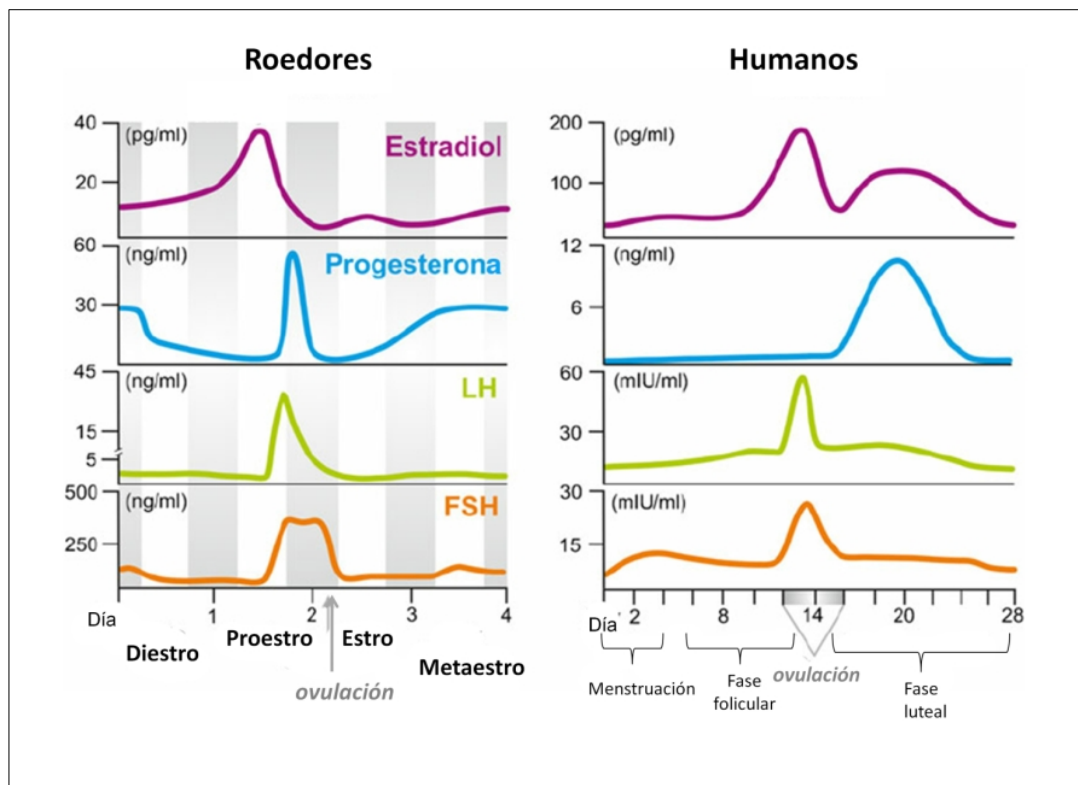


Figura 1.5. Esquema de la foliculogénesis ovárica en la vida postnatal, a partir de la pubertad. En los primeros estadios de la foliculogénesis existiría, principalmente, un control paracrino, mientras que, a partir del desarrollo de folículos preantrales, comenzaría el período dependiente de gonadotrofinas y se podría apreciar un control endocrino de la foliculogénesis en el cual a su vez participarían también señales paracrinas y autocrinas.



Figura

1.6. 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 humana (derecha). Tomado y modificado de (Donner y Lowry, 2013).

Alteraciones ovulatorias en SOP

La anovulación o la oligo-ovulación son síntomas muy frecuentes en mujeres con SOP y la oligomenorrea o amenorrea se presentan muy tempranamente en la adolescencia. El ovario de mujeres con SOP, presenta una apariencia multifolicular con una acumulación de folículos en crecimiento que podría estar comprometiendo el reclutamiento folicular (Webber et al., 2003). Son diversos los factores que intervienen en las alteraciones ovulatorias encontradas en el SOP. Se cree que el medio hormonal alterado, representado principalmente por hiperandrogenismo e hiperinsulinemia, ya sea mediante un aumento de la acción de las gonadotrofinas o regulando

negativamente factores de activación folicular, contribuye al arresto en el reclutamiento folicular (Homburg, 2009; Dumesic y Richards, 2013). Este arresto folicular impide la selección de un folículo dominante. Sin un folículo dominante, capaz de liberar al oocito en respuesta al incremento de LH, no se produce la ovulación ni el proceso normal de retroalimentación negativa necesario para inhibir la secreción de ésta gonadotrofina. Bajo el estímulo trófico de las gonadotrofinas, los folículos arrestados continúan secretando hormonas, que se acumulan en el antro y devienen en la formación de quistes (Franks et al., 2008).

Metabolismo de la glucosa

En las últimas décadas se ha definido al ovario como un importante órgano blanco de acción de la insulina. Existen evidencias de que la insulina es capaz de afectar diversos procesos en el ovario; como el metabolismo de la glucosa, la esteroidogénesis, y la proliferación y diferenciación celular. Estos efectos son relevantes tanto en una fisiología normal como en desórdenes que afectan la función ovárica (Diamanti-Kandarakis y Dunaif, 2012; Dupont y Scaramuzzi, 2016; Zhao et al., 2016)

La glucosa es un importante sustrato energético para la generación de ATP el cual interviene en funciones metabólicas y fisiológicas del ovario. Al mismo tiempo nutre el desarrollo cíclico de varios folículos, regula la maduración y la ovulación del folículo dominante y la posterior formación y mantenimiento de un cuerpo lúteo funcional (Dupont y Scaramuzzi, 2016). Existe una diferencia positiva en la concentración de glucosa en la sangre que fluye hacia y desde el ovario, lo que indica la captación de glucosa por parte del ovario (Rabiee et al., 1997). La glucosa al ser una molécula hidrofílica, necesita de transportadores específicos para ingresar a la célula. Existe evidencia de que varios transportadores de glucosa están presentes en tejido ovárico de diversas especies. En particular se ha demostrado la expresión de GLUT1, 3 y 4 en folículos de ratas (Kodaman y Behrman, 1999; Nishimoto et al., 2006). Asimismo se sabe que el transportador GLUT4, es insulino sensible y su traslocación a la membrana está regulada por la vía de señalización de la insulina.

Acción de la insulina

Ha sido sugerido que la insulina tiene acción gonadotrófica directa en el ovario (Poretsky y Kalin, 1987) y que, *in vitro* la insulina es capaz de estimular la esteroidogénesis en células de la granulosa y la teca, aumentando la producción de andrógenos, estrógenos y progesterona, a través del IR (Poretsky y Kalin, 1987; Poretsky et al., 1999). En los últimos años, se ha sugerido que las acciones gonadotróficas de la insulina están mediadas por interacciones entre las vías de señalización asociadas al IR y a los receptores de gonadotrofinas, en nodos críticos como lo son Akt y MAPK (Taniguchi et al., 2006). Existen evidencias de que en los folículos, hay una comunicación entre insulina y FSH-LH, que tiene consecuencias bioquímicas y fisiológicas en el folículo.

El IR, se expresa en células de la teca y la granulosa de varias especies. Se ha descrito su expresión en oocitos de humanos, bovinos y ratas (Schultz et al., 1992; el-Roeiy et al., 1994). Se ha visto que las vías de señalización asociadas al receptor de insulina son funcionales en el ovario, y que pueden funcionar independientemente de las gonadotrofinas, estimulando el transporte de glucosa hacia las células, la proliferación y diferenciación celular, y la síntesis de ácidos grasos (Dupont y Scaramuzzi, 2016).

Existen varias vías de señalización en el ovario capaz de regular la foliculogénesis y la oogenénesis, entre ellas la vía que involucra a los mediadores PI3-K y Akt, parecería ser la principal vía de regulación no gonadotrófica en diferenciación, crecimiento y supervivencia de los folículos (Edson et al., 2009; Canipari et al., 2012). Diversos trabajos demuestran que la delección de varios genes de esta vía de señalización puede causar falla ovárica prematura e infertilidad, demostrando así la importancia del rol de la vía PI3-K/Akt en la función ovárica. Por ejemplo, se ha visto que ratones deficientes para PDK1 (mediador río abajo de PI3-K, que es activado luego de la unión de IRS con PI3-K), son infértiles y presentan falla ovárica prematura (Reddy et al., 2009). Más aún se ha demostrado que ratones con delección de *Akt*, presentan fertilidad reducida y retardo de la ciclicidad estral (Goto et al., 2007).

La otra vía asociada al receptor de insulina es la dependiente de MAPK-ERK1/2. Esta vía está involucrada en varios procesos en folículos pre-ovulatorios, como la reactivación de la meiosis y la expresión de diversos genes de proliferación y diferenciación celular en el folículo

(Myers et al., 1994; Su et al., 2003). Se ha reportado también que esta vía es capaz de regular la esteroideogénesis y la expresión de genes esteroideogénicos (Seger et al., 2001; Dewi et al., 2002).

Insulino resistencia y SOP en el ovario

La insulino resistencia es una de las características más marcadas presentes en mujeres con SOP. Si bien en pacientes se han descripto varios tejidos como insulino resistentes, con un marcado defecto en la vía metabólica de señalización de la insulina, como el músculo, tejido adiposo e hígado (Corbould et al., 2005; Diamanti-Kandarakis y Dunaif, 2012), existe controversia con respecto a otros tejidos no tradicionales de acción de la insulina, como es el ovario.

Dada la capacidad de insulina de actuar como hormona reproductiva en el ovario, y considerando que frecuentemente se asocia la hiperinsulinemia a hiperandrogenismo y disfunciones ovulatorias (Barbieri y Hornstein, 1988; Seger et al., 2001; Dewi et al., 2002; Baptiste et al., 2010) en los últimos años se comenzaron a evaluar los mecanismos de acción de la insulina en ovarios de pacientes con SOP.

Se ha reportado que células de la granulosa de pacientes con SOP presentan defectos en la vía de señalización de PI3-K/Akt, que compromete el ingreso de glucosa a las células, y que estas alteraciones, así como en otros tejidos esta dado por aumento en la fosforilación de tanto IR como de sus sustratos IRS en residuos serina. Esta insulino resistencia en el ovario, parece ser selectiva, dado que afecta únicamente la vía metabólica de la insulina. La capacidad esteroideogénica de la insulina no se ve afectada (Diamanti-Kandarakis et al., 2008; Rice et al., 2011; Wang et al., 2017b). Esta insulino resistencia selectiva concuerda con lo observado en músculo esquelético y fibroblastos de paciente con SOP, donde la vía PI3-K estaba alterada pero no la vía que involucra a las MAPK (Rice et al., 2005; Corbould et al., 2006).

Existe cierta controversia sobre los efectos de la insulino resistencia en la vía mitogénica de acción de la insulina en el ovario. Estudios demuestran que en células de la teca de pacientes con SOP, la actividad de ERK1/2 estaba disminuida en un 50% al compararlo con células de la teca normales, y que esta alteración podría estar relacionada con el aumento de la producción de andrógenos en el SOP (Nelson-Degrave et al., 2005). Estos resultados muestran que la insulino

resistencia parecería ser selectiva no solamente a nivel de mecanismos de regulación sino también célula-específico. Esta paradoja con respecto a si el ovario es insulino resistente o sensible todavía queda por resolverse.

Fisiología de los Receptores Nucleares Activados por Proliferadores Peroxisomales (PPARs)

Las funciones reproductivas dependen de la disponibilidad de recursos energéticos. Asimismo, los mecanismos que regulan el balance energético se encuentran vinculados con los sistemas de control reproductivo y juntos deben garantizar el éxito en la reproducción bajo condiciones metabólicas cambiantes (Loucks, 2003; Chan et al., 2015). Actualmente sabemos que el cerebro y las estructuras hipotalámicas reciben señales metabólicas y endocrinas que proveen información sobre el estado nutricional y el grado de de los depósitos grasos (Hill et al., 2008) En el ovario las señales derivadas del estado nutricional modulan su función (Butler, 1998; Chan et al., 2015). Se postulan diversos candidatos como posibles mediadores entre el estado nutricional y el funcionamiento de las diversas estructuras de este tejido (Scaramuzzi et al., 2010) destacándose entre ellos, los PPARs.

Los PPARs pertenecen a la super familia de receptores nucleares, que se activan por la unión de ligandos específicos (naturales o sintéticos) y regulan la expresión de genes involucrados en el metabolismo de los lípidos y de la glucosa, formando así una conexión directa entre las señales extracelulares y la expresión de genes. La familia de los PPAR se compone de PPAR alfa (PPAR α), beta/delta (PPAR β /d) y gama (PPAR γ) (Issemann y Green, 1990). Los 3 isotipos de PPARs se codifican en diferentes genes y de cada uno de ellos existen variantes por producto de *splicing* alternativo y del uso de distintos promotores (Komar, 2005). Se identificó la presencia de PPARs en diversas especies, incluyendo la rata y el humano (Huang, 2008).

Estructura y mecanismos de regulación de PPARs

Los PPARs, al igual que otros receptores nucleares, poseen una estructura compuesta por dominios funcionales (Fig 1.7). La secuencia aminoacídica primaria de los PPARs está compuesta

por un dominio AF-1, dominio de unión al ADN (DBD), dominio D y el dominio de unión al ligando (LBD). El dominio AF-1 presenta una función de transactivación independiente de ligando. El dominio de unión al ADN es responsable de la unión a la secuencia de elementos de respuesta a proliferadores peroxisomales (PPRE) que se encuentra en la región promotora de los genes blanco. El dominio D es una región bisagra que puede modular la unión al ADN y está involucrada en la unión a co-represores. El dominio de unión al ligando tiene una fuerte función de activación dependiente de ligando y también es el dominio de dimerización y de interacción con co-factores. El "bolsillo" de unión al ligando presenta un mayor tamaño en comparación con el de otros receptores nucleares, esta diferencia permite que los PPARs interactúen con una amplia gama de ligandos naturales y farmacológicos estructuralmente distintos (Berger y Moller, 2002; Komar, 2005).



Figura 1.7. Dominios estructurales y funcionales de la familia de los PPARs.

Mecanismos de regulación de PPARs

Los PPARs se unen específicamente al ADN como heterodímeros junto al receptor de ácido 9-cisretinoico (RXR). El mecanismo de acción clásico de estos receptores es similar al que presentan otros miembros de esta familia (Fig 1.8). La unión del ligando al heterodímero, provoca un cambio conformacional en la estructura llevando a la disociación de proteínas co-represoras y el reclutamiento de co-activadores las cuales habilitan la unión del complejo a las secuencias PPRE del ADN, permitiendo la activación de la transcripción de genes blancos (Desvergne et al., 2006).

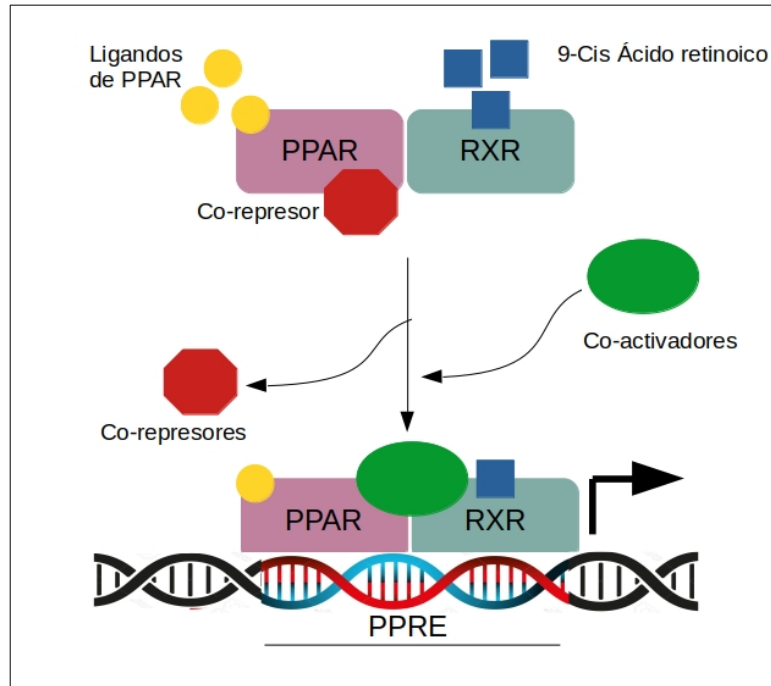


Figura 1.8. Mecanismo clásico de acción de los PPARs. El heterodímero PPAR-RXR se une a las regiones PPRE localizadas en el promotor de genes blanco. La unión del ligando induce un cambio conformacional en PPARs que permite su disociación de factores co-represores y el reclutamiento de factores co-activadores que activan la transcripción génica.

PPAR γ y su función en el ovario

Se ha postulado a PPAR γ como un posible candidato de regulación de la relación que existe entre el estado energético y las funciones reproductivas. PPAR γ en el ovario, censa el estado nutricional en los folículos (Froment et al., 2003). A su vez, está involucrado en la regulación del mecanismo de la glucosa y el metabolismo lipídico, en parte mediante la modulación de la vía de señalización de la insulina. Más específicamente, la activación de PPAR γ altera la expresión génica y aumenta la sensibilidad de los tejidos (como el músculo y el adiposo) a la insulina y disminuye la intolerancia a la glucosa. Más aún, en células del ovario se demostró que la activación de PPAR γ exhibe efectos directos, tanto a través de la vía de la insulina como independientes de la misma (Seto-Young et al., 2005). Se ha demostrado que la activación de PPAR γ es capaz de modular la esteroidogénesis, la foliculogénesis y la maduración

del oocito (Schoppee et al., 2002; Komar, 2005) y que la delección del gen de PPARg provoca subfertilidad (Cui et al., 2002).

Mecanismos de regulación de PPARg

Complejos de co-represores son reclutados por PPARg en ausencia de ligando, al igual que en otros receptores nucleares. Uno de los principales co-represores de PPARg es el co-represor nuclear NcOR, que se ha demostrado que su unión a PPARg, regula negativamente su actividad, disminuyendo la expresión de sus diversos genes blancos (Yu et al., 2005). Recientemente se ha descrito un novedoso mecanismo de regulación de PPARg en adipocitos, donde en ausencia de ligandos la unión de este factor de transcripción con su represor NcOR promueve la unión de la ciclina dependiente de quinasa 5 (CDK5) al complejo. Se sabe que CDK5 es capaz de fosforilar a PPARg en diversos residuos y así regular su actividad, y que la unión de agonistas sintéticos como las glitazonas a PPARg disminuyen la interacción de éste con CDK5 y su fosforilación (Fig 1.9) (Choi et al., 2011; Li et al., 2011; Rai et al., 2014, p 5).

Varios estudios han demostrado que PPARg, como otros receptores nucleares, son fosfoproteínas. La fosforilación de los PPARs es capaz de modular su actividad, en donde se han visto involucradas varias vías de señalización dependientes de quinasa. Una de las vías más importantes en la regulación de la fosforilación de los PPARs, es la de MAPK. Se ha observado que MAPK-ERK, es capaz de fosforilar a PPARg en diversos residuos serina (Fig 1.9). Estos eventos regulan la actividad de PPARg a diferentes niveles, dado que pueden modular la afinidad del receptor con su ligando, la unión de co-represores y la unión a los sitios PPRE, disminuyendo la actividad de PPARg (Zhang et al., 1996a; Shao et al., 1998; Diradourian et al., 2005; Burgermeister et al., 2007). Más aún Banks y colaboradores (Banks et al., 2015) han demostrado, en ratones obesos, que la quinasa ERK es capaz de fosforilar directamente a PPARg en el sitio serina 273, al igual que CDK5. Esta fosforilación desregula varios genes blancos de PPARg en tejido adiposo, y agrava el estado de insulino resistencia presente en estos ratones.

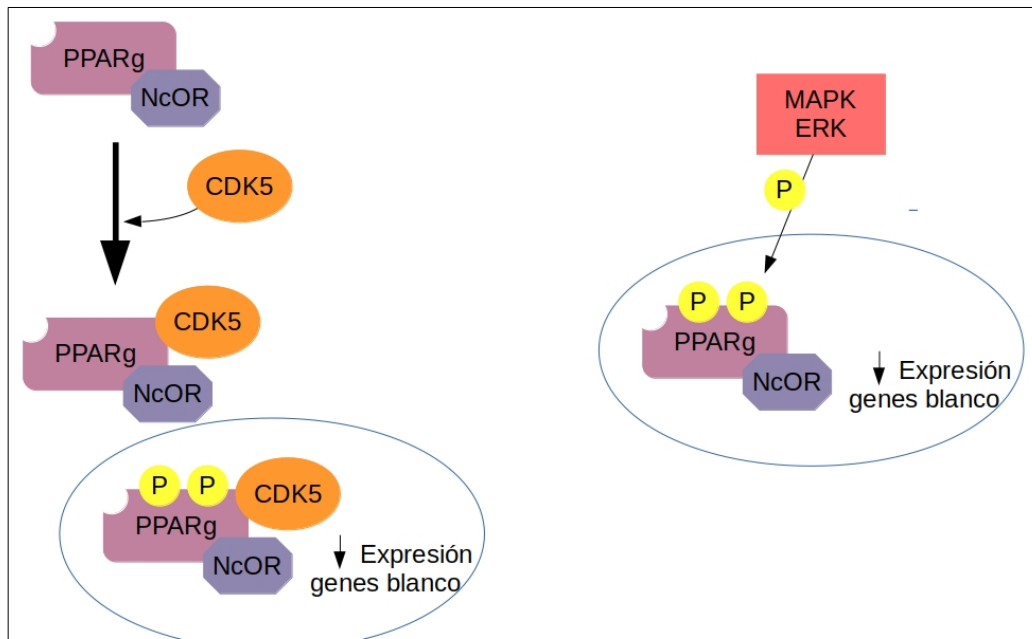


Figura 1.9. Mecanismos de regulación de PPAR γ , por su co-represor NcoR, promoviendo la unión de la ciclina CDK5, que es capaz de fosforilar a PPAR γ e inactivarlo. La fosforilación se puede dar a su vez por otras quinasas como las MAPK.

Activación del sistema PPAR γ y SOP

El tratamiento con ligandos exógenos de PPAR γ (tal como la pioglitazona y rosiglitazona) en mujeres con SOP, se ha utilizado para inducir la ovulación y mejorar los síntomas reproductivos del síndrome (Dunaif et al., 1996; Seli y Duleba, 2004; Wu et al., 2018). Se ha observado que la activación de PPAR γ modula la transcripción de genes involucrados en el metabolismo de la glucosa y de lípidos (Smith, 2001; Leonardini et al., 2009; Ahmadian et al., 2013). En pacientes con insulino resistencia, la activación de este factor es capaz de aumentar la sensibilidad a la insulina, mejorando el cuadro metabólico (Dunaif et al., 1996; Iozzo et al., 2003; Bhatia y Viswanathan, 2006). Debido a que PPAR γ no sólo puede modular las hormonas esteroideogénicas, sino también 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, una acción indirecta, que involucraría la sensibilización a la insulina (Froment et al., 2006).

Metformina

La metformina, N,N dimetil biguanida, es la droga más comúnmente utilizada en el tratamiento de diabetes de tipo 2, dada su gran capacidad anti hiperglucemiante. Su acción principal radica en inhibir la producción de glucosa hepática e incrementar la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos (Foretz et al., 2014). En los últimos años, sin embargo se ha puesto de manifiesto su acción pleiotropica en diversos tejidos que se ven afectados por hiperinsulinemia o insulino resistencia. Se ha visto que a demás de actuar sobre el hígado, ejerce sus efectos sobre músculo esquelético, tejido adiposo, endotelio y ovario (Palomba et al., 2009; Diamanti-Kandarakis et al., 2010). En consecuencia la metformina ha sido frecuentemente utilizada como tratamiento en el SOP, dada su gran capacidad de no solamente atenuar las consecuencias metabólicas del síndrome sino también las reproductivas (Palomba et al., 2009).

Existen varios mecanismos de acción por los cuales la metformina es capaz de ejercer sus efectos. En el hígado su acción principal es la inhibición de la gluconeogénesis afectando directamente diversas enzimas gluconeogénicas. Asimismo puede reducir la absorción hepática de los sustratos necesarios para la gluconeogénesis y estimular la entrada de glucosa en las células modulando la vía de acción de la insulina (Fulgencio et al., 2001; Iozzo et al., 2003; Yuan et al., 2003).

El mecanismo de acción de la metformina más aceptado, involucra la activación de la proteína quinasa activada por monofosfato adenina (AMPK). AMPK es un regulador central de la homeostasis energética, que coordina varias vías metabólicas. Actúa como regulador maestro de la lipogénesis, la oxidación de ácidos grasos y la gluconeogénesis. A su vez es capaz de activar factores de transcripción involucrados en diversos procesos energéticos (Zhou et al., 2001; Kim et al., 2016; Garcia y Shaw, 2017). En particular en el hígado se ha reportado que la metformina es capaz de suprimir la expresión de varias enzimas lipogénicas y glucogénicas a través de la activación de AMPK. Esto resulta en una disminución de tanto la lipogénesis como la gluconeogénesis y un aumento de la oxidación de ácidos grasos (Shaw et al., 2005; Kim et al., 2008; Viollet et al., 2012).

El tratamiento con metformina tiene efectos beneficiosos sobre las alteraciones reproductivas encontradas en pacientes con SOP. Se ha reportado que es capaz de aumentar la

tasa de ovulación, mejorar las alteraciones en el ciclo menstrual y reducir los niveles de andrógenos circulantes (Nestler, 2008). Estudios realizados en cultivos de células de la teca de pacientes con SOP, han demostrado la capacidad de la metformina en regular enzimas esteroidogénicas. Estos efectos se han atribuido a la mejora de las condiciones metabólicas en las pacientes, en particular la disminución de la hiperinsulinemia (Nestler y Jakubowicz, 1996; Diamanti-Kandarakis y Papavassiliou, 2006). Asimismo se ha reportado que la metformina es capaz de disminuir la esteroidogénesis en células de la teca a través de la activación de AMPK (Attia et al., 2001; Tosca et al., 2007). Dado los distintos efectos de metformina en el ovario se cree, que esta es capaz de actuar de manera dual: directamente a través de la activación de AMPK, e indirectamente al mejorar la hiperinsulinemia. Por otro lado, también se ha reportado que la metformina es capaz de actuar directamente en células de la granulosa sobre la vía de señalización de la insulina, activando diversos mediadores de la vía, por lo tanto mejorando no solo la captación de glucosa en las células sino también, aumentando la sensibilidad a la insulina en el ovario (Rice et al., 2011). A pesar de la gran cantidad de trabajos que existen, no se conocen fehacientemente todos los mecanismos de acción de la metformina ni el alcance total de sus efectos.

II. Hipótesis y Objetivos

Hipótesis de trabajo

1-La hiperandrogenización prenatal induce programación fetal que afecta la vía de señalización de la insulina en el hígado y en el ovario, generando así un estado de insulino resistencia que repercute sobre las funciones reproductivas.

2-El tratamiento con metformina mejora el estado de insulino resistencia y los defectos en la vía de la insulina en hígado y ovario.

Objetivo general

Evaluar nuevos mecanismos moleculares asociados a la señalización de la insulina en tejido hepático y ovárico de ratas hiperandrogenizadas prenatalmente. Y estudiar la acción de la metformina como tratamiento.

Objetivos específicos

1. Evaluar la expresión génica de mediadores de las vías de señalización asociados a la acción de insulina en hígado de ratas adultas hiperandrogenizadas prenatalmente.
2. Evaluar la expresión génica y proteica de mediadores de la vía metabólica de la insulina, así como su activación, en el ovario de ratas adultas hiperandrogenizadas prenatalmente.
3. Evaluar si la hiperandrogenización prenatal altera la expresión y la activación de los receptores nucleares PPAR γ en ovarios de ratas.
4. Evaluar los mecanismos de regulación de la actividad de PPAR γ .
5. Analizar los efectos del tratamiento con metformina sobre los diferentes parámetros analizados.

III. METODOLOGÍA

Modelo Experimental

Animales

Ratas hembras adultas de la cepa Sprague-Dawley fueron puestas en apareo con machos de la misma cepa, en una proporción de 5 hembras por macho, por jaula. Se determinó preñez por la presencia de espermatozoides en el extendido vaginal. La detección de espermatozoides en el extendido vaginal se consideró día 0 de preñez. Las hembras preñadas son separadas y colocadas una por jaula: cada hembra se utilizó para una única preñez. El nacimiento de las crías en las condiciones del Bioterio del CEFyBO ocurre en el día 21 de gestación. Los animales tuvieron acceso *ad libitum* a alimento (Purina Regular Chow) y agua con un fotoperíodo 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, y la “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” U.S. National Research Council, 1996.

Modelo hiperandrogenización prenatal

Como modelo murino que emula características tipo SOP, utilizamos un modelo de programación fetal por hiperandrogenización prenatal. Para el cual hembras preñadas fueron inyectadas de forma subcutánea entre los días 16 y 19 de preñez con 1 mg de testosterona (Sustanon 250, Organon) disuelta en 100 μ l de aceite de maíz (Fig 3.3). Los controles solo recibieron aceite (vehículo). Esta intervención no induce reabsorción embrionaria, disminución de crías por camada, alteración del día de parto ni la proporción macho/hembra (Amalfi et al., 2012; Heber et al., 2013). Las crías permanecen en la misma jaula que la madre hasta el momento del destete, a los 22-25 días de edad, se separaron las crías hembras. Las crías de las madres que fueron hiperandrogenizadas durante la preñez corresponden al grupo hiperandrogenizado prenatalmente (HP) y las crías de las madres inyectadas con vehículo corresponden al grupo control. Este procedimiento se repitió en 3 ocasiones diferentes con el objetivo de determinar un n=25 de camadas totales por cada tratamiento.

Determinación de fenotipo reproductivo

Para la determinación del fenotipo reproductivo, se evaluó el ciclo estral de los animales por muestras por extendido vaginal que fueron observadas en microscopio de luz, se determinó el estadio del ciclo, siendo este: Proestro, Estro, Metaestro y Diestro (Fig 3.1), de acuerdo al contenido de células presentes en dicha muestra (Fig 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** presenta predominio de células de tipo leucocitaria y pocas células epiteliales cornificadas, por último en el **estadio Diestro** 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.

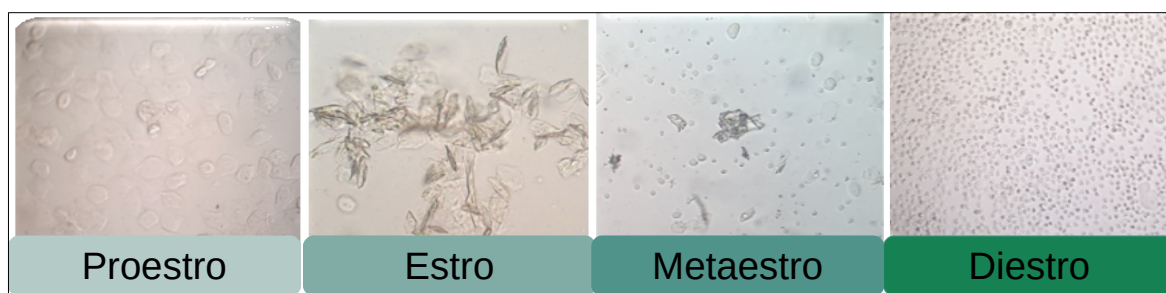


Figura 3.1. Detalle de los tipos celulares que se pueden apreciar en cada uno de los estadios típicos, en ratas controles, al visualizar los extendidos vaginales a microscopio óptico.

Establecimiento de la regularidad del ciclo estral

Los animales se clasificaron según la regularidad o no del ciclo (Karim et al. 2003) (Fig 3.2) 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.

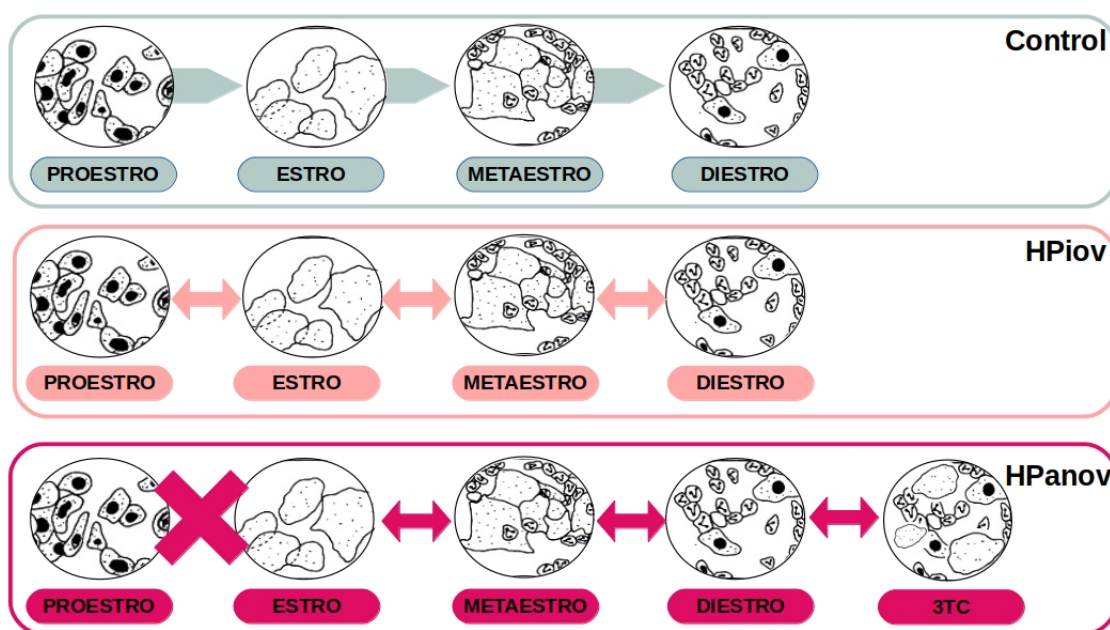


Figura 3.2 Esquema de los tipos de ciclos estrales encontrados y criterios utilizados para la determinación de los fenotipos. Proestro: se detecta presencia de células nucleadas redondas principalmente; Estro: se detecta principalmente células cornificadas; Metaestro: se detectan células cornificadas 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.

Una vez determinado el fenotipo reproductivo, a partir del día 70 de vida, a la mitad de cada grupo experimental (control, HPiov, HPanov), se lo sometió a un tratamiento diario con 50 mg/kg de metformina, administrada por vía oral; hasta el momento de la eutanasia, entre los 90 y 100 días de edad (Fig 3.3).

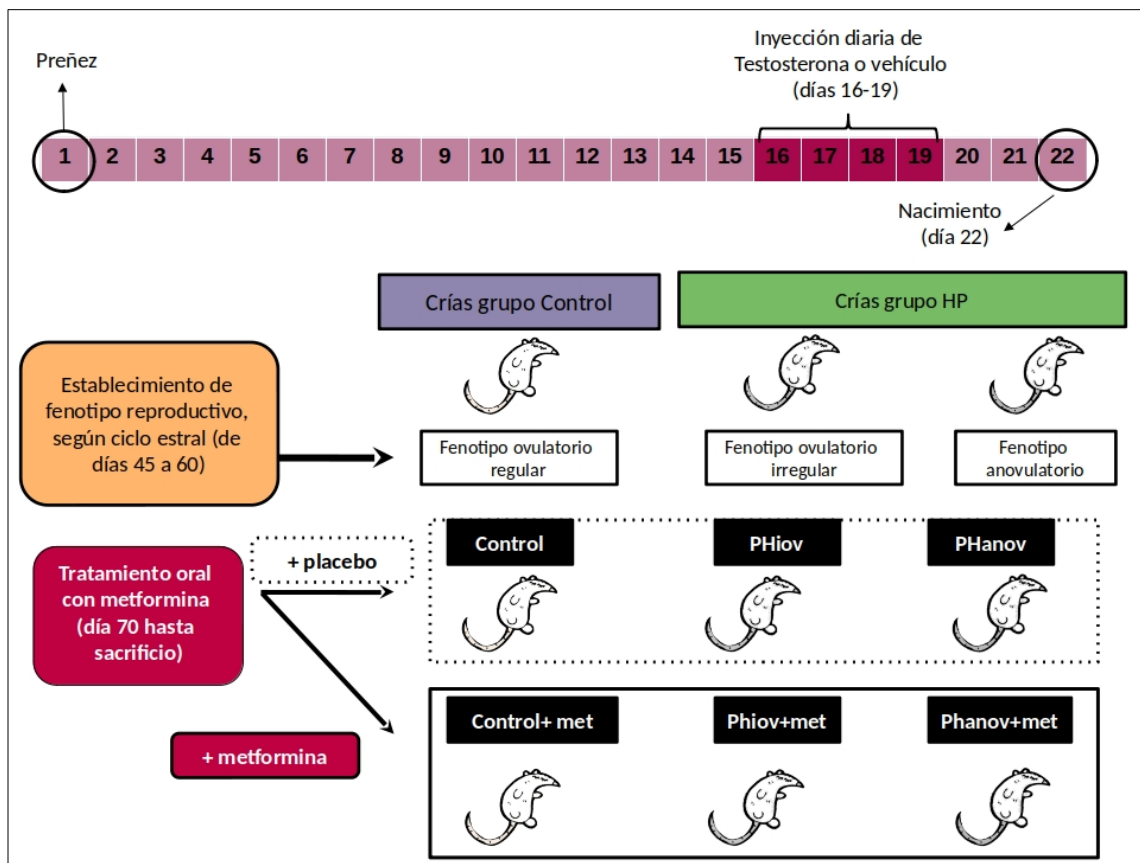


Figura 3.3: Esquema del modelo utilizado.

Obtención de tejidos

A la edad de sacrificio (90 a 100 días de edad), los animales fueron anestesiados en una cámara saturada de dióxido de carbono (CO₂) y se sacrificaron por decapitación. Se colectó la sangre y se aisló el suero por centrifugación a 1000 g durante 15 minutos. Se extrajeron los ovarios y el hígado luego se almacenaron todas las muestras a -80 °C hasta su utilización, excepto las muestras de tejido ovárico destinadas a estudios histológicos, las cuales fueron

inmediatamente colocadas luego de la disección en una solución de paraformaldehído al 4% V/V. Previo a la eutanasia se determinó el peso corporal de los animales.

Estudios histológicos

Morfología del tejido por técnica de Hematoxilina-Eosina

Para los análisis de la morfología ovárica 5 ovarios de cada grupo experimental previamente fijados en paraformaldehído al 4% (v/v), se deshidrataron e incluyeron en parafina. En forma resumida, los tejidos se sumergieron en etanol al 70% (EtOH) 3 veces x 10 minutos, luego en EtOH 90% 2 veces x 20 minutos y en EtOH 100% 3 veces x 30 minutos. Luego, se sumergieron en xileno 3 veces x 20 minutos. Posteriormente fueron embebidos en parafina a 58 °C. A continuación, las muestras en parafina fueron cortadas consecutivamente (5 µm de espesor) y colocadas en portavidrios positivados (Termo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Los cortes fueron coloreados con hematoxilina y eosina para poder determinar las diferentes estructuras foliculares.

Se clasificaron las diferentes estructuras foliculares siguiendo el siguiente criterio:

Folículos primordiales (FP): 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 ovariano. Además, el núcleo del oocito es grande comparado al citoplasma.

Folículos preantrales (F Pr), donde se incluyen a:

*Folículos primarios: Ya hay presencia de una camada de células de granulosa cuboides, con la zona pelúcida rodeando al oocito. Estos folículos suelen aparecer próximos a PFs. Observación: los folículos primarios pueden presentar distintos tamaños, ya que el oocito comienza a crecer antes de que se produzca la multiplicación de las células de granulosa.

*Folículos secundarios: Este folículo posee 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 (FA): 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.

Quistes ováricos (Q): 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 (Abramovich et al., 2012)

Determinaciones séricas

En suero de ratas se realizó la medición sérica de testosterona (T), estradiol (E2), progesterona (P4), glucosa, insulina e índice HOMA-IR.

Radioinmunoensayo de T en suero:

Los niveles de T fueron determinados por Radioinmunoensayo (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 fueron cuantificados por un inmunoensayo COBASE realizando un ensayo de inmunoelectro-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 Radioinmunoensayo

Los niveles de progesterona en suero fueron cuantificados por radioinmunoensayo (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 por ELISA de insulina

Los niveles basales de insulina sérica 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

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

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.

El cálculo realizado fue:

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

Ecuación 3.1. Ecuación utilizada para el cálculo de HOMA-IR

Determinación de RNA mensajero en tejidos

Aislamiento de RNA

El contenido total de RNA mensajero de los ovarios e hígado de ratas de los distintos tratamientos se obtuvo utilizando RNAzol RT (Molecular Research Center, Inc. Cincinnati, OH, E.E.U.U.) siguiendo el protocolo correspondiente. Brevemente, el tejido se homogeneizó en 1ml de RNAzol. Al homogenato se le agregó 400µl de agua libre de RNAsas, se agitó durante 15 segundos y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12.000g durante 15 minutos, la fase acuosa obtenida contiene el RNA solubilizado.

El sobrenadante (fase acuosa) se transfirió a un nuevo tubo para precipitar el RNA con 400µl de Etanol 75% centrifugando a 12.000g durante 8 minutos. A continuación se lavó por duplicado con Etanol 75% el precipitado, centrifugando en cada paso a 8000g durante 3 minutos. El RNA obtenido en el pellet se re suspende en agua libre de RNAsas. Se cuantificaron las muestras en Nano Drop. Luego las muestras fueron fraccionadas y almacenadas a -70°C para posterior utilización.

Obtención de cDNA

A partir del ARNm total obtenido de los ovarios e hígado de los distintos grupos experimentales se obtuvo el ADNc correspondiente mediante su retrotranscripción utilizando random primers y Transcriptasa Reversa del Virus de Leucemia Murina Moloney (MMLV RT, Promega), siguiendo las especificaciones del productor. Brevemente, se colocó en un tubo de pcr 500ng de ARN, y 2µg de random primers (B070-40 Byodinamics) en un volumen final no superior a 14 µl. Se llevo la mezcla de ARN y random primers a 70°C durante 5 minutos y luego se cortó la reacción llevandolo a 4°C. Luego se aplicó un spin de manera de colectar toda la muestra en el fondo del tubo. Posteriormente se adicionaron los siguientes reactivos en el orden indicado: 5µl de Buffer RT-MMLV 5X (Tris-HCl 250 mM; KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM y DTT 50 mM), 5µl de una mezcla dNTPs (dATP 10mM; dGTP 10mM, dGTP 10mM, http 10mM), RT-MMLV 200U y agua bidestilada hasta completar los µl. Se mezcló delicadamente y se incubó por 60 minutos a 37°C. Las muestras de ADNc sintetizadas se guardaron a -70°C hasta la realización de la PCR correspondiente.

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 específicos (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 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 (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 como control endógeno. La expresión matemática utilizada para calcular estas relaciones fue: $2^{-\Delta\Delta Ct}$

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

$\Delta Ct \text{ muestra} = Ct \text{ gen en estudio} - Ct \text{ gen endógeno}$.

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

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 transcripto de interés y posteriores curvas de disociación.

Genes	Primer forward (5´-3´)	Primer Reverse (5´-3´)
<i>Ir</i>	ATG GGA CCA CTG TAC GCT TC	TCG ATC CGT TCT CGA AGA CT
<i>Irs-1</i>	TGT GCC AAG CAA CAA GAA AG	ACG GTT TCA GAG CAG AGG AA
<i>Irs-2</i>	GGA AGT CTG TTC GGG TGT GT	ACA TCT GCT TCA GTG TGC TG
<i>Glut4</i>	GGC CGG GAC ACT ATA CCC TA	GGA GGA AAT CAT GCC ACC CA
<i>Psmb2</i>	TCG GAG TCG GAC CCC TTA TC	TGT AGT AAA GTG CTG GCC CC
<i>Rrl32</i>	TGG TCC ACA ATG TCA AGG	CAA AAC AGG CAC ACA AGC
<i>Glut2</i>	GTT TTG GGT GTT CCT CTG GA	TGA TCC TTC CGA GTT TGT CC
<i>Pparg</i>	TTT TCA AGG GTG CCA GTT TC	GAG GCC AGC ATG GTG TAG AT
<i>Sreb</i>	TAA CCT GGC TGA GTG TGC AG	ATC CAC GAA GAA ACG GTG AC
<i>Chrebp</i>	GGT TGT CCC CAA AGC AGA GA	TTG TTG TCT ACA CGA CCC CG
<i>Pepck</i>	GGA GAC CAC AGG ATG AGG AA	TTC GTA GAC AAG GGG GAC AC

Tabla 3.1. Lista de primers usados en la cuantificación del ARNm por Real time PCR

Determinación de los niveles proteicos

Extracción de proteínas

Se homogeneizó el tejido en 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.) durante 20 min a 4 °C. El lisado luego fue centrifugado a 4 °C durante 10 min a 10.000 g y el pellet descartado. Se utilizó el sobrenadante, a partir del cual también se determinó la concentración de proteínas por el 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 3.2) 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, UK). 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.

Anticuerpos	Dilución utilizada
Anti-B IR (Santa Cruz (c-19))	1:1000
Anti-IRS-1/2 (Santa Cruz (sc-559))	1:500
Anti-IRS-1pY612 (Abcam (ab66153))	1:800
Anti-IRS-1pS307 (Santa Cruz (sc- 33959))	1:300
Anti-GLUT 4 (Novus Biological (51262))	1:500
Anti-AMPK (Cell Signaling #2532)	1:1000
Anti-AMPKpT172 (Cell Signaling #2535)	1:500
Anti-AKT (Cell Signaling #9272)	1:1000
Anti-ACCp S79 (Cell Signaling #3661)	1:1000
Anti- PPARg 1+2 (Abcam (ab41928))	1:1000
Anti PPARg pS273 (Aviva Systems Biology #OABF01492)	1:500
Anti-CDK5 (Santa Cruz (sc-173))	1:200
Anti-Bactin (Cell Signaling #4967)	1:5000
Anti-BTubulin (Abcam (ab131205))	1:1500
Anti-Mosue IgG H&L (HRP) (Abcam (ab6728))	1:5000
Goat Anti-Rabbit IgG-HRP (Bio Rad Life Scinece #1706515)	1:3000

Tabla 3.2. Lista de anticuerpos utilizados, con la dilución correspondiente.

Análisis de interacción proteica por co-IP

Se homogenizaron 25 mg de ovario (n=5 ovarios por tratamiento) en 500uL de buffer de lisis no desnaturante (200mM Tris-HCl pH=8, 137 mM NaCl, 10% glicerol, % NP-40, 2nM EDTA pH=8). Al momento de realizar la homogenización del tejido se agregaron 5uL 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 frio durante 20 minutos y se recuperó el sobrenadante. Se agregó 1ug de anticuerpo anti PPARg1+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, descartandose el sobrenadante y recuperándose el precipitado;

C) lavado con agua destilada calidad biología molecular;

D) centrifugación a 2000g por 1 minuto, descartandose 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.

Evaluación del balance oxidatante/antioxidante

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 (Fig 3.4). Al reducirse, el DTNB forma un compuesto coloreado, el 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB) que es posible cuantificar a 412 nm. 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. Se midió la concentración de GSH en tejido hepático. Brevemente, el tejido ovárico (1 ovario) fue homogeneizado en ácido tricloroacético (TCA 0.5% p/v) con un homogeneizador UltraTurrax a 4°C y posteriormente el homogenato fue centrifugado a 9000 x g por 10 min a 4°C en centrífuga Sorvall. Luego, se colocaron 900 µl de buffer fosfato 50 mM, 100 µl de muestra, 50 µl de NADPH, 20 µl del reactivo de Ellman (DTNB) y, en último lugar, 20 µl 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 µmoles de GSH/mg de tejido.

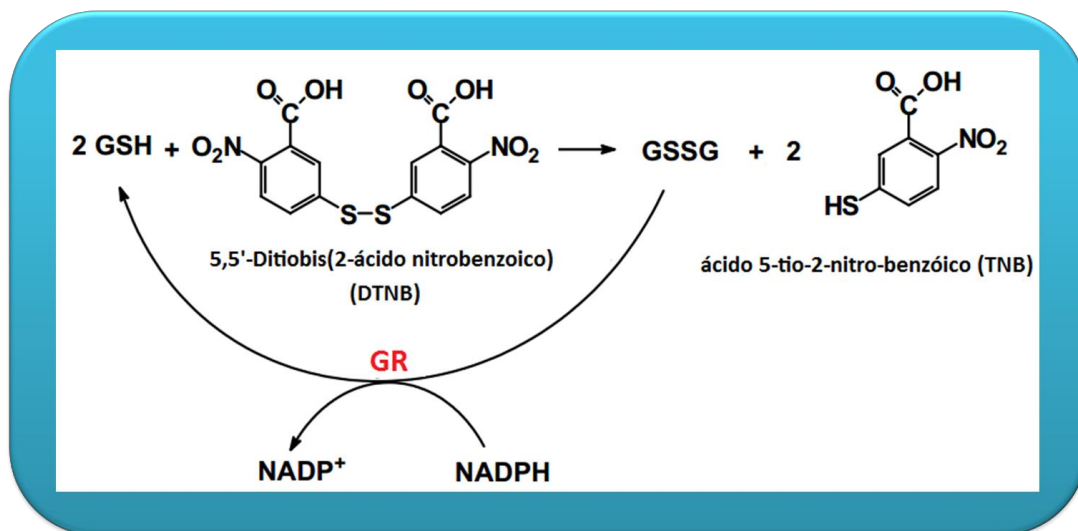


Figura 3.4 : Reacción de reciclaje del GSH-GSSG en presencia de DTNB. Dos moléculas de GSH se oxidan a una molécula de GSSG y en la misma reacción se reduce el DTNB y forma TNB (compuestos coloreados amarillo). Mientras que se encuentren en exceso la enzima y el NADPH la reacción continúa. La tasa de producción de TNB se relaciona directamente con la cantidad de GSH total presente en el sistema.

Índice de peroxidación lipídica por cuantificación de malondialdehído (MDA)- TBArS

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 que puede cuantificarse a 535 nm en espectrofotómetro, permitiendo estimar de esta manera la concentración de MDA.

Se evaluó la concentración de MDA en tejido hepático. Brevemente, el tejido fue homogeneizado y fraccionado tal como se especificó previamente en el protocolo correspondiente a la determinación de GSH. Se realizó una curva de calibración de MDA, cuyo rango de concentración varía desde 0.0125 - 24mM. Luego, se incubaron 350 µl de las distintas concentraciones de la curva o las muestras, con 650 µl de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67 % p/v (TCA 15% p/v, TBA 0.375 % p/v, HCl 0.25 N) por 20 minutos a 100°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, y los resultados se expresaron como $\mu\text{moles MDA/mg}$ de tejido.

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 análisis de ANOVA de dos factores (siendo estos: 1) hiperandrogenización prenatal; 2) tratamiento con metformina) con test post-hoc de Tukey.

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

IV. Capítulo 1. Efectos de la hiperandrogenización prenatal: caracterización del modelo

Capítulo 1. Efectos de la hiperandrogenización prenatal: caracterización del modelo.

Ciclo estral

Se clasificaron las crías hembras según el ciclo estral luego de la etapa puberal. Como se puede observar en la tabla 4.1 la hiperandrogenización prenatal genera alteraciones en el ciclo estral, generando dos fenotipos con características esperadas para modelos SOP, el grupo HP ovulatorio regular no fue considerado para los análisis dado que no presenta quistes ováricos, ni oligo o anovulación, algunas de las características de SOP. 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
70 a 90 días (adultez)	100%	8-11%	49-50%	38-43%

Tabla 4.1: 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=15 madres. Los resultados son presentados como un rango (mín.-máx.).

Utilizando esta clasificación realizada a partir de la etapa puberal, a la mitad de cada grupo se lo sometió a un tratamiento diario con metformina, y se continuó evaluando el ciclo estral de los mismos. Se clasificaron los grupos según el ciclo al momento de la eutanasia. Como se puede observar en la tabla 4.2 el tratamiento con metformina fue capaz de revertir parcialmente en ambos fenotipos las irregularidades en el ciclo causadas por la hiperandrogenización prenatal.

<i>Fenotipo del grupo HPanov post-metformina</i>			<i>Fenotipo del grupo HPiov post-metformina</i>		<i>Fenotipo del grupo control post-metformina</i>
11-27% Anovulatorio	47-79% Ovulatorio irregular	11-27% Ovulatorio regular	28-40% Ovulatorio irregular	40-61% Ovulatorio regular	100% Ovulatorio regular

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=15 madres. Los resultados son presentados como un rango (mín.-máx.).

Morfología ovárica

El análisis histológico de los ovarios, utilizando coloración con hematoxilina-eosina, mostró en el grupo control una apariencia normal para un ovario en etapa adulta; una médula central formada principalmente por estroma fibromuscular, cuerpos lúteos y folículos antrales ubicados en la corteza periférica (Fig 4.1A).

En ambos grupos HP se observaron cuerpos lúteos, con luteinización anómala, con gran cantidad de vacuolas (Fig 4.1G). También se observó la presencia de quistes ováricos ubicados en la corteza periférica, caracterizados por un compactamiento de las células de la granulosa hacia la capa de células tecaes, se observó también una compresión del oocito dentro de la pared del quiste (Fig 4.1H e I); y un exceso de folículos preantrales (Fig 4.1). A su vez en el fenotipo HPanov se observó una desorganización del ovario y una invasión de folículos pequeños hacia la médula.

Al evaluar la morfología ovárica luego del tratamiento con metformina, se pudo observar que tanto el fenotipo ovulatorio irregular como el anovulatorio presentan una apariencia similar al ovario control, donde se observó la presencia de cuerpos lúteos normales, folículos en diversos estadios de desarrollo y folículos antrales pre-ovulatorios (Fig 4.1D, E y F).

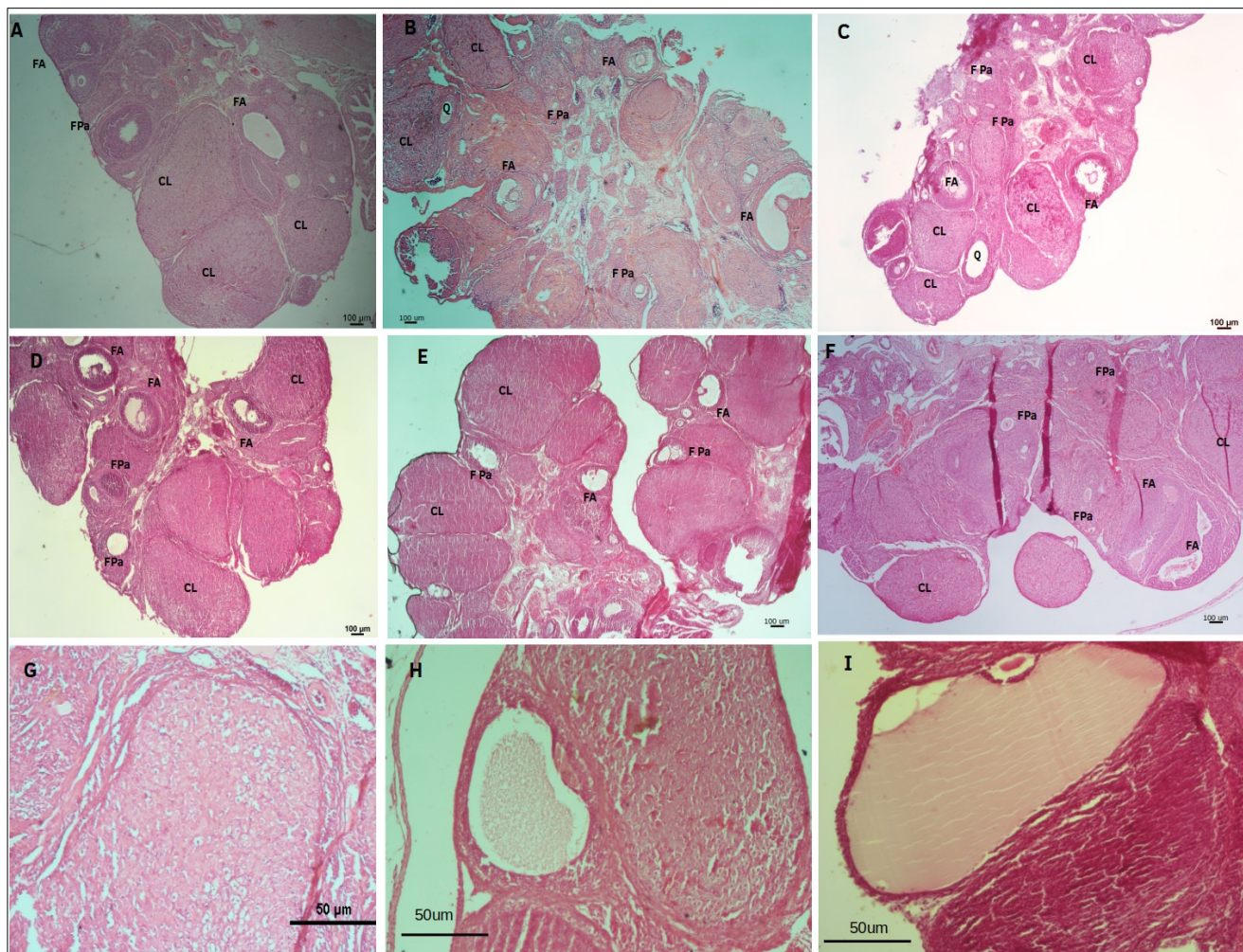


Figura 4.1. Análisis histológico de ovarios: (A) Sección de ovario correspondiente a animales del grupo control, (A: 40X). (B) Sección de ovario correspondiente a animales del HPiov (A: 40X), con folículos en diferentes estadios de desarrollo. (C) Sección de ovario de animales HPanov, (A: 40X). (D) Sección de ovario de animales control + metformina, (A: 40X). (E) Sección de ovario de animales HPiov + metformina, (A: 40X). (F) Sección de ovario de animales HPanov + metformina, (A: 40X). (G) Detalle de cuerpo lúteo de animales HP, con vacuolas, (A:100X). (H) e (I) Detalle de quistes ováricos.

Parámetros hormonales

Evaluamos los niveles séricos de tres hormonas esteroides: testosterona, estradiol y progesterona. Los niveles de testosterona (Fig 4.2A) se encuentran aumentados en el grupo HPanov, y se observa una tendencia a aumentar en el grupo HPiov, el tratamiento con metformina no tuvo ningún efecto sobre los niveles de testosterona. Los valores de estradiol están disminuidos en ambos fenotipos del grupo HP con respecto al control (Fig 4.2B), el tratamiento, si bien tiende a aumentar levemente los valores de estradiol, no es capaz de normalizarlos a valores control. Con respecto a los niveles de progesterona no se observaron diferencias en ninguno de los grupos (Fig 4.2D). Se evaluó la relación estradiol/testosterona (E2/T) como marcador de alteración de la foliculogénesis. Ambos fenotipos del grupo HP presentaron valores disminuidos de la relación E2/T, el tratamiento con metformina no tuvo ningún efecto sobre estos valores (Fig 4.2C).

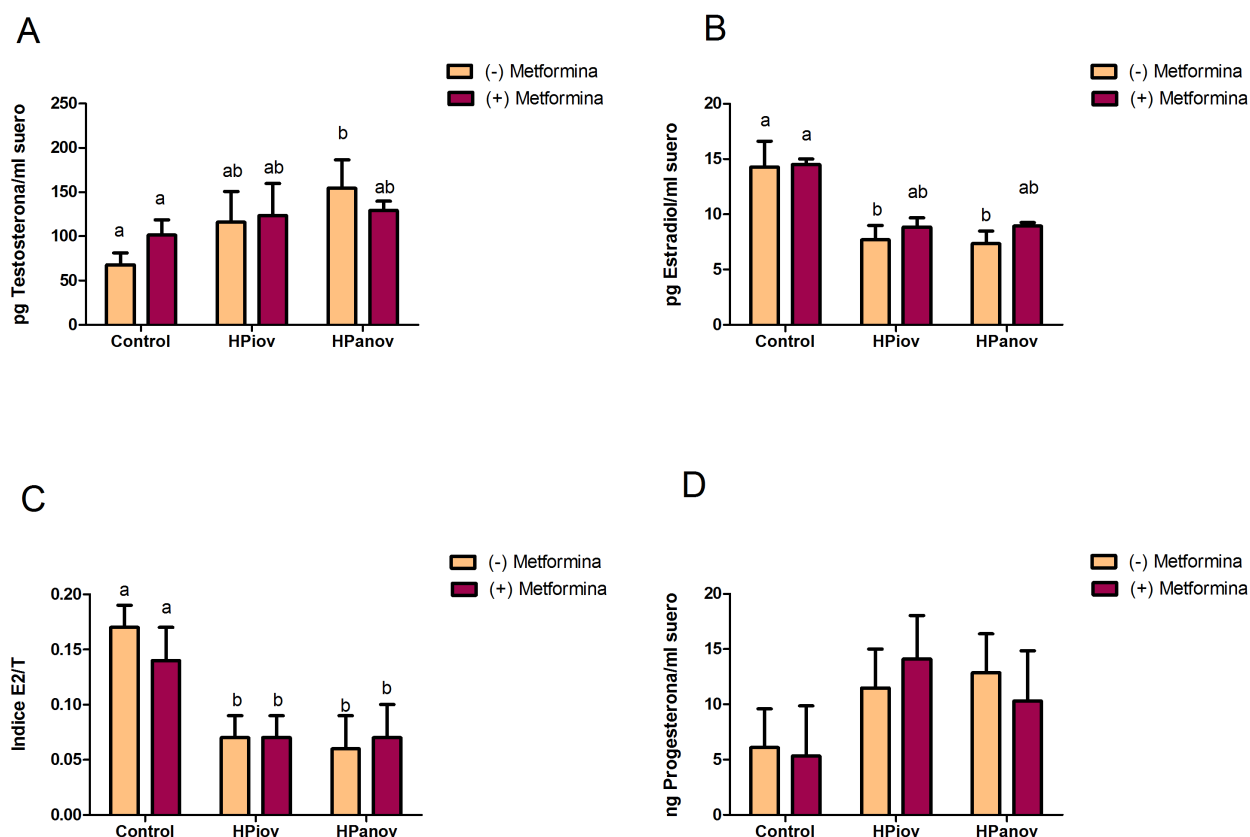


Figura 4.2. Parámetros hormonales. A) Testosterona en suero; B) Estradiol en suero; C) Índice estradiol/testosterona; D) Progesterona sérica; de grupos control, HPiov y HP anov, barras color anaranjado: grupos sin metformina, barras color guinda: grupos con tratamiento con metformina. Cada columna representa la media + D.E de 10 animales por grupo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores, con test post-hoc Tukey. a vs. b; $p < 0.05$.

Parámetros metabólicos

Se midieron los valores basales de glucosa e insulina. Ambos indicadores del estado metabólico se encontraron elevados en los dos grupos HP (Fig 4.3A y B). El tratamiento con metformina fue capaz de disminuir a valores control en ambos grupos HP los niveles de glucemia, mientras que la insulinemia solamente en el grupo HPanov. Los valores de insulina del grupo HPiov se vieron revertidos parcialmente luego del tratamiento con metformina. Como estimador de insulina resistencia calculamos el índice HOMA-IR, el cual se encuentra elevado en

ambos fenotipos HP (Fig 4.3C). La metformina es capaz de disminuir los valores de HOMA-IR en ambos fenotipos HP. Estos resultados sugieren que ambos fenotipos a pesar de las diferencias a nivel reproductivo y hormonal, presentan un estado de insulino resistencia junto con hiperinsulinemia e hiperglucemia.

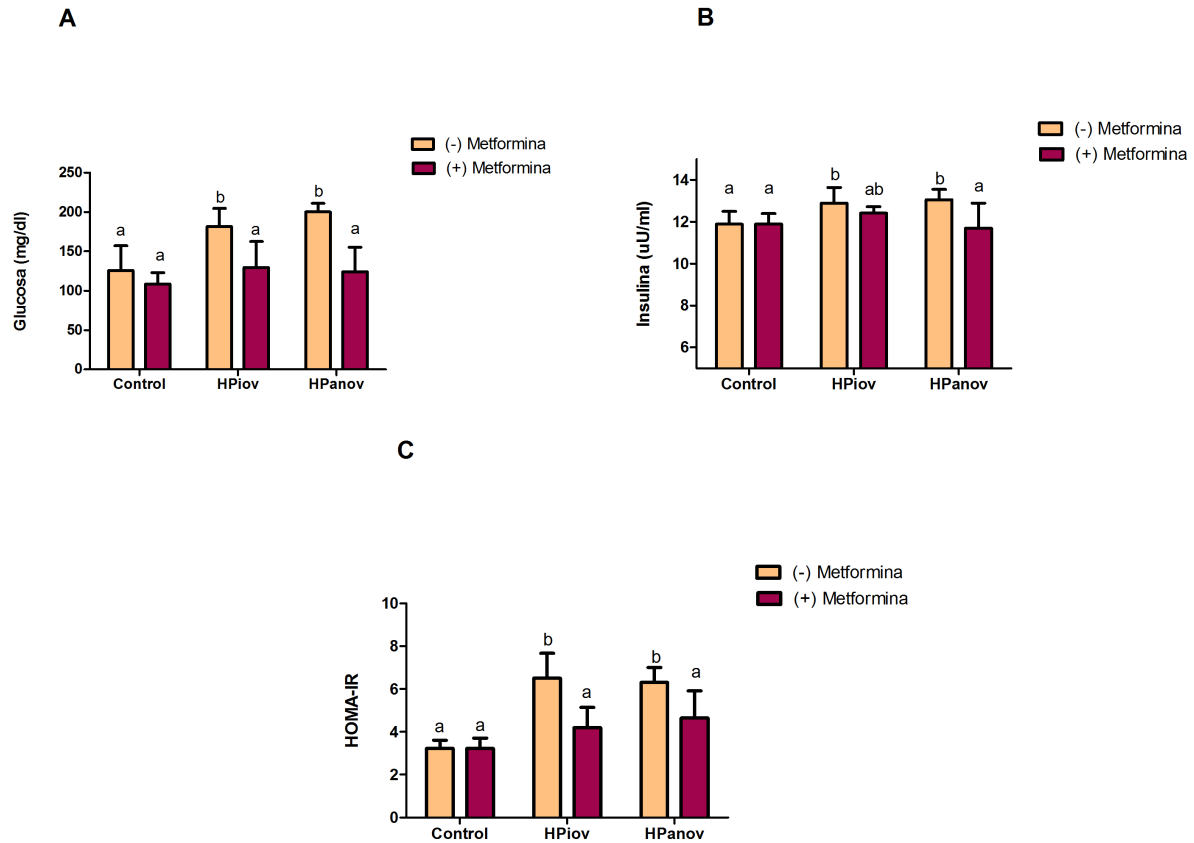


Figura 4.3: Parámetros de insulina y glucosa. A) Insulina basal, B) Glucosa basal, C) índice HOMA-IR; de grupos control, HPiov y HPanov, barras color anaranjado: grupos sin metformina, barras color guinda: grupos con tratamiento con metformina. Cada columna representa la media + D.E de 10 animales por grupo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores, con test post-hoc Tukey. a vs. b; $p < 0.05$.

Peso corporal

Se evaluó el peso corporal de las ratas al momento de la eutanasia, no se encontraron diferencias en ninguno de los grupos (Fig 4.4).

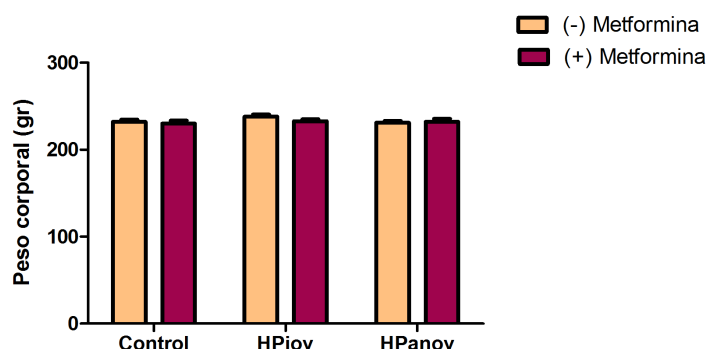


Figura 4.4: Peso corporal (gr) de animales de los grupos control, HPiov y HPanov, barras color anaranjado: grupos sin metformina, barras color guinda: grupos con tratamiento con metformina. Cada columna representa la media + D.E. de 30 animales por grupo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores, con test post-hoc Tukey.

Discusión

Alteraciones en el ambiente materno intrauterino pueden afectar el desarrollo del feto en diferentes niveles. Este fenómeno conocido como programación fetal predispone a la aparición de patologías durante la vida adulta (Godfrey y Barker, 2001). Se sabe que un exceso de andrógenos durante la gestación, predispone al desarrollo de alteraciones metabólicas y endocrinas durante la vida postnatal (Sir-Petermann et al., 2005; Crisosto et al., 2012, 2017). Más aún, durante los últimos años se han utilizado diversos modelos animales de exceso de andrógenos prenatal para emular características tipo SOP (Abbott et al., 2005, 2013; Demissie et al., 2008). En este trabajo de tesis quisimos evaluar los efectos de una hiperandrogenización prenatal con una dosis de 1 mg de testosterona sobre distintos parámetros endocrinos y metabólicos. La dosis elegida ha sido utilizada por Wolf y colaboradores (2002), que han

demostrado que conlleva a diversas alteraciones sin modificar la viabilidad y proporción de sexo de la crías, ni modifica el periodo de gestación (Wolf et al., 2002). De acuerdo con lo demostrado por estos autores, 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 como se reportó en un trabajo de nuestro laboratorio.

Una de las primeras alteraciones que se observan como causa de la hiperandrogenización prenatal es la aparición de dos fenotipos distintivos con respecto al ciclo estral (Tabla 4.1); en el que se detectan un alto porcentaje de crías con alteraciones en la ciclicidad. Estos desarreglos mejoran luego del tratamiento con metformina, restaurando la ciclicidad en un alto porcentaje en el fenotipo ovulatorio irregular y parcialmente en el fenotipo anovulatorio. Si bien un porcentaje recupera la ciclicidad, la mayor proporción de ratas con ciclos anovulatorios luego del tratamiento presenta un ciclo ovulatorio irregular.

Sumado a las anomalías descritas, se observa una morfología ovárica alterada en ambos fenotipos hiperandrogenizados. El fenotipo ovulatorio irregular, presenta quistes ováricos, un mayor número de folículos preantrales con respecto al control y luteinización anómala en los cuerpos lúteos. Se llegan a observar folículos antrales en etapas avanzadas de desarrollo que podrían explicar que estas ratas presentan cierto porcentaje de ovulación. El fenotipo anovulatorio además de presentar un patrón similar al del fenotipo ovulatorio irregular con presencia de quistes, gran número de folículos preantrales y cuerpos lúteos anómalos, muestra una invasión de folículos pequeños en la médula del ovario.

Esta morfología ovárica anormal de las ratas hiperandrogenizadas se asemeja a lo observado en ovarios de pacientes con SOP, que muestran un mayor número de folículos pequeños en crecimiento, a su vez presentan arresto folicular que impide la selección del folículo dominante (Webber et al., 2003; Jonard y Dewailly, 2004). Se cree que estas alteraciones en la foliculogénesis se deben a un ambiente endocrino alterado (Willis et al., 1998).

Hemos encontrado en los cortes de ovario del grupo HPanov la presencia de cuerpos lúteos. Estos resultados sugieren que se podrían formar cuerpos lúteos sin ovulación detectable al ciclar las ratas diariamente, lo que sugiere que estas ratas podrían tener ovulaciones de ciclos muy cortos, indetectables mediante la citología vaginal diaria, sugiriendo que sería necesario el ciclado de los animales más de una vez al día o que existiría formación de cuerpos lúteos sin un

acompañamiento de la histología ovárica o sin liberación de oocitos. Asimismo es de resaltar que en el período de 60-90 días en las ratas clasificadas como anovulatorias hemos detectado extendidos vaginales que presentaban tres tipos celulares diferentes en simultaneo (ver Fig 3.2 de metodología) en los que se presentaban leucocitos, células nucleadas y algunas células cornificadas. Estos extendidos que fueron considerados como una transición de metaestro a diestro pueden 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. Por otro lado, esto podría deberse también al fenómeno de luteinización prematura, que se observa en mujeres con SOP, las cuales tienen tendencia a responder a los tratamientos de estimulación hormonal en forma anómala (Willis et al., 1998). Asimismo, hemos encontrado en ovario de ratas puberales (60 días de edad) un aumento en los receptores de LH. Esto podría estar llevando en nuestro caso a una “luteinización prematura”, como se ve en mujeres con SOP que a pesar de eso, presentan anovulación.

Las hormonas esteroides sexuales son de gran importancia para la función ovárica, y en particular para el desarrollo folicular. Se ha visto que en etapas tempranas de la foliculogénesis, los andrógenos promueven el crecimiento folicular (Drummond, 2006). La producción de estrógenos se hace evidente a partir de los estadios preantrales tardíos y estimula la diferenciación y desarrollo a folículos antrales pre-ovulatorios (Britt et al., 2004; Drummond, 2006). En este trabajo de tesis hemos encontrado que ambos grupos de ratas hiperandrogenizadas, presentan un perfil de hormonas esteroides alterado. Se observa un hiperandrogenismo sérico con una disminución de los valores de estradiol en el grupo HPanov, y una baja en estradiol con un leve hiperandrogenismo en el grupo HPiov. Más aún hemos encontrado que la relación E2/T estaba disminuida en ambos fenotipos del grupo HP, esta relación se considera un indicador de disfunción ovulatoria y en pacientes con SOP se ha asociado a oligo o anovulación (Amato et al., 2011).

Estos resultados refuerzan la teoría de que el aumento del número de folículos pequeños se debe a los efectos del hiperandrogenismo, como se ha reportado en varias especies (Murray et al., 1998; Vendola et al., 1998; Jonard y Dewailly, 2004). A su vez, los bajos valores de estradiol concuerdan con la ausencia de un folículo dominante y un arresto folicular temprano. Este ambiente endocrino alterado podría explicar las anomalías observadas en la morfología ovárica y el ciclo estral.

A pesar de que el tratamiento con metformina no mejora de manera significativa el ambiente endocrino en los fenotipos HP, se observaron mejoras a nivel de morfología del ovario y una recuperación de la ciclicidad. Esto nos estaría indicando que existe algún otro mecanismo por el cual la metformina está mejorando la foliculogénesis y consecuentemente el ciclo estral.

El SOP ha sido siempre considerado como un síndrome de índole reproductivo, sin embargo en las últimas décadas se ha puesto de manifiesto las implicaciones metabólicas del mismo. Dado que el proceso reproductivo está regulado por el metabolismo energético y que como patología multifactorial, el SOP se encuentra modulado por la insulina, nos propusimos evaluar el efecto de la hiperandrogenización prenatal en el estado metabólico.

En este sentido, hemos encontrado alteraciones en el metabolismo de la glucosa e insulina. Se observó que ambos fenotipos presentan insulino resistencia, hiperinsulinemia e hiperglucemia. Es muy importante destacar que este estado metabólico alterado, es independiente de la presencia de sobrepeso u obesidad ya que ambos fenotipos hiperandrogenizados presentan el mismo peso corporal que el control. Nuestros resultados concuerdan con lo encontrado por Dunaif y colaboradores (Dunaif et al., 1989), quienes demostraron que el estado de insulino resistencia no se debe a un aumento en el tejido adiposo, sino que es intrínseco de la programación fetal por exceso de andrógenos (Kahn y Flier, 2000; Saltiel y Kahn, 2001; Tewari et al., 2015; Jeanes y Reeves, 2017). A su vez observamos que el tratamiento con metformina, en acuerdo con lo reportado por otros autores, disminuye los valores de glucosa y el estado de insulino resistencia calculado por el índice HOMA-IR (Diamanti-Kandarakis et al., 2010; Viollet et al., 2012) Sin embargo, la metformina no fue capaz de disminuir a valores control los niveles de insulina (sólo se observó una disminución parcial de los mismos) llevando a una hiperinsulinemia persistente, que podría afectar la señalización de insulina en tejidos periféricos. Esta hiperinsulinemia persistente se ve agravada por el hiperandrogenismo sistémico. Se ha correlacionado a la hiperinsulinemia con valores elevados de andrógenos, y se ha visto que se modulan a si mismas generando un círculo vicioso de regulación (Barbieri y Hornstein, 1988).

Estos resultados nos permiten sugerir que la hiperandrogenización prenatal no solo trae consecuencias reproductivas y endocrinas en la vida adulta sino también alteraciones a nivel metabólico que podrían afectar diferentes tejidos.

V. Capítulo 2. Efectos de la hiperandrogenización prenatal en el metabolismo energético del hígado

Capítulo 2. Efectos de la hiperandrogenización prenatal en el metabolismo energético del hígado

El hígado es el principal órgano que controla el metabolismo energético. Es responsable del metabolismo de la glucosa e insulina, del almacenamiento de energía y la biodisponibilidad de lípidos (Paschos y Paletas, 2009). Cualquier alteración en alguno de estos procesos o vías conlleva al desarrollo de patologías hepáticas y alteraciones metabólicas (Paschos y Paletas, 2009; Vassilatou, 2014). Se considera a la insulino resistencia como parte de la patogenia de diversos desordenes metabólicos como enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) y enfermedad crónica del hígado (Angelico et al., 2005; Gambarin-Gelwan et al., 2007). A su vez, se sabe que los andrógenos contribuyen a las disfunciones hepáticas y se ha visto que existe una relación cercana entre la disponibilidad de andrógenos y el desarrollo de alteraciones hepáticas, en pacientes hiperandrogénicos como mujeres con SOP (Vassilatou, 2014).

Considerando el estado sistémico de las ratas hiperandrogenizadas prenatalmente, que muestran, en el caso del fenotipo anovulatorio tanto un estado de insulino resistencia como una condición hiperandrogénica (Capítulo 1), quisimos evaluar los efectos de la programación fetal en el estado metabólico del hígado y estudiar si este estado de insulino resistencia se refleja también en el tejido hepático.

Expresión de mediadores de la vía metabólica de señalización de la insulina

Para evaluar el efecto de la hiperandrogenización prenatal sobre la vía de señalización de la insulina, se estudió la expresión génica de algunos de los principales mediadores de la vía metabólica de la insulina en tejido hepático de ratas adultas. Observamos que los tres mediadores analizados, *Ir*, *Irs-1* e *Irs-2*, mostraron menores niveles de ARNm en ambos fenotipos del grupo HP (Fig 5.1). El tratamiento con metformina solo fue capaz de revertir a niveles control la expresión de *Irs-1* en ambos fenotipos. El resto de los mediadores no sufrieron variación con el tratamiento.

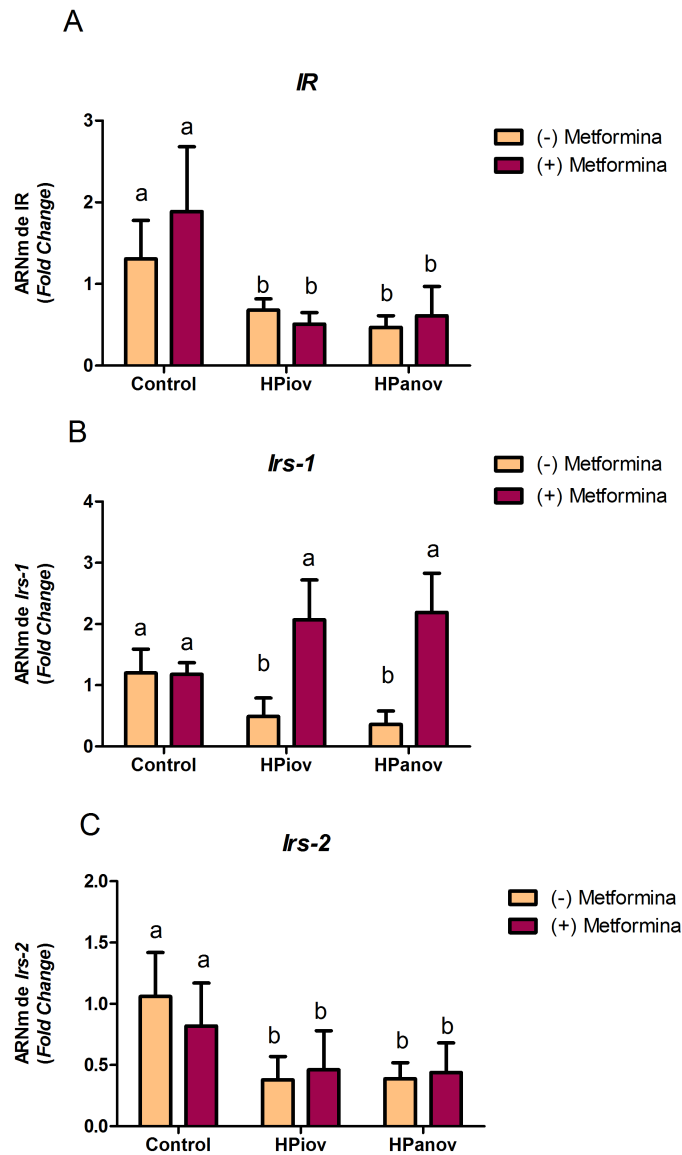


Figura 5.1. Abundancia relativa de ARNm de mediadores de la vía metabólica de la insulina. Expresión de A) *Ir*, B) *Irs-1*, C) *Irs-2*. De animales de grupos control, HPiov y HPanov, barras color anaranjado: grupos sin metformina, barras color guinda: grupos con tratamiento con metformina. Cada columna representa la media + D.E de 6 animales por grupo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores, con test post-hoc Tukey. a vs. b; $p < 0.05$.

Metabolismo de la glucosa

Para evaluar los efectos de la hiperandrogenización prenatal en el metabolismo de la glucosa en el hígado, estudiamos la expresión génica de la principal enzima que cataliza un paso irreversible de la gluconeogénesis, *Pepck*, y el transportador de glucosa *Glut2*.

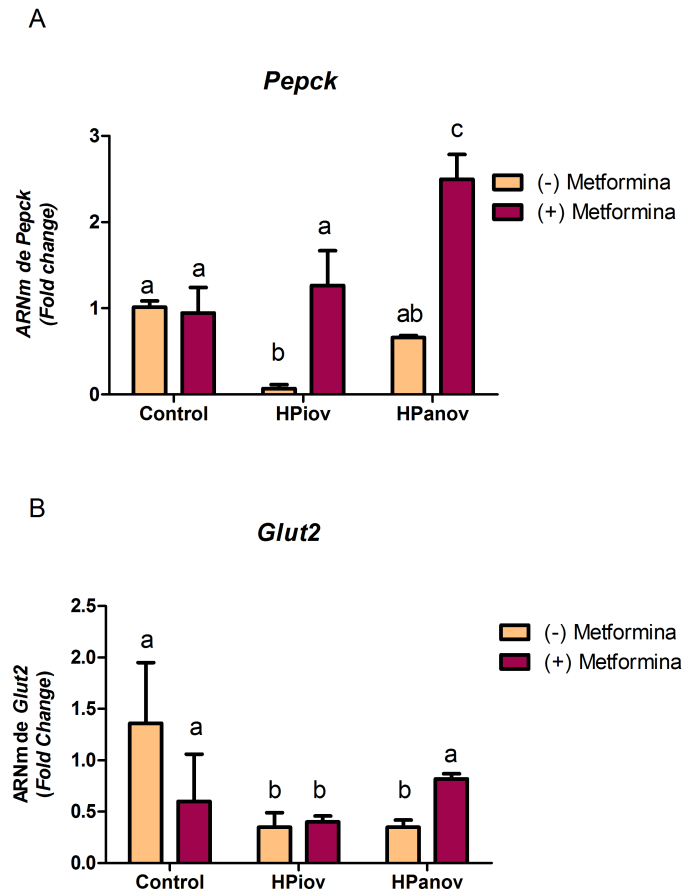


Figura 5.2. Abundancia relativa de ARNm de mediadores del metabolismo de la glucosa. Expresión de A) *Pepck*, B) *Glut2*. De animales de grupos control, HPiov y HPanov, barras color anaranjado: grupos sin metformina, barras color guinda: grupos con tratamiento con metformina. Cada columna representa la media + D.E de 6 animales por grupo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores, con test post-hoc Tukey. a vs. b vs. c; $p < 0.05$.

Los niveles del ARNm de *Pepck* estaban disminuidos en el grupo HPiov y mostraron una tendencia a disminuir en el grupo HPanov con respecto al control. Sin embargo el tratamiento con metformina fue capaz de restablecer el ARNm de *Pepck* a valores control en ambos fenotipos del grupo HP. Con respecto al transportador de glucosa, encontramos que tanto el grupo HPiov como el grupo HPanov tenían una menor expresión de ARNm de *Glut2*. El tratamiento con metformina solamente elevó la expresión en el fenotipo anovulatorio (Fig 5.2).

Lipogénesis

La insulino resistencia y defectos en la vía de señalización de la insulina pueden afectar diversos procesos involucrados en la homeostasis energética. En el hígado la vía lipogénica depende del metabolismo de la glucosa. Para evaluar el estado de otros procesos energéticos estudiamos los factores de transcripción *Chrebp*, *Srebp* y *PPARG*. Los tres factores de transcripción evaluados presentaron menores niveles de ARNm en ambos fenotipos del grupo HP (Fig 5.3). El tratamiento con metformina fue capaz de revertir el ARNm de *Chrebp* en el grupo HPanov, y en ambos grupos HP los valores de *PPARG*.

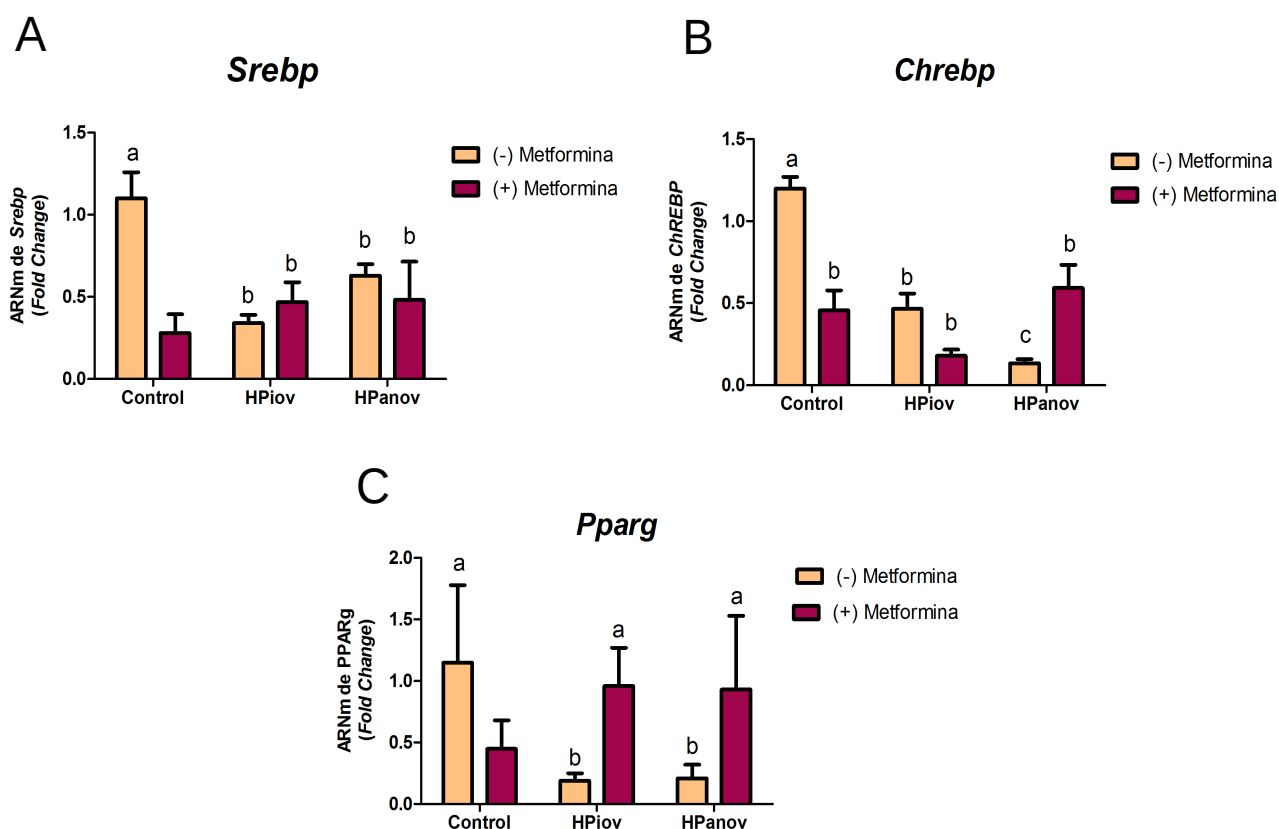


Figura 5.3. Abundancia relativa de ARNm de factores de transcripción de la vía lipogénica. Expresión de A) *Srebp*, B) *Chrebp*, C) *PPARG*. De animales de grupos control, HPiov y HPanov, barras color anaranjado: grupos sin metformina, barras color guinda: grupos con tratamiento con metformina. Cada columna representa la media + D.E de 6 animales por grupo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores, con test post-hoc Tukey. a vs. b vs c; $p < 0.05$.

Estrés oxidativo e insulino resistencia

Se sabe que el estrés oxidativo está aumentado en patologías metabólicas como, el síndrome metabólico y en la diabetes de tipo 2. Se cree que el aumento del estrés oxidativo podría ser un factor perjudicial que conduce a insulino resistencia (Tangvarasittichai, 2015). Por ello quisimos evaluar el balance oxidante/antioxidante en el tejido hepático. Se estudió la peroxidación lipídica como marcador de estrés oxidativo por el método TBARs y el contenido del antioxidante GSH.

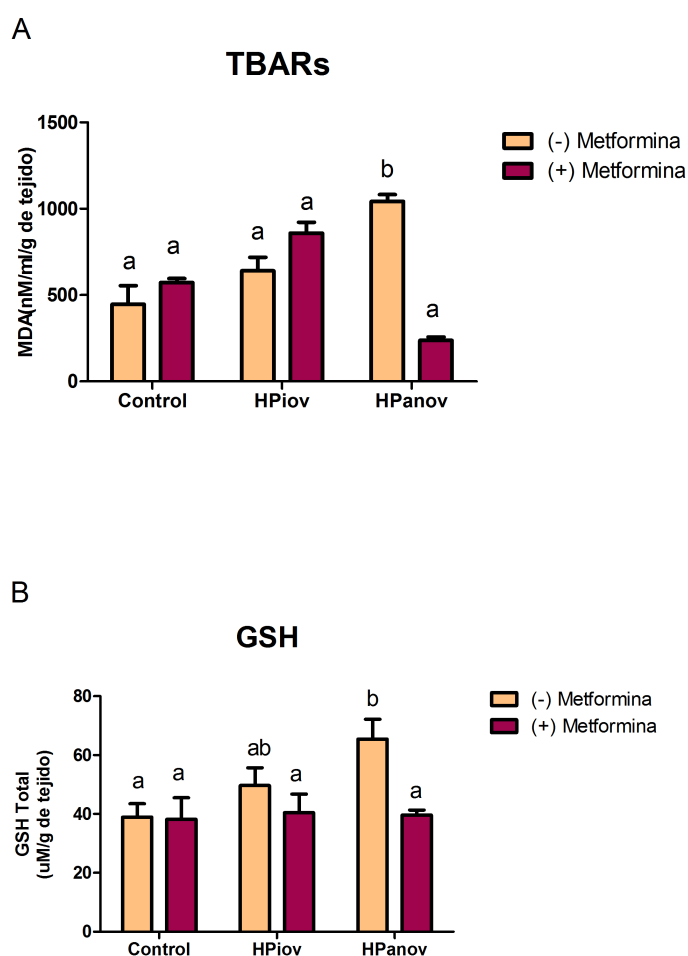


Figura 5.4. Balance oxidante-antioxidante. A) Contenido de MDA, como indicador de peroxidación lipídica; B) Metabolito antioxidante GSH; de grupos control, HPiov y HPanov, barras color anaranjado: grupos sin metformina, barras color guinda: grupos con tratamiento con metformina. Cada columna representa la media + D.E de 10 animales por grupo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores, con test post-hoc Tukey. a vs. b; $p < 0.05$.

Observamos que la hiperandrogenización prenatal únicamente aumentó el índice de peroxidación lipídica en el fenotipo anovulatorio y que el tratamiento con metformina fue capaz de revertir este daño (Fig 5.4A). A su vez el metabolito GSH estaba aumentado en el grupo HPanov con respecto al grupo control, y el tratamiento con metformina fue capaz de revertir este incremento (Fig 5.4B).

Mecanismo de acción de la metformina

Se sabe que el mecanismo de acción principal de la metformina es a través de la activación de AMPK, por lo tanto, para determinarlo, evaluamos la expresión proteica del principal sustrato de AMPK, la acetil-CoA carboxilasa fosforilada (pACC). Observamos que en ambos fenotipos del grupo HP, la expresión de pACC estaba aumentada. (Fig 5.5)

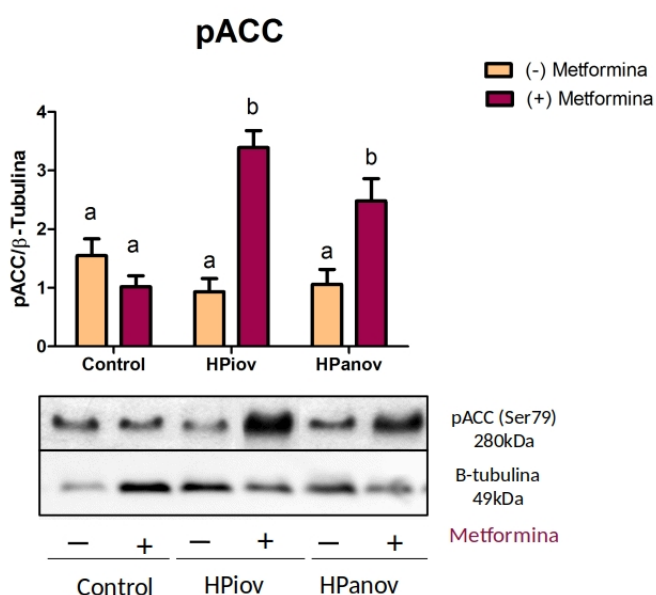


Figura 5.5. Abundancia relativa de los niveles de la proteína pACC. De grupos control, HPiov y HPanov, barras color anaranjado: grupos sin metformina, barras color guinda: grupos con tratamiento con metformina. Cada columna representa la media + D.E de 5 animales por grupo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores, con test post-hoc Tukey. a vs. b; $p < 0.05$. Se muestra una imagen representativa del Western Blot (WB)

Discusión

Las alteraciones causadas por la programación fetal afectan a distintos tejidos de manera diferente, causando modificaciones capaces de alterar el correcto funcionamiento de los mismos. En el hígado, como en otros tejidos, las alteraciones causadas por la programación fetal en la vía de señalización de la insulina, son capaces de generar un estado de insulina resistencia que induce diversas alteraciones endocrinas y metabólicas que comprometen la fisiología y funcionamiento de los mismos (Franks, 1995). En el capítulo anterior de este trabajo de tesis hemos encontrado que la programación fetal causada por un exceso de andrógenos es capaz de inducir un estado de insulina resistencia sistémica, hiperglucemia e hiperinsulinemia. Todos estos hallazgos van de la mano con una alterada señalización de la insulina en el hígado.

En el hígado, como en otros tejidos insulino sensibles, la respuesta a la insulina esta mediada por el IR, y cuenta con diversos mediadores clave para poder ejercer su acción normalmente, entre ellos los principales son IRS-1 e IRS-2 (White, 2002). Nuestros resultados muestran una disminución en los niveles de ARNm de los tres mediadores en ambos fenotipos HP, esta disminución nos estaría indicando una alteración en la señalización de la insulina, que como consecuencia llevaría a una disminución de los efectos de la insulina en el hígado y podría estar condicionando al hígado a un estado de insulina resistencia. Más aún se ha demostrado que la insulina resistencia a nivel molecular correlaciona con una incorrecta señalización de insulina (Valverde et al., 2003) y que IRS-1 e IRS-2 son claves para la señalización de insulina en el hígado. Por lo tanto una disminución en la expresión de estos mediadores es un indicador importante de insulina resistencia hepática (Taniguchi et al., 2005). Por otro lado se sabe que el hígado es el sitio de mayor degradación de insulina, mediado por la unión de la misma a su receptor y consecuente internalización (Di Guglielmo et al., 1998), por lo tanto esta falla en la vía de señalización de la insulina, en particular, la disminución en la expresión del IR podría explicar el estado de hiperinsulinemia sistémica observado. Más aún se ha sugerido que la insulina resistencia hepática es una consecuencia de la hiperglucemia (DeFronzo, 2004). Esto concuerda con estudios anteriores que han demostrado que la hiperandrogenización prenatal es capaz de alterar el patrón de expresión génica del receptor de insulina pudiendo inducir insulina resistencia (Franks, 1995, 2008).

Si bien demostramos previamente que el tratamiento con metformina es capaz de revertir el estado de insulino resistencia sistémica, en el caso del hígado, solamente observamos un aumento a valores control del ARNm de *Irs-1*. Se ha demostrado que la expresión génica de *Irs-2* en el hígado es esencial para la acción de insulina (Valverde et al., 2003), y que una falla en la señalización de IRS-2 tiene importantes implicaciones metabólicas; por lo tanto la incapacidad de la metformina de restaurar los valores de IRS-2 nos podría estar indicando que la insulino resistencia hepática persiste.

Tanto la gluconeogénesis como la glucogenogénesis dependen del transporte de glucosa. En el hígado el responsable de llevar a cabo este transporte es GLUT2 (Nordlie et al., 1999; Rui, 2014). En este trabajo encontramos que los valores de ARNm de *Glut2* están disminuidos en ambos fenotipos HP. Este resultado concuerda con lo encontrado respecto a IRS-2 ya que se ha reportado que ratones *knock out* para *Irs-2* presentan alteraciones en la incorporación de glucosa a las células (White, 2002). Más aún se sabe que la expresión génica de *Glut2* es regulada por el metabolismo de la glucosa (Rencurel et al., 1996), y dado que éste se encuentra impedido por las alteraciones en la vía de señalización de la insulina, esto podría explicar la disminución observada en los valores de ARNm de *Glut2*. Más aún, además de contar con una baja expresión de *Glut2*, que limitaría el ingreso de glucosa a las células y por lo tanto la gluconeogénesis, vimos también una disminución en la expresión del ARNm de la enzima *Pepck* en el fenotipo ovulatorio y una tendencia a su disminución en el fenotipo anovulatorio. Esta enzima ha demostrado ser esencial para catalizar el primer paso de la gluconeogénesis (Quinn y Yeagley, 2005). Se ha demostrado que la delección del gen de *Pepck* en hígado de ratones altera la gluconeogénesis (She et al., 2003; Hakimi et al., 2005). Nuestros resultados concuerdan con Pal y Gupta (2016), que han demostrado que la testosterona regula negativamente a la enzima PEPCCK hepática, causando una represión de la gluconeogénesis (Pal y Gupta, 2016). Considerando lo expuesto anteriormente, estos resultados demuestran que la programación fetal en el hígado es capaz de regular negativamente la gluconeogénesis, comprometiendo el ingreso de glucosa a los hepatocitos y suprimiendo enzimas de la gluconeogénesis.

También encontramos que el tratamiento con metformina revirtió el efecto adverso de la hiperandrogenización prenatal aumentando la expresión del gen hepático de *Pepck* a los valores del grupo control. Estos resultados son controversiales, dado que otros autores han demostrado que la metformina es capaz de suprimir la gluconeogénesis en obesidad y diabetes de tipo 2

(Foretz et al., 2014; Madiraju et al., 2014). Sin embargo, cabe destacar que en estos modelos, previo al tratamiento con metformina el hígado ya presentaba una gluconeogénesis exacerbada, así como una alta expresión de PEPCK, mientras que en este trabajo de tesis estaba disminuida. Tomando en conjunto todos estos resultados, podemos decir que la metformina es capaz de restaurar la expresión de *Pepck* a valores control, y así permitir una gluconeogénesis normal.

El estado de insulino resistencia, y las alteraciones en la cascada de señalización de la insulina son capaces de afectar otras vías involucradas en la homeostasis energética. En el hígado la vía lipogénica es de gran importancia y depende del metabolismo de la glucosa (Saltiel y Kahn, 2001). Hay dos importantes factores de transcripción: *Srebp* y *Chrebp*, que regulan la expresión de enzimas del metabolismo de la glucosa y/o de la lipogénesis, los cuales están modulados por insulina y glucosa, respectivamente (Browning y Horton, 2004; Strable y Ntambi, 2010). Nuestros resultados muestran que ambos fenotipos HP presentaron una disminución en los valores de ARNm de los dos factores de transcripción estudiados. Recientemente se ha reportado que tanto SREBP como ChREBP son necesarios para una inducción coordinada de genes glicolíticos y lipogénicos. Y que esta acción superpuesta pero distintiva aseguran la síntesis hepática de ácidos grasos cuando tanto la insulina como los carbohidratos están presentes (Linden et al., 2018). Por lo tanto, podríamos decir que la baja expresión de estos factores de transcripción son consecuencia de la insulino resistencia hepática.

El tratamiento con metformina únicamente es capaz de aumentar el ARNm de *Chrebp* en el fenotipo anovulatorio. Esto es consistente con el aumento de *Glut2* observado también únicamente en el grupo HPanov, dado que al incrementar la expresión del transportador, lo haría también la disponibilidad de glucosa en las células, que regularía positivamente a ChREBP.

El último factor de transcripción estudiado fue PPAR γ , el cual es un importante regulador del balance energético, tanto para la homeostasis de la glucosa como de los lípidos (Leonardini et al., 2009). A su vez, se ha visto también que el sistema PPAR γ es capaz de modular la expresión de moléculas específicas de la vía de señalización de la insulina (Leonardini et al. 2009). En este trabajo de tesis hemos encontrado que los valores de ARNm de *PPAR γ* estaban disminuidos en ambos fenotipos del grupo HP. Este resultado refuerza lo encontrado anteriormente en donde hemos visto que la cascada de señalización de la insulina en el hígado y el metabolismo de la glucosa se encuentran alterados. Más aún se sabe que una deficiencia

hepática de PPARg agrava la hiperglucemia (Matsusue et al., 2003) Por lo tanto, esta disminución en *PPARg*, podría explicar en cierta medida el estado metabólico alterado y en parte los defectos en la señalización de la insulina.

El tratamiento con metformina fue capaz de revertir estas alteraciones encontradas, aumentando los valores de ARNm de *PPARg* a valores control. Esto se ha reportado en otros estudios, donde se ha demostrado que la metformina es capaz de regular el metabolismo de la glucosa en el hígado a través de la vía de PPARg (El-Gharabawy et al., 2017; Mansour et al., 2017).

Hemos encontrado en este trabajo de tesis que el fenotipo HPanov presenta estrés oxidativo hepático, caracterizado por un estado pro-oxidante dado por un aumento de la peroxidación lipídica y, como mecanismo compensatorio, por un aumento en el antioxidante GSH.

La insulino resistencia periférica es capaz de incrementar la β -oxidación de los ácidos grasos, lo que lleva al estrés oxidativo hepático (Sanyal et al., 2001), y a su vez se sabe que las especies reactivas de oxígeno, generadas por el elevado estrés oxidativo, son capaces de desregular enzimas involucradas en el metabolismo de la glucosa (Ito et al., 2006). Por lo tanto, el estrés oxidativo y la insulino resistencia podrían estimularse continuamente y así empeorar las alteraciones metabólicas encontradas.

El GSH es el antioxidante de bajo peso molecular más importante sintetizado en las células. La administración de GSH parece ser una estrategia prometedora para tratar el daño hepático inducido por estrés oxidativo (Sacco et al., 2016). Estos datos sugieren que el estado de estrés oxidativo podría contribuir a la insulino resistencia presente en el fenotipo anovulatorio.

El mecanismo de acción de la metformina más estudiado, y que ha resultado ser el más común involucra la activación de la AMPK, un regulador metabólico central (Zhou et al., 2001). En este trabajo de tesis hemos encontrado que efectivamente la metformina actúa mediante la vía de AMPK, dado que vimos un aumento en la expresión de su sustrato principal pACC en ambos fenotipos del grupo HP. Estos resultados concuerdan con estudios de otros autores, donde se ha visto que la metformina es capaz de activar la cascada de señalización de AMPK y como consecuencia un aumento en la fosforilación de su sustrato, pACC (Zhou et al., 2001; Fang et al., 2014).

Por otro lado existe cada vez más evidencia de que la metformina también actúa a través de mecanismos independientes de AMPK (Pernicova y Korbonits, 2014). Varios estudios han

demostrado que uno de los efectos principales de la metformina es la inhibición del complejo mitocondrial I y la disminución de la producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (Pernicova y Korbonits, 2014; Diniz Vilela et al., 2016). En el presente estudio, encontramos que el tratamiento con metformina pudo revertir el estado pro-oxidante hallado en el grupo HPanov, lo que sugiere que la acción de la metformina como agente antioxidante puede contribuir a mejorar los trastornos presentes en las vías de la glucosa y la insulina en el fenotipo anovulatorio.

Sorpresivamente, nuestros resultados demuestran que el tratamiento con metformina mejora preferentemente las alteraciones causadas por la hiperandrogenización prenatal en el fenotipo anovulatorio respecto del ovulatorio irregular. Se sabe que la infertilidad femenina depende en gran medida de una exitosa regulación del metabolismo energético, dado que las funciones reproductivas demandan un gran consumo de energía. Esta alta demanda energética requiere de un excelente estado metabólico y una señalización integral para asegurar el almacenamiento energético (Della Torre et al., 2014). Y considerando que la metformina actúa en diferentes tejidos, es probable que en el grupo HPanov, que presenta más alteraciones reproductivas y anovulación, el blanco principal de la metformina sea el hígado para poder garantizar un buen estado metabólico y así soportar el costo del sistema reproductivo. Por otro lado en el fenotipo ovulatorio irregular que presenta alteraciones más leves a nivel reproductivo, es probable que el blanco principal de metformina sea garantizar un buen funcionamiento a nivel de reproducción. Estos resultados demuestran la importancia de evaluar las alteraciones causadas por la hiperandrogenización prenatal en distintos sistemas para poder tener un mejor panorama y una mejor comprensión del tratamiento con metformina.

VI. Capítulo 3. Vía metabólica de señalización de la insulina en el ovario: efecto de la hiperandrogenización prenatal

Capítulo 3. Vía metabólica de señalización de la insulina en el ovario: efecto de la hiperandrogenización prenatal.

El ovario es un importante tejido blanco para la acción de insulina. Se sabe que la insulina es capaz de estimular la esteroidogénesis (Poretsky et al., 1999; Diamanti-Kandarakis y Dunaif, 2012). A su vez, el metabolismo de la glucosa es esencial en el ovario para mantener constante la energía en las células de la granulosa y el oocito (Rice et al., 2005). En pacientes con SOP se ha demostrado que un deterioro del metabolismo de la glucosa reduce la energía necesaria para la células de la granulosa y el oocito (Zhao et al., 2016), esto compromete tanto la funcionalidad como la fisiología del ovario. Por otra parte, se sabe que la hiperinsulinemia lleva a hiperandrogenismo y a una consecuente anovulación.

Considerando la importancia del metabolismo de la glucosa en el ovario para su buen funcionamiento, quisimos evaluar si la vía metabólica de la insulina estaba alterada en los ovarios de ratas adultas HP. Para ello, estudiamos la expresión génica y proteica de los principales mediadores de esta vía.

Mediadores vía señalización de la insulina

Los niveles de ARNm de *Ir* se encontraron disminuidos en ambos fenotipos del grupo HP. Con respecto a los niveles proteicos del receptor, observamos que el grupo HPanov muestra una menor expresión del mismo y que el grupo HPiov muestra una expresión entre los valores del grupo control y del HPanov. El tratamiento con metformina restableció a valores control tanto el ARNm como la expresión proteica en el fenotipo HPiov. Con respecto al fenotipo anovulatorio, se observó un aumento en la expresión proteica pero no fue capaz de normalizarlo a valores control (Fig 6.1).

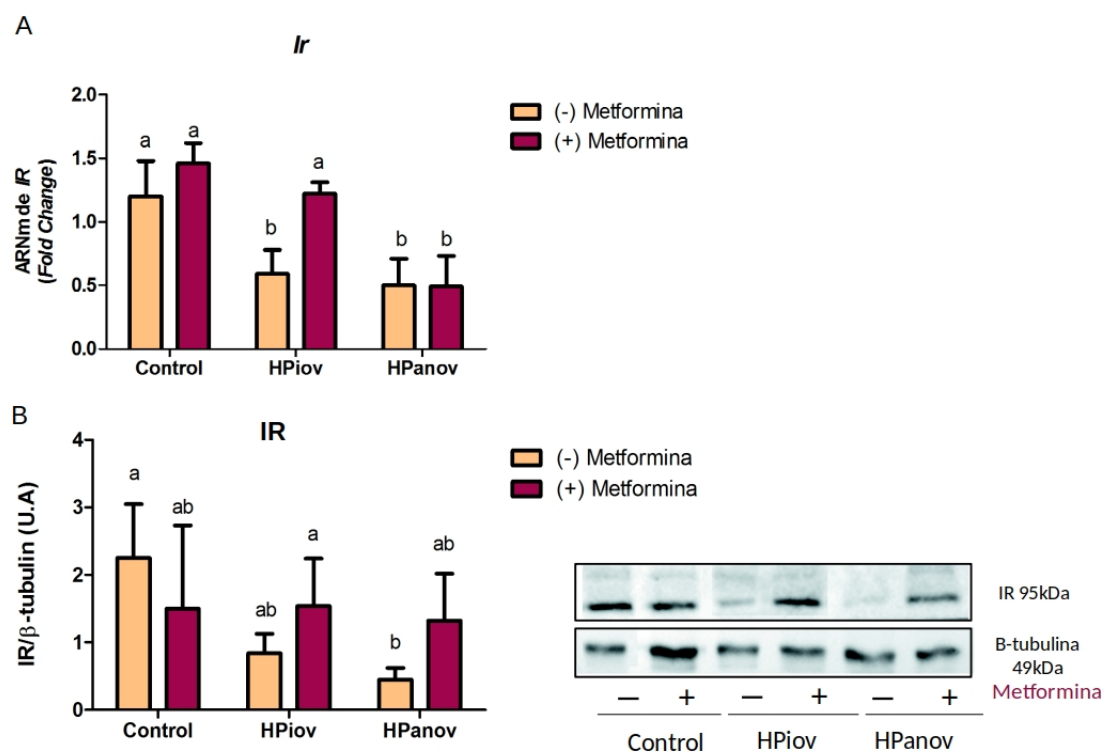


Figura 6.1. A) Abundancia relativa de ARNm del *Ir* B) Abundancia de proteína del IR relativo a B-tubulina, se muestra una imagen representativa del WB. De grupos control, HPiov y HPanov, barras color anaranjado: grupos sin metformina, barras color guinda: grupos con tratamiento con metformina. Cada columna representa la media + D.E de 5 animales por grupo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores, con test post-hoc Tukey. a vs. b; $p < 0.05$.

El segundo mediador estudiado de esta vía fue el sustrato del receptor de insulina IRS-1. Los niveles de ARNm y proteicos de IRS-1 se encontraron disminuidos en ambos fenotipos del grupo HP (Fig 6.2A). En contraste, los valores de ARNm de *Irs-2* solo estaban disminuidos en el grupo HPanov (Fig 6.2B). El tratamiento con metformina fue capaz de restablecer los niveles de ARNm de *Irs-1* en ambos fenotipos HP. La expresión proteica de este sustrato se vio aumentada luego del tratamiento con metformina pero no alcanzó a valores control (Fig 6.2C).

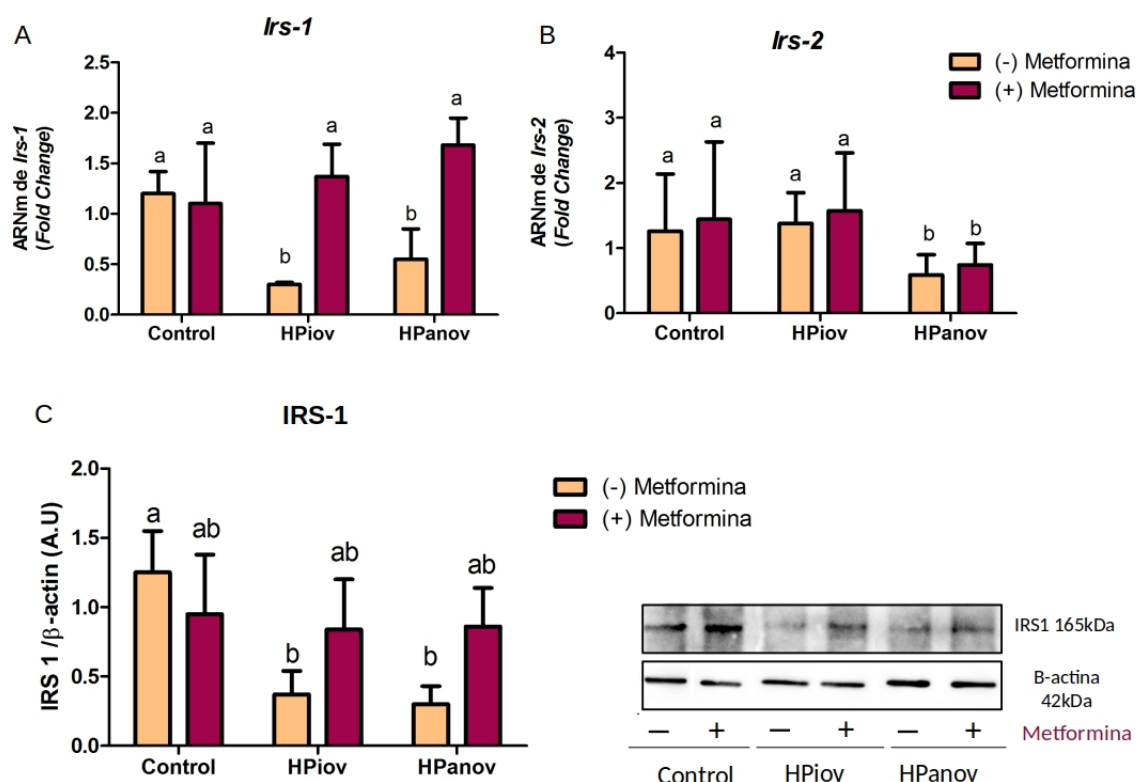


Figura 6.2. Expresión del sustrato al receptor de insulina 1 y 2. A) Abundancia relativa de ARNm del *Irs-1*; B) Abundancia relativa de ARNm del *Irs-2*; C) Abundancia de proteína del IRS-1 relativa a B-actina, se muestra una imagen representativa del WB. De grupos control, HPiov y HPanov, barras color anaranjado: grupos sin metformina, barras color guinda: grupos con tratamiento con metformina. Cada columna representa la media + D.E de 5 animales por grupo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores, con test post-hoc Tukey. a vs. b; $p < 0.05$.

Actividad vía metabólica de la insulina

Para evaluar la funcionalidad de la vía metabólica de acción de la insulina, se estudió la fosforilación de IRS-1 en dos residuos diferentes. Un residuo que representa la activación de la vía tirosina, y en un residuo serina, el cual se sabe que interrumpe la correcta señalización dado que impide que se continúe la secuencias de fosforilación río abajo de IRS-1. El grupo control mostró una elevada fosforilación en tirosina (Y612) y prácticamente una nula fosforilación en serina (S307). En el grupo HPiov observamos una fosforilación en tirosina similar a la del grupo

control, junto con un leve aumento de fosforilación en serina. El grupo HPanov mostró una baja fosforilación en tirosina y una muy elevada en residuo de serina. El tratamiento con metformina únicamente disminuyó la fosforilación en serina en el grupo HPanov (Fig 6.3).

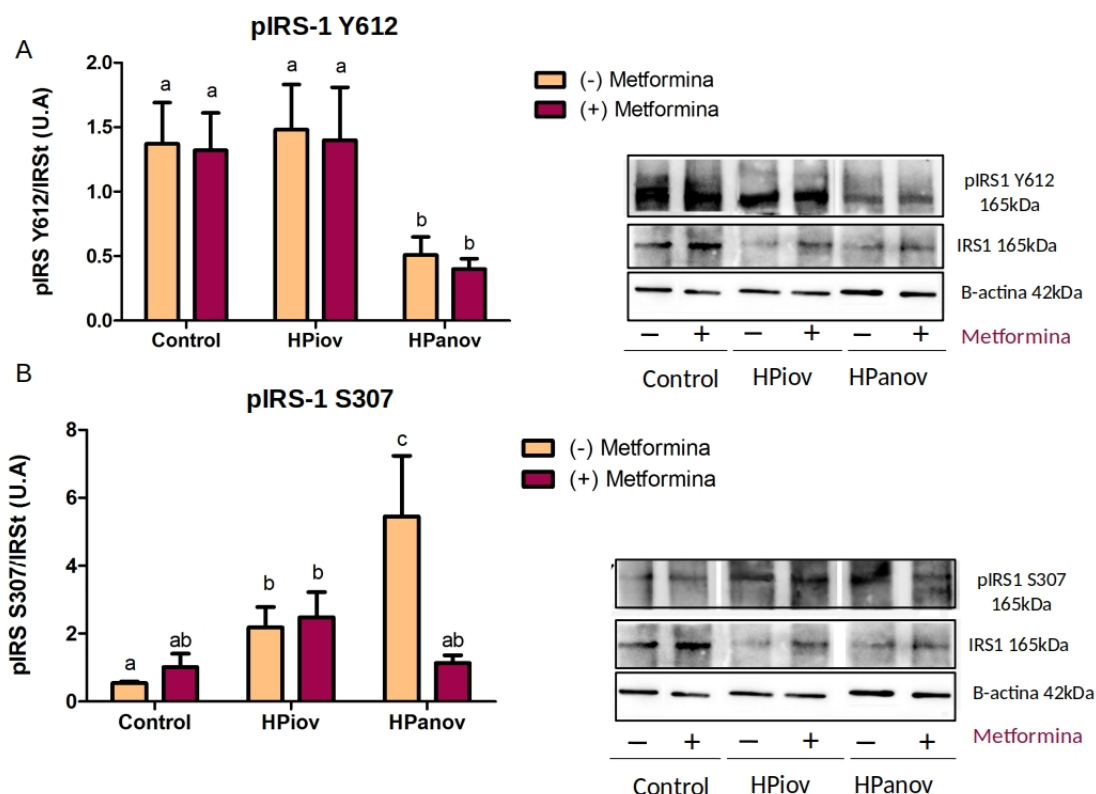


Figura 6.3. Fosforilación de IRS-1. A) Abundancia relativa de la fosforilación de IRS-1 en Y612, relativo a IRS-1 total y B-actina; B) Abundancia relativa de la fosforilación de IRS-1 en S307, relativo a IRS-1 total y B-actina; De grupos control, HPiov y HPanov, barras color anaranjado: grupos sin metformina, barras color guinda: grupos con tratamiento con metformina. Cada columna representa la media + D.E de 5 animales por grupo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores, con test post-hoc Tukey. a vs. b vs. c; $p < 0.05$. Se muestran imágenes representativas de los WB.

Por último, evaluamos la expresión del transportador de glucosa GLUT4. Ambos fenotipos del grupo HP mostraron una menor expresión de GLUT4, a nivel de ARNm y de proteína. El

tratamiento con metformina fue capaz de revertir esta disminución en el grupo HPiov (Fig 6.4).

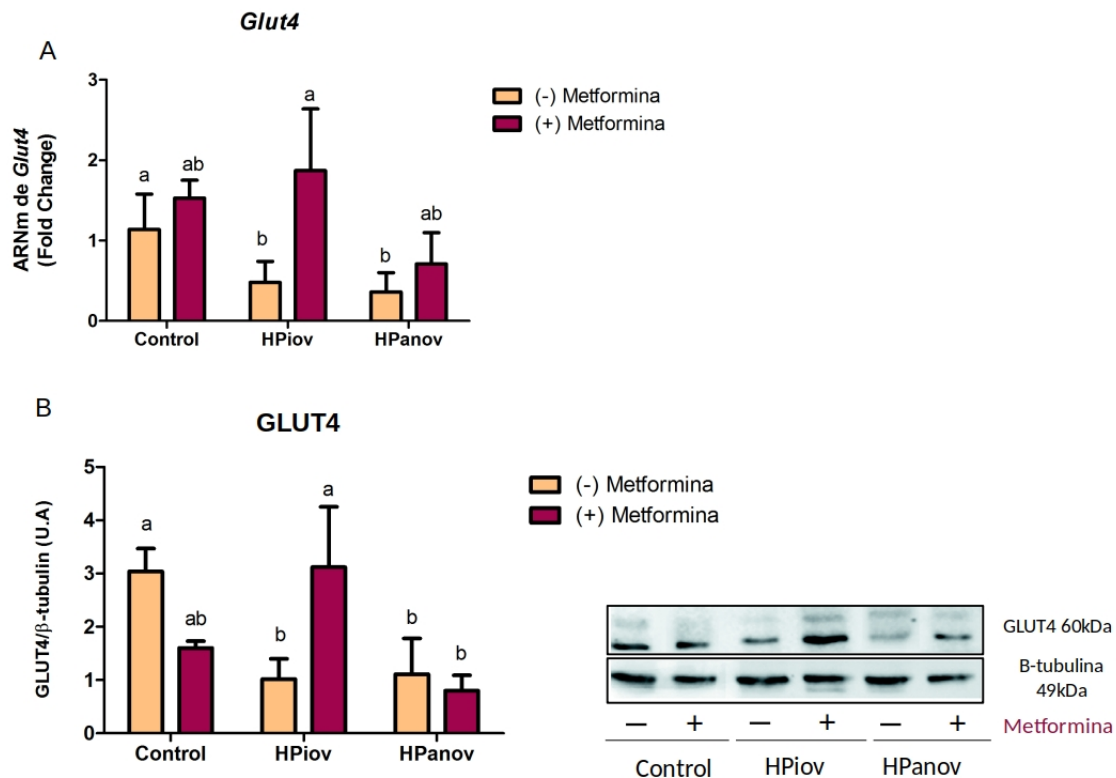


Figura 6.4. A) Abundancia relativa de ARNm del *Glut4* ; B) Abundancia de proteína del GLUT4 relativa a B-tubulina; de grupos control, HPiov y HPanov, barras color anaranjado: grupos sin metformina, barras color guinda: grupos con tratamiento con metformina. Cada columna representa la media + D.E de 5 animales por grupo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores, con test post-hoc Tukey. a vs. b; $p < 0.05$. Se muestra una imagen representativa del WB.

Mecanismo de acción de metformina en el ovario

Si bien no se conoce el exacto mecanismo de acción de la metformina, existen varios trabajos que prueban que la metformina es capaz de actuar activando a AMPK. Para comprobar la efectividad del tratamiento en nuestro modelo, se evaluó la proporción de fosforilación de AMPK con respecto a la AMPK total (AMPKt) en los ovarios provenientes de los seis grupos estudiados.

Los grupos hiperandrogenizados al igual que el grupo control, sin recibir el tratamiento con metformina, presentan una fosforilación basal de AMPK. Este valor es similar para el grupo control que recibió el tratamiento. Sin embargo la fosforilación se ve aumentada en ambos

grupos HP que recibieron el tratamiento, siendo esta fosforilación mayor en el grupo HPiov (Fig 6.5).

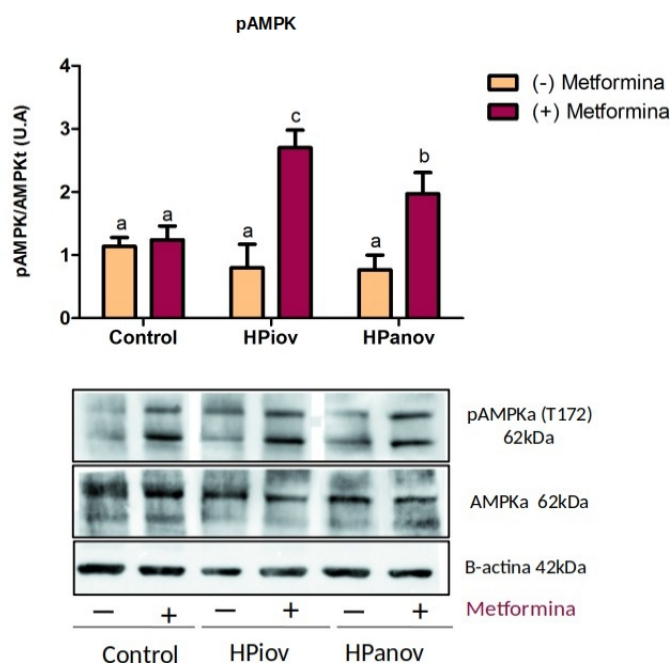


Figura 6.5. Fosforilación de AMPKa. Abundancia relativa de la fosforilación de AMPK en T172, relativo a AMPKa total y B-actina; De grupos control, HPiov y HPanov, barras color anaranjado: grupos sin metformina, barras color guinda: grupos con tratamiento con metformina. Cada columna representa la media + D.E de 5 animales por grupo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores, con test post-hoc Tukey. a vs. b vs. c; $p < 0.05$. Se muestra una imagen representativas del WB.

Discusión

Se ha demostrado la importancia de la señalización de la insulina en el control de la ovulación y de la calidad oocitaria (Diamanti-Kandarakis et al., 2008; Dupont y Scaramuzzi, 2016; Zhao et al., 2016). Se ha visto que defectos en la vía de acción de la insulina pueden alterar la vía metabólica en células de la granulosa de pacientes con SOP (Diamanti-Kandarakis et al., 2008), y que la hiperinsulinemia tiene un rol directo e indirecto en la anovulación, alterando tanto la foliculogénesis como la esteroidogénesis (Franks et al., 2000).

Nuestros resultados muestran que la expresión de varios mediadores de la vía metabólica de la insulina se encuentran alterados en el tejido ovárico de ambos fenotipos del grupo HP. Sin embargo, el alcance de estas anomalías fueron diferentes entre los fenotipos; siendo mayores el número y el nivel de éstas en el fenotipo HPanov. La diferencia más notable es en la expresión de IRS-2 que únicamente se encontraba disminuido en el fenotipo anovulatorio. Este resultado concuerda con Burks y colaboradores (2000), quienes han demostrado que ratones *knock out* para *Irs-2* presentan ciclos anovulatorios (Burks et al., 2000) Más aún, se ha demostrado que ratones deficientes para IRS-2 son infértiles (Neganova et al., 2007). Estos resultados resaltan el rol de esta molécula como mediadora fundamental de las disfunciones ovulatorias observadas pudiendo ser ésta en parte responsable por la diversidad de fenotipos encontrados.

La insulina como ligando ejerce su acción mediante la fosforilación de residuos tirosina en varios sustratos, incluyendo a IRS-1 (White, 1998). La fosforilación de IRS-1 en sus residuos tirosina lleva a la activación de las vías de señalización de PI3-K y Akt, que entre otras acciones, estimulan la traslocación del transportador de glucosa a la membrana celular para permitir el ingreso de ésta a las células (Kodaman y Behrman, 1999; Watson y Pessin, 2001),

Al ser la glucosa un sustrato energético de gran importancia tanto para el metabolismo como para la fisiología del ovario (Dupont y Scaramuzzi, 2016), cualquier alteración en la vía metabólica de la insulina que impida el ingreso de ésta a las células podría comprometer la fisiología del ovario. Más aún, se sabe que la glucosa es necesaria para el desarrollo folicular, la maduración del oocito y su consecuente ovulación (Dupont y Scaramuzzi, 2016). Por lo tanto, sin este sustrato, el ovario no es capaz de cumplir sus funciones correctamente.

En condiciones hiperandrogénicas como en el SOP, se ha visto un aumento en la fosforilación del receptor de insulina y sus sustratos en residuos serina en varios tejidos. Esto lleva a una inhibición de la acción de la insulina en esos tejidos (Takayama et al., 1988; Saltiel y Kahn, 2001; Draznin, 2006). Nuestros resultados sugieren que las ratas del fenotipo HPanov, que presentaban un aumento en la fosforilación de IRS-1 en residuos serina y una deficiente fosforilación en residuos tirosina, tendrían una acción de insulina defectuosa en el ovario que estaría condicionando el ingreso de glucosa a las células. Esto, sumado a la disminución de la expresión de los diferentes mediadores de la vía de la insulina y del transportador de glucosa, y

en particular la disminución de IRS-2, podría estar explicando la condición de anovulación en estas ratas.

Por otro lado, las ratas del fenotipo HPiov presentan un aumento de la fosforilación activante de la vía en residuos tirosina, que a pesar de la disminución de algunos de los mediadores de la vía, y del aumento de la fosforilación inhibitoria en serina de IRS-1, permitiría una activación compensatoria de la vía que podría estar generando cierto grado de flujo de glucosa hacia las células, posibilitando así de cierto modo una leve funcionalidad del ovario.

Previamente, hemos encontrado evidencia de la acción pleiotrópica de la metformina, ya que es capaz de modular las alteraciones a nivel metabólico sistémico y hepático. En este capítulo del trabajo de tesis hemos encontrado que la metformina es capaz de actuar como un modulador de la expresión génica y proteica de la vía de la insulina en el ovario. Estos resultados concuerdan con varios autores que han demostrado que esta potente biguanida es capaz de regular tanto la expresión de proteínas como de genes en diversos tejidos (Hamann et al., 1993; Tosca et al., 2010; Viollet et al., 2012). Los efectos del tratamiento con metformina fueron diferentes de manera fenotipo-dependiente. Ambos fenotipos de ratas hiperandrogenizadas muestran una recuperación a nivel proteico y de ARNm del sustrato IRS-1. Sin embargo, se encontró que los otros mediadores estudiados solamente lograron retornar a valores control en el fenotipo HPiov. A pesar que en el fenotipo HPiov no se observó disminución de la fosforilación de IRS-1 desactivante (en serina) la fosforilación de IRS-1 en tirosina, fue similar a la del grupo control. Esto sumado al aumento de la expresión de los mediadores, en particular del transportador de glucosa GLUT4, parecería ser suficiente para recuperar en cierta medida la funcionalidad del ovario restaurando la ciclicidad.

Con respecto al grupo HPanov, se observó que la fosforilación en serina disminuye luego del tratamiento con metformina, y considerando que presenta una fosforilación basal en residuos tirosina, esta disminución de la fosforilación inactivante parecería ser suficiente para restaurar parcialmente la acción de la insulina. Esta restauración parcial se puede ver como la recuperación incompleta del ciclo estral que se comentó anteriormente.

Estos resultados concuerdan con los de Ma y colaboradores (2018) que observaron que en células de la granulosa de pacientes con SOP, un tratamiento con metformina es capaz de mejorar la sensibilidad a la insulina, a través de la vía IRS-1/Akt, disminuyendo la fosforilación de IRS-1 en residuos serina (Ma HM et al., 2018).

Si bien no se conoce aún el mecanismo exacto según el que actúa la metformina en el ovario, se ha demostrado que la misma es capaz de activar AMPK en tejido ovárico de oveja y ratón (Elia et al., 2006; Tosca et al., 2007). De acuerdo con estos estudios, en este trabajo de tesis hemos encontrado evidencias de que la metformina en el ovario actúa por medio de AMPK. Estos resultados junto con la evidencia de que esta biguanida es capaz de regular la expresión génica y proteica a través de la activación de AMPK (Poretsky et al., 1999; Diamanti-Kandarakis y Dunaif, 2012), sugieren que la mejora observada en las alteraciones encontradas en las ratas hiperandrogenizadas prenatalmente se debe en parte por la activación de AMPK en el ovario. Aún más, observamos que esta activación, evaluada mediante la fosforilación de AMPK, es fenotipo dependiente. Ya que se observa una mayor fosforilación en el fenotipo HPiov con respecto al grupo HPanov. Estos resultados sugieren que las alteraciones causadas por la programación fetal son reversibles con el tratamiento adecuado.

Si bien nuestros resultados concuerdan con lo demostrado en células de la granulosa de pacientes con SOP, donde se observa que el ingreso de glucosa mediado por insulina se encuentra alterado (Lin et al., 1997; Franks et al., 1999), caracterizando así al ovario como insulino resistente, existe gran controversia en este punto. Se ha demostrado que la insulina es capaz, a través del receptor de insulina; de estimular y aumentar la esteroidogénesis en pacientes con SOP, llevando así a un aumento en la producción de andrógenos (Wu et al., 2003; Diamanti-Kandarakis et al., 2008). Esta disparidad entre los procesos asociados a la acción de insulina se debe a que IR puede estimular dos caminos de señalización, el metabólico asociado a PI3-K y Akt y, el mitogénico asociado a las MAPK-ERK, el cual está relacionado al desarrollo y proliferación celular (Saltiel, 1996; Watson y Pessin, 2001). Por lo tanto, es necesario evaluar las dos vías para poder tener una mejor comprensión de la fisiología de ovario y las alteraciones encontradas causadas por la programación fetal.

VII. Capítulo 4. Camino de la insulina en la reproducción femenina

Capítulo 4. Camino de la insulina en la reproducción femenina

El estado metabólico regula la fertilidad, y es por ello que el camino de la glucosa e insulina tiene una alta influencia en dicha regulación. En ese sentido, PPARg es un regulador maestro ya que interviene en el *cross talk* entre el estado metabólico y la fertilidad, actuando en el ovario. Es por ello que PPARg es un buen candidato para ser estudiado como posible mediador entre la regulación metabólica de la insulina y los procesos reproductivos.

PPARg ha sido extensamente asociado a la fertilidad femenina (Froment et al., 2006) y se ha descrito que su activación regula esteroidogenesis en células de la granulosa mientras que su disrupción lleva a subfertilidad (Cui et al., 2002; Froment et al., 2006; Velez et al., 2015). A su vez, se ha demostrado que la activación de PPARg es capaz de afectar la cascada de señalización de la insulina modulando tanto la expresión como la fosforilación de los mediadores de la vía (Leonardini et al., 2009). Se sabe que la fosforilación de PPARg en diferentes residuos regula su actividad.

La insulina además de regular el metabolismo de la glucosa, modula la diferenciación y proliferación celular a través de la cascada de señalización mitogénica asociada a MAPK-ERK1/2 (Diamanti-Kandarakis y Dunaif, 2012; Dupont y Scaramuzzi, 2016). Esta vía también es capaz de estimular la fosforilación de PPARg (Zhang et al., 1996b). La vía mitogénica de la insulina es independiente de la vía metabólica, ya que cada una cuenta con mediadores exclusivos (Saltiel y Kahn, 2001).

Considerando que en este trabajo de tesis hemos encontrado que: 1) la programación fetal es capaz de alterar tanto el metabolismo como las funciones reproductivas y 2) que PPARg es un buen candidato como enlace entre estos dos procesos, el objetivo de este capítulo fue estudiar el estado del sistema PPARg en ovarios de ratas hiperandrogenizadas prenatalmente.

Sistema PPARg

En primer lugar, para estudiar el estado del sistema PPARg, evaluamos el patrón de expresión del factor de transcripción en el tejido ovárico de ratas adultas.

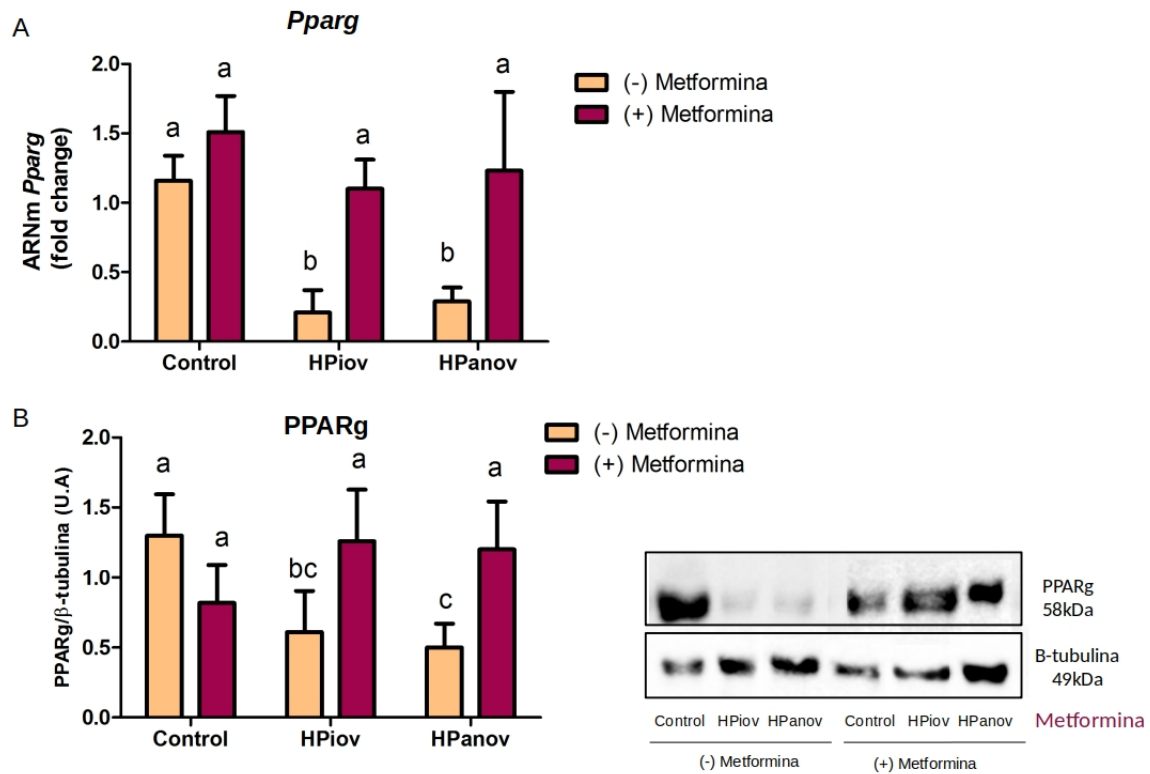


Figura 7.1. Expresión de PPARγ. A) Abundancia relativa de ARNm del *PPARγ*; B) Abundancia de proteína del PPARγ relativo a B-tubulina; de grupos control, HPiov y HPanov, barras color anaranjado: grupos sin metformina, barras color guinda: grupos con tratamiento con metformina. Cada columna representa la media + D.E de 5 animales por grupo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores, con test post-hoc Tukey. a vs. b vs. c; $p < 0.05$. Se muestra una imagen representativa del WB.

Al estudiar la expresión de PPARγ en el ovario, encontramos que en, ambos fenotipos del grupo HP, ésta se encontraba disminuida tanto a nivel de ARNm como de proteína y que el tratamiento con metformina fue capaz de restaurar estos valores a niveles control (Fig 7.1).

Mecanismos de regulación de PPARγ

Dado que observamos que la hiperandrogenización prenatal disminuye la expresión de este receptor maestro, a continuación quisimos estudiar la actividad del mismo, para poder corroborar el estado del sistema PPARγ. Para ello evaluamos en primer lugar la actividad de la

vía mitogénica de la insulina, analizando la fosforilación de ERK1/2, como posible reguladora de la fosforilación de PPAR γ y de su actividad (Fig 7.2).

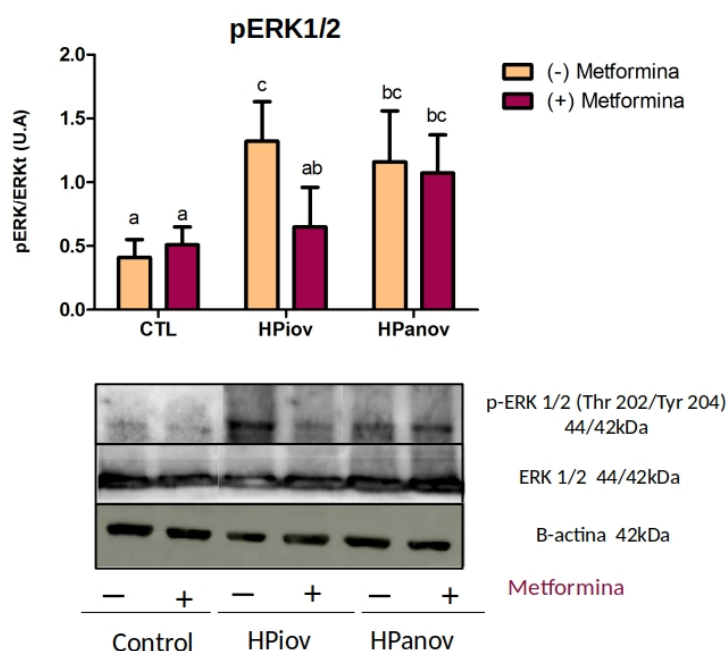


Figura 7.2. Fosforilación ERK1/2. Abundancia relativa de la fosforilación de ERK1/2 en Thr202/Tyr204, relativo a ERK1/2 total y B-actina; De grupos control, HPiov y HPanov, barras color anaranjado: grupos sin metformina, barras color guinda: grupos con tratamiento con metformina. Cada columna representa la media + D.E de 5 animales por grupo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores, con test post-hoc Tukey. a vs. b vs. c; $p < 0.05$. Se muestra una imagen representativa del WB.

La fosforilación de ERK1/2 se vio aumentada en ambos fenotipos del grupo HP con respecto al control. La metformina fue capaz de volver a valores de fosforilación constitutivos únicamente en el grupo HPiov (Fig 7.2).

A continuación se evaluó la fosforilación del receptor PPAR γ en su residuo serina 273, que ha sido demostrado como un sitio inactivante.

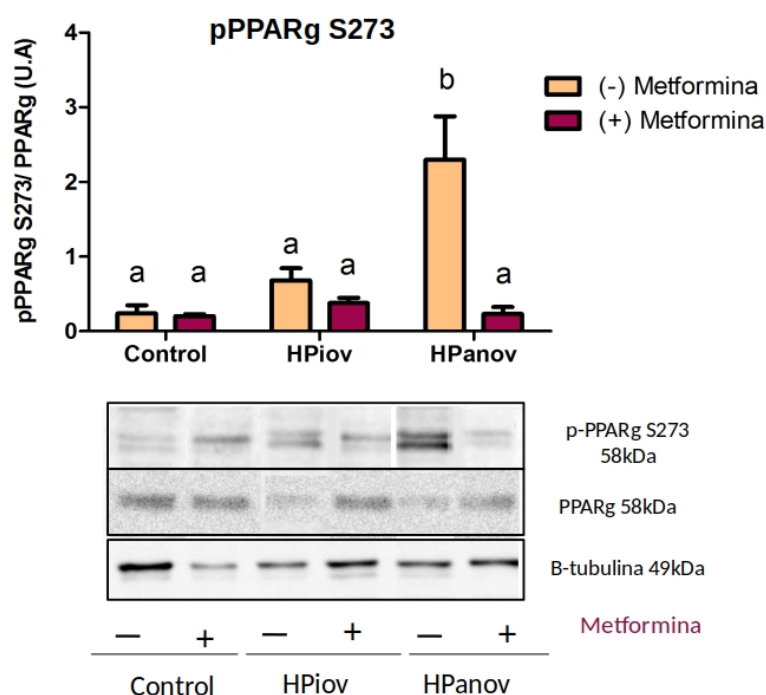


Figura 7.3. Abundancia relativa de la fosforilación de PPARγ en S273, relativo a PPARγ total y B-actina; De grupos control, HPiov y HPanov, barras color anaranjado: grupos sin metformina, barras color guinda: grupos con tratamiento con metformina. Cada columna representa la media + D.E de 5 animales por grupo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores, con test post-hoc Tukey. a vs. b; $p < 0.05$. Se muestra una imagen representativa del WB.

Observamos que la fosforilación de PPARγ en serina 273, se vio aumentada únicamente en el grupo HPanov, indicando una posible inactivación del sistema PPARγ en este fenotipo (Fig 7.3). El tratamiento con metformina fue capaz de disminuir este aumento en la fosforilación de PPARγ a valores control.

Por último, se evaluó la interacción de PPARγ con CDK5, mediante un ensayo de co-inmuno precipitación. Observamos una clara asociación de la ciclina CDK5 con el factor de transcripción PPARγ en tejido ovárico de ratas en todos los grupos estudiados. En ambos fenotipos del grupo HP se observó un aumento en el porcentaje de CDK5 asociado a PPARγ (Fig 7.4). Considerando que la interacción entre estas dos moléculas es promovida por el co-represor NcoR, podríamos considerar que el sistema PPARγ se encuentra reprimido en el ovario de ratas hiperandrogenizadas prenatalmente. A su vez, observamos que el tratamiento con metformina es capaz de revertir este aumento en la interacción CDK5/PPARγ observado (Fig 7.4). Esta variación

en el porcentaje de asociación no se debe a cambios en la disponibilidad de CDK5, dado que no se observaron diferencias en los niveles de expresión proteica de esta molécula en ninguno de los grupos estudiados (Fig 7.5).

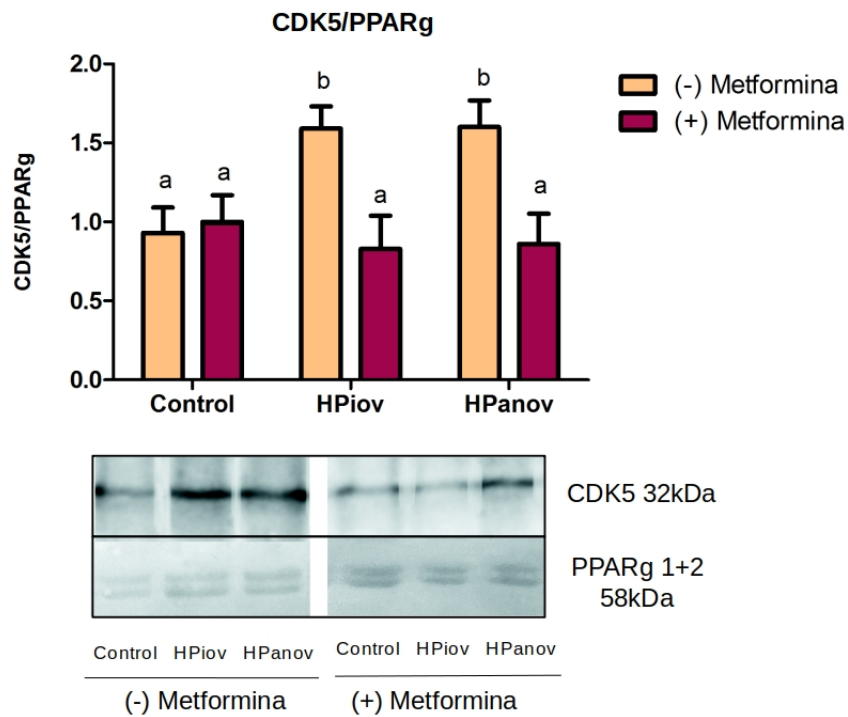


Figura 7.4. Co-inmuno precipitación de CDK5-PPARg. Abundancia relativa de CDK5, inmunoprecipitado con PPARg 1+2. De grupos control, HPiov y HPanov, barras color anaranjado: grupos sin metformina, barras color guinda: grupos con tratamiento con metformina. Cada columna representa la media + D.E de 5 animales por grupo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores, con test post-hoc Tukey. a vs. b; $p < 0.05$. Se muestra una imagen representativa del WB.

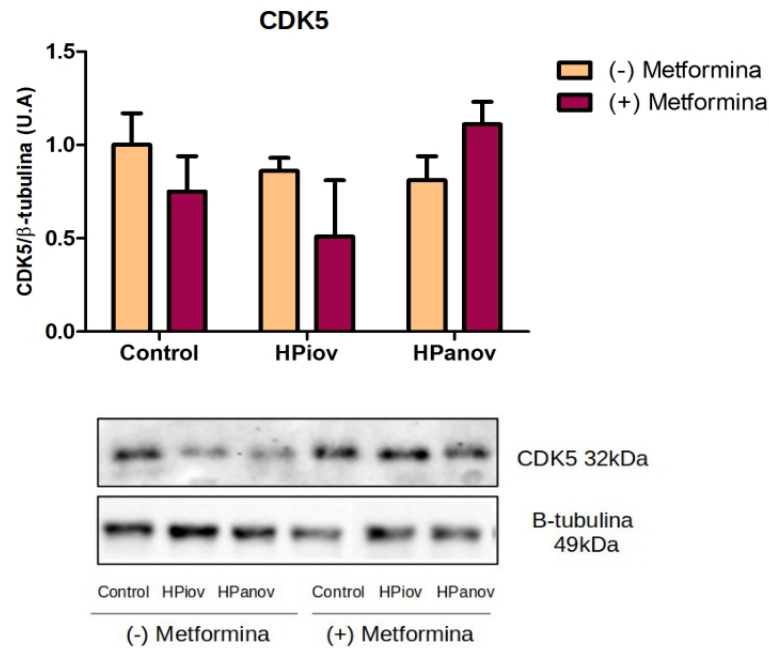


Figura 7.5. Abundancia de CDK5 relativa a B-tubulina; de grupos control, HPiov y HPanov, barras color anaranjado: grupos sin metformina, barras color guinda: grupos con tratamiento con metformina. Cada columna representa la media + D.E de 5 animales por grupo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos factores, con test post-hoc Tukey. Se muestra una imagen representativa del WB.

Discusión

Previamente mencionamos que la insulina no es solo capaz de regular el metabolismo de la glucosa y la capacidad energética de las células, sino que regula procesos celulares, tales como proliferación y diferenciación celular, además de jugar un rol importante en diferentes procesos reproductivos dentro del ovario (Dupont y Scaramuzzi, 2016). Asimismo, se sabe que el receptor nuclear PPARγ está involucrado en la regulación del metabolismo de la glucosa y lipídico. En parte actúa mediante la regulación de la vía de señalización de la insulina. Se ha demostrado que la activación de PPARγ altera la expresión génica de diversos genes blanco y aumenta la sensibilidad a la insulina en diferentes tejidos (como el músculo y adiposo), disminuyendo la intolerancia a la glucosa (Leonardini et al., 2009). Más aún, en células del ovario se demostró que la activación de PPARγ exhibe efectos directos, tanto a través de la vía de la insulina como independientes de la insulina (Seto-Young et al., 2005). Se sabe que PPARγ es

capaz de regular la foliculogénesis y el desarrollo y maduración normal del oocito (Komar, 2005). Por lo tanto, PPARg podría estar actuando como regulador maestro del *cross talk* entre el estado metabólico y el estado reproductivo.

En este trabajo de tesis hemos encontrado en ovarios de ratas hiperandrogenizadas que tanto la expresión génica como proteica del receptor PPARg estaba disminuida. Se ha reportado que PPARg es capaz de regular el desarrollo de células de la granulosa y que cualquier alteración en su expresión, podría afectar el desarrollo del oocito y la función ovárica (Froment et al., 2006; Velez et al., 2015). Por lo tanto esta alteración en el patrón de expresión de PPARg podría estar contribuyendo a las alteraciones observadas en el ciclo estral y en la morfología del ovario. Más aún por primera vez hemos evaluado la activación de PPARg en tejido ovárico de ratas hiperandrogenizadas prenatalmente. En este sentido encontramos que el fenotipo anovulatorio presentaba un aumento en la fosforilación de PPARg en su residuo S273, inactivando al mismo (Choi et al., 2011; Li et al., 2011; Banks et al., 2015)

Esta inactivación de PPARg refuerza la idea de que esta vía es responsable de las desregulaciones observadas en la funcionalidad ovárica. Dado que PPARg también participa en procesos que son críticos para la función ovárica normal como la angiogénesis, la inflamación y el control del ciclo celular, PPARg sería un factor importante en la regulación de la expresión génica ovárica (Dupont et al., 2013) Es por ello que al verse impedidas estas regulaciones génicas se afectaría el normal funcionamiento del ovario.

Se han demostrado dos mecanismos por los cuales PPARg es fosforilado en S273. Banks y colaboradores (2015) han demostrado que las MAPK-ERK1/2 son capaces de fosforilar a PPARg. (Banks et al., 2015) De acuerdo con lo expuesto por estos autores, en este trabajo de tesis hemos observado un aumento en la fosforilación de ERK1/2 lo que podría estar explicando, en el fenotipo anovulatorio, la inactivación de PPARg dada por su fosforilación en S273. Más aún de acuerdo a lo demostrado por Choi y colaboradores (2011) (Choi et al., 2011), en este trabajo hemos encontrado una interacción directa entre PPARg y CDK5, una ciclina que es por sí sola capaz de fosforilar a PPARg principalmente en S273, y a su vez se sabe que esta interacción es promovida por NcoR, co-represor de PPARg (Li et al., 2011).

En este trabajo de tesis hemos encontrado que el grupo HPanov presenta un aumento en la fosforilación de ERK1/2, y de PPARgS273 y a su vez hemos demostrado una clara interacción entre PPARg y CDK5. Estos resultados demuestran una represión del sistema PPARg en el

fenotipo anovulatorio. Sin embargo, en el grupo HPiov no se observa un aumento significativo de la fosforilación de PPARg en S273, pero sí observamos la interacción entre PPARg y CDK5 además del aumento en la fosforilación de ERK1/2. Dado que sí se observa esta interacción entre PPARg y CDK5, podría estar reflejando que el sistema PPARg está reprimido involucrando fosforilaciones en otros sitios inactivantes, como por ejemplo en serina 112, que se ha demostrado que impide la unión del ligando llevando a la inactivación del sistema (Lemkul et al., 2015) Más aún esta inactivación se podría explicar por el aumento de la fosforilación de ERK1/2, que se ha demostrado tiene la capacidad de inhibir al sistema PPARg, dado que el receptor cuenta con un sitio de unión para MAPK (Kaplan et al., 2010).

Previamente hemos demostrado que la metformina es capaz de mejorar las alteraciones encontradas causadas por la programación fetal a diferentes niveles, desde un aumento a nivel de expresión génica y proteica, como mejoras a nivel de funcionalidad de vías de señalización. En este capítulo hemos encontrado que la metformina sigue actuando a diferentes niveles. Observamos que es capaz de aumentar tanto la expresión del ARNm y de la proteína de PPARg en el ovario de ratas hiperandrogenizadas. Estos resultados están de acuerdo con lo visto en otros tejidos, como en hígado y endometrio, donde se ha demostrado que la metformina es capaz de modular la expresión de PPARg (Elia et al., 2011; Mansour et al., 2017). A su vez, el tratamiento con metformina fue capaz de disminuir la fosforilación de ERK1/2 en el fenotipo ovulatorio Esta disminución de la actividad de ERK1/2 se ha reportado anteriormente en células de la granulosa a través de la activación de AMPK por metformina (Tosca et al., 2007; Dupont et al., 2013). Más aún, la metformina fue capaz de reducir la interacción entre PPARg y CDK5, promoviendo así la reactivación del sistema PPARg. Esta recuperación del sistema en este fenotipo, podría explicar las mejoras observadas a nivel de morfología ovárica y recuperación del ciclo estral.

Con respecto al fenotipo anovulatorio si bien se observa la disminución de la fosforilación de PPARg en S273, y la interacción con CDK5, la fosforilación de ERK1/2 aún se encuentra aumentada. Dado que ERK1/2 es también capaz de fosforilar a PPARg en otros residuos independientemente de la presencia de CDK5 (Kaplan et al., 2010; Banks et al., 2015), no podemos afirmar una recuperación total de la actividad de PPARg. Esto podría explicar por qué en este fenotipo la recuperación del ciclo estral no es total así como lo que se observó en el capítulo anterior en donde la recuperación de la vía metabólica de la insulina no fue total en este fenotipo en comparación con el fenotipo ovulatorio.

VIII. Discusión final y conclusiones

Discusión final

En este trabajo de tesis nos propusimos evaluar los mecanismos de regulación asociados a insulino resistencia en dos órganos blanco de la insulina: el hígado y el ovario; y analizar la integración entre el metabolismo energético y la reproducción, utilizando un modelo murino de programación fetal por hiperandrogenización prenatal.

En primer lugar, hemos encontrado que un exceso de andrógenos durante la vida intrauterina, genera programación fetal que condiciona el desarrollo llevando, a alteraciones durante la vida adulta. En particular, el modelo murino utilizado, genera dos fenotipos diferentes en ratas adultas con características observadas en pacientes con SOP. En concordancia con otros autores, en nuestro modelo, ratas adultas hiperandrogenizadas prenatalmente presentan ciclos alterados; con oligo-ovulación o anovulación, además de una morfología ovárica alterada, la presencia de quistes ováricos y un ambiente hormonal alterado, caracterizado principalmente por hiperandrogenismo (Foecking et al., 2005; Wu et al., 2010; Yan et al., 2013). Sumado a las alteraciones reproductivas, la hiperandrogenización prenatal es capaz de generar un estado de insulino resistencia, y una consecuente hiperinsulinemia .

La insulino resistencia es una de las alteraciones metabólicas más frecuentes encontradas en mujeres con SOP, y si bien no se considera parte del criterio de diagnóstico, se ha visto que la presencia de insulino resistencia agrava las comorbilidades reproductivas (Dunaif, 1997; Diamanti-Kandarakis y Dunaif, 2012). Se ha establecido que la asociación entre insulino resistencia y SOP, se debe a la hiperinsulinemia que acompaña este estado; en el cual la insulina es capaz de actuar como una hormona reproductiva, amplificando la señal de LH en las células de la teca y aumentando la síntesis de andrógenos que trae como consecuencia el hiperandrogenismo presente en el SOP (Franks et al., 1999; Diamanti-Kandarakis et al., 2008). Más aún, se ha demostrado que la hiperinsulinemia es capaz de provocar arresto folicular debido a una temprana diferenciación de las células de la granulosa, que como consecuencia lleva a anovulación (Franks et al., 1999, 2000). A pesar de la asociación entre el estado metabólico y el reproductivo aún no se conocen todos los mecanismos implicados en la regulación conjunta de ambos.

Este estado de insulino resistencia, que a grandes rasgos se caracteriza como la baja habilidad de la insulina para ejercer sus acciones metabólicas, debido a un defecto en su vía de

señalización, se ve reflejado en los distintos tejidos de manera diferencial. En este trabajo de tesis focalizamos en dos tejidos claves, el hígado, dado su rol central en el mantenimiento del metabolismo energético y en el ovario, uno de los principales órganos reproductivos.

En el hígado hemos encontrado, que la vía metabólica de señalización de la insulina estaba alterada en ambos fenotipos de ratas hiperandrogenizadas prenatalmente. Esta disminución en los mediadores de la vía de señalización y del transportador de glucosa, condiciona no solamente la correcta acción de la insulina en el tejido; sino que también reduce el ingreso de glucosa a las células y la internalización de la insulina para su degradación. Lo que podría explicar en cierta medida el estado de hiperglucemia e hiperinsulinemia sistémico encontrado. En concordancia con nuestros resultados Nada y colaboradores (2010) demostraron que un exceso de andrógenos en el periodo prenatal en ovejas, es capaz de desregular la expresión génica de diversos mediadores de la vía de señalización de la insulina, que como consecuencia, provocan que el hígado sea insulino resistente (Nada et al., 2010). A su vez, este defecto en la vía de señalización de la insulina no solo compromete el metabolismo de la glucosa e insulina en el tejido hepático, sino que tiene efectos sobre genes lipogénicos. Por lo que la hiperandrogenización prenatal afecta varios procesos, limitando así la funcionalidad del hígado.

Respecto al ovario, al evaluar los efectos de la hiperandrogenización sobre la vía de insulina, observamos que ambos fenotipos del grupo HP, no solo presentaban defectos en la vía metabólica de la insulina a nivel de expresión tanto génica como proteica de los mediadores analizados, sino también a nivel funcional, demostrado por un aumento en la fosforilación IRS-1 en residuos serina, uno de los principales mecanismos de insulino resistencia en diversos tejidos (Dunaif et al., 1995, 2001; Dunaif, 1997; Corbould et al., 2005). Defectos en la vía de señalización de la insulina impiden el ingreso de glucosa a las células, que resulta ser de gran importancia para la funcionalidad del ovario, ya que es necesaria para el desarrollo de los folículos y la ovulación (Dupont y Scaramuzzi, 2016). Por lo que estos defectos en la vía de insulina podrían contribuir a las alteraciones en el ciclo estral de las ratas adultas hiperandrogenizadas prenatalmente.

Al evaluar la otra vía de señalización de gran importancia de la insulina, la mitogénica, encontramos una súper activación en la misma, reflejado por el aumento en la fosforilación de ERK1/2. Considerando estos resultados en conjunto, el ovario presentaría insulino resistencia selectiva, en la que se ve afectada la vía metabólica pero no la mitogénica. A su vez, se ha

demostrado que la activación de ERK1/2, contribuye a la fosforilación en serina de IRS-1 y se sugiere que la activación de ERK1/2 ocurre en primer lugar y causa insulino resistencia metabólica (Dunaif et al., 1995; Dunaif, 1997; Corbould et al., 2006).

Por otro lado, se ha demostrado que ERK es capaz de modular la actividad de PPARg, mediante la fosforilación de este en varios sitios serina. PPARg es un factor de transcripción maestro, que regula el metabolismo de la glucosa a través de la vía de señalización de la insulina (Ahmadian et al., 2013), y que es capaz de modular la funcionalidad del ovario, regulando la esteroidogénesis, la foliculogénesis y la maduración del oocito (Schoppee et al., 2002; Komar, 2005). En este trabajo de tesis encontramos que el sistema PPARg se encontraba inhibido, por una disminución de su expresión y su actividad, con un aumento en la fosforilación en el sitio S273. Esta fosforilación está mediada por dos vías diferentes, por un lado hemos demostrado una asociación directa entre PPARg y CDK5, que se sabe es capaz de promover la fosforilación en S273 (Choi et al., 2011), y por otro lado, por el aumento en la fosforilación de ERK. Se ha demostrado en ratones que la inactivación del sistema PPARg conduce a subfertilidad, y que compromete la maduración normal del oocito (Cui et al., 2002; Komar, 2005). Por lo tanto, esta desregulación del sistema PPARg, podría contribuir a las alteraciones encontradas con respecto al ciclo estral y a la morfología del ovario en las ratas hiperandrogenizadas prenatalmente. A su vez, se sabe que PPARg es capaz de regular la expresión de varios genes de la vía de señalización de la insulina, como lo son *Glut4* e *Irs-2*, dado que estos genes cuentan con la secuencia de unión a PPARg, PPRe (Leonardini et al., 2009). Por lo tanto alteraciones en PPARg contribuirían a la desregulación en la señalización de la insulina.

Considerando estos resultados, PPARg podría ser un regulador maestro que integra los procesos metabólicos y reproductivos, y que en el caso del ovario parecería tener un rol central en un *loop* de regulación, donde la super activación de la vía mitogénica de la insulina inactiva al sistema PPARg; esta inactivación del sistema podría estar explicando la baja en la expresión de los mediadores de la vía metabólica de la insulina, lo que contribuye a la insulino resistencia metabólica encontrada. Por otro lado, la disminución del ingreso de glucosa a las células sumado a la baja en el sistema PPARg, podrían explicar las alteraciones encontradas en el ciclo estral y la morfología ovárica.

En el presente trabajo, evaluamos los efectos del tratamiento con metformina sobre las distintas alteraciones causadas por la programación fetal. Hemos encontrado que la metformina

actúa a través de un mecanismo dependiente de AMPK en el hígado como en el ovario. Asimismo regularía la expresión génica y proteica de diversos mediadores de la vía de señalización de la insulina, así como es capaz de modular la fosforilación de determinados sustratos. Logrando así una mejora de la insulino resistencia tanto a nivel sistémico, como en el hígado y el ovario. Sin embargo, el alcance de estas mejoras parece ser tejido y fenotipo dependiente. El fenotipo anovulatorio presenta una recuperación casi total de la señalización de insulina en el hígado pero no en el ovario. En cambio, el fenotipo ovulatorio irregular presenta una mejor recuperación en el ovario. Esto podría deberse a la importancia de contar con un buen estado metabólico para poder afrontar el costo de la función reproductiva, considerando que el fenotipo anovulatorio, tiene anulada la función reproductiva, el costo energético para poder reanudarla sería mucho más alto que en el fenotipo ovulatorio. Por lo tanto es necesario restablecer primero el metabolismo para poder afrontar la reanudación de las funciones reproductivas.

Estos resultados nos demuestran, al trasladarlos a la clínica del SOP, la importancia de evaluar tanto las alteraciones reproductivas, como las metabólicas, y considerar los fenotipos para poder dar un tratamiento integral y efectivo.

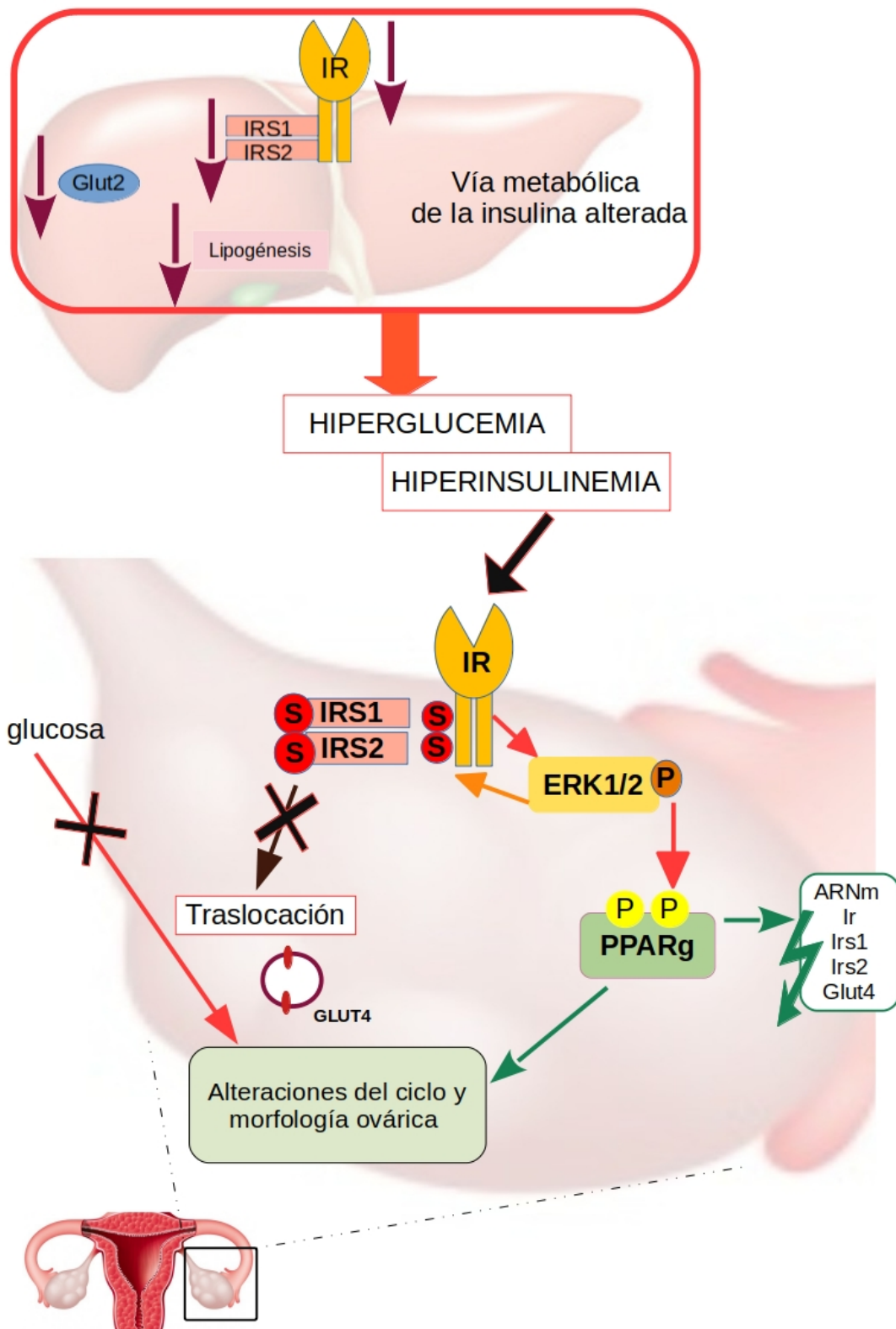


Figura 8.1. Esquema representativo del resumen de los resultados. Las flechas violetas representan disminución de ARNm. (P) indica fosforilación, (S) indica fosforilación en serina. Flecha/Rayo verde indica disminución de ARNm.

Conclusiones

- En nuestro modelo, la hiperandrogenización prenatal genera dos fenotipos con características de tipo SOP:
 - i) ovulatorio irregular: con alteraciones en el ciclo, morfología ovárica alterada con presencia de quistes, desbalance hormonal, hiperglucemia, hiperinsulinemia e insulino resistencia;
 - ii) anovulatorio: con arresto del ciclo estral en diestro, morfología ovárica alterada con presencia de quistes, hiperandrogenismo, hiperglucemia, hiperinsulinemia e insulino resistencia;
- El hiperandrogenismo prenatal, disminuye la expresión de genes de la vía de señalización de la insulina y de genes lipogénicos en el tejido hepático en ambos fenotipos. Asimismo, genera un desbalance oxidativo en el fenotipo anovulatorio.
- En el hígado, la metformina actúa a través del mecanismo dependiente de AMPK, revirtiendo la desregulación de la expresión determinados genes afectados por la hiperandrogenización prenatal, principalmente en el grupo HPanov. Y restablece el balance oxidante/antioxidante.
- En el ovario, la hiperandrogenización prenatal disminuye la expresión génica y proteica de los principales mediadores de la vía de señalización de la insulina, así como del transportador de glucosa dependiente de insulina en ambos fenotipos. En el grupo HPanov, la vía de acción de la insulina se encontraba impedida. Y en el grupo HPiov, se vio una disminución su actividad.
- El tratamiento con metformina en el ovario actúa vía AMPK, siendo capaz de restablecer la expresión de los mediadores de la vía metabólica en mayor medida en el fenotipo ovulatorio, y fue capaz de disminuir la fosforilación inactivante de IRS-1 en el grupo HPanov.
- En el ovario de ratas hiperandrogenizadas prenatalmente, la vía mitogénica de señalización de la insulina estaba superactivada.
- La hiperandrogenización prenatal disminuye la expresión de ARNm y proteína de PPARg, así como su actividad, demostrada por la asociación de PPARg con CDK5 y la fosforilación en S273 en el fenotipo anovulatorio.

- La metformina es capaz de revertir la disminución de la expresión de PPAR γ , su fosforilación y de reducir la asociación entre PPAR γ y CDK5, reactivando así el sistema PPAR γ .

IX. Referencias

- 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, Nicol LE, Levine JE, Xu N, Goodarzi MO, Dumesic DA. 2013. Nonhuman primate models of polycystic ovary syndrome. *Mol. Cell. Endocrinol.* 373:21-28.
- 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.
- 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.
- 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.
- Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF. 2002. Phosphorylation of Ser307 in Insulin Receptor Substrate-1 Blocks Interactions with the Insulin Receptor and Inhibits Insulin Action. *J. Biol. Chem.* 277:1531-1537.
- Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, Evans RM. 2013. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat. Med.* [Internet] 19. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3870016/>
- Allemand MC, Irving BA, Asmann YW, Klaus KA, Tatpati L, Coddington CC, Nair KS. 2009. Effect of Testosterone on Insulin Stimulated IRS1 Ser Phosphorylation in Primary Rat Myotubes—A Potential Model for PCOS-Related Insulin Resistance. *PLOS ONE* 4:e4274.
- 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, Verghi M, Nucera M, Galluzzo A, Giordano C. 2011. Low estradiol-to-testosterone ratio is associated with oligo-anovulatory cycles and atherogenic lipidic pattern in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol. Endocrinol.* 27:579-586.
- Angelico F, Del Ben M, Conti R, Francioso S, Feole K, Fiorello S, Cavallo MG, Zalunardo B, Lirussi F, et al. 2005. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90:1578-1582.

- 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.
- Attia GR, Rainey WE, Carr BR. 2001. Metformin directly inhibits androgen production in human thecal cells. *Fertil. Steril.* 76:517-524.
- Azziz R. 2004. PCOS: a diagnostic challenge. *Reprod. Biomed. Online* 8:644-648.
- Banks AS, McAllister FE, Camporez JPG, Zushin P-JH, Jurczak MJ, Laznik-Bogoslavski D, Shulman GI, Gygi SP, Spiegelman BM. 2015. An ERK/Cdk5 axis controls the diabetogenic actions of PPAR γ . *Nature* 517:391-395.
- Baptiste CG, Battista M-C, Trottier A, Baillargeon J-P. 2010. Insulin and hyperandrogenism in women with polycystic ovary syndrome. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 122:42-52.
- Barbieri RL, Hornstein MD. 1988. Hyperinsulinemia and ovarian hyperandrogenism. Cause and effect. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 17:685-703.
- Barker DJP. 2004. The developmental origins of adult disease. *J. Am. Coll. Nutr.* 23:588S-595S.
- Barnett KR, Schilling C, Greenfeld CR, Tomic D, Flaws JA. 2006. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Hum. Reprod. Update* 12:537-555.
- Baum MJ, Woutersen PJ, 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.
- Berger J, Moller DE. 2002. The mechanisms of action of PPARs. *Annu. Rev. Med.* 53:409-435.
- Bergman RN. 2007. Orchestration of glucose homeostasis: from a small acorn to the California oak. *Diabetes* 56:1489-1501.
- Bhatia V, Viswanathan P. 2006. Insulin resistance and PPAR insulin sensitizers. *Curr. Opin. Investig. Drugs Lond. Engl.* 2000 7:891-897.
- Biddinger SB, Hernandez-Ono A, Rask-Madsen C, Haas JT, Alemán JO, Suzuki R, Scapa EF, Agarwal C, Carey MC, et al. 2008. Hepatic Insulin Resistance is Sufficient to Produce Dyslipidemia and Susceptibility to Atherosclerosis. *Cell Metab.* 7:125-134.
- Boots CE, Jungheim ES. 2015. Inflammation and Human Ovarian Follicular Dynamics. *Semin. Reprod. Med.* 33:270-275.
- Britt KL, Saunders PK, McPherson SJ, Misso ML, Simpson ER, Findlay JK. 2004. Estrogen Actions on Follicle Formation and Early Follicle Development. *Biol. Reprod.* 71:1712-1723.
- Browning JD, Horton JD. 2004. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J. Clin. Invest.* 114:147-152.
- Buege JA, Aust SD. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52:302-310.

- Burgermeister E, Chuderland D, Hanoch T, Meyer M, Liscovitch M, Seger R. 2007. Interaction with MEK causes nuclear export and downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol. Cell. Biol.* 27:803-817.
- Burghen GA, Givens JR, Kitabchi AE. 1980. Correlation of hyperandrogenism with hyperinsulinism in polycystic ovarian disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 50:113-116.
- Burks DJ, de Mora JF, Schubert M, Withers DJ, Myers MG, Towery HH, Altamuro SL, Flint CL, White MF. 2000. IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis. *Nature* 407:377-382.
- Butler WR. 1998. Review: effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 81:2533-2539.
- Canipari R, Cellini V, Cecconi S. 2012. The ovary feels fine when paracrine and autocrine networks cooperate with gonadotropins in the regulation of folliculogenesis. *Curr. Pharm. Des.* 18:245-255.
- 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.
- Chan KA, Tsoulis MW, Sloboda DM. 2015. Early-life nutritional effects on the female reproductive system. *J. Endocrinol.* 224:R45-62.
- Chang RJ, Nakamura RM, Judd HL, Kaplan SA. 1983. Insulin resistance in nonobese patients with polycystic ovarian disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 57:356-359.
- Cheatham B, Kahn CR. 1995. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr. Rev.* 16:117-142.
- Cherrington AD, Edgerton D, Sindelar DK. 1998. The direct and indirect effects of insulin on hepatic glucose production in vivo. *Diabetologia* 41:987-996.
- Choi JH, Banks AS, Kamenecka TM, Busby SA, Chalmers MJ, Kumar N, Kuruvilla DS, Shin Y, He Y, et al. 2011. Antidiabetic actions of a non-agonist PPAR γ ligand blocking Cdk5-mediated phosphorylation. *Nature* 477:477-481.
- Choi K, Kim Y-B. 2010. Molecular Mechanism of Insulin Resistance in Obesity and Type 2 Diabetes. *Korean J. Intern. Med.* 25:119-129.
- Conti M, Hsieh M, Zamah AM, Oh JS. 2012. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 356:65-73.
- Corbould A, Kim Y-B, Youngren JF, Pender C, Kahn BB, Lee A, Dunaif A. 2005. Insulin resistance in the skeletal muscle of women with PCOS involves intrinsic and acquired defects in insulin signaling. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 288:E1047-E1054.
- Corbould A, Zhao H, Mirzoeva S, Aird F, Dunaif A. 2006. Enhanced mitogenic signaling in skeletal muscle of women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 55:751-759.

- 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.
- 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 (PPARgamma) does not affect mammary development and propensity for tumor formation but leads to reduced fertility. *J. Biol. Chem.* 277:17830-17835.
- Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawatr T, DeFronzo RA, Kahn CR, Mandarino LJ. 2000. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J. Clin. Invest.* 105:311-320.
- DeFronzo RA. 2004. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med. Clin. North Am.* 88:787-835.
- Della Torre S, Benedusi V, Fontana R, Maggi A. 2014. Energy metabolism and fertility: a balance preserved for female health. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10:13-23.
- 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.
- Desvergne B, Michalik L, Wahli W. 2006. Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* 86:465-514.
- Dewi DA, Abayasekara DRE, Wheeler-Jones CPD. 2002. Requirement for ERK1/2 activation in the regulation of progesterone production in human granulosa-lutein cells is stimulus specific. *Endocrinology* 143:877-888.
- Di Guglielmo GM, Baass PC, Authier F, Posner BI, Bergeron JJM. 1998. Insulin receptor internalization and signalling. *Mol. Cell. Biochem.* 182:59-63.
- Diamanti-Kandarakis E, Argyrakopoulou G, Economou F, Kandaraki E, Koutsilieris M. 2008. Defects in insulin signaling pathways in ovarian steroidogenesis and other tissues in polycystic ovary syndrome (PCOS). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 109:242-246.
- Diamanti-Kandarakis E, Christakou CD, Kandaraki E, Economou FN. 2010. Metformin: an old medication of new fashion: evolving new molecular mechanisms and clinical implications in polycystic ovary syndrome. *Eur. J. Endocrinol.* 162:193-212.
- Diamanti-Kandarakis E, Dunaif A. 2012. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications. *Endocr. Rev.* 33:981-1030.

- Diamanti-Kandarakis E, Papavassiliou AG. 2006. Molecular mechanisms of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Trends Mol. Med.* 12:324-332.
- Diniz Vilela D, Gomes Peixoto L, Teixeira RR, Belele Baptista N, Carvalho Caixeta D, Vieira de Souza A, Machado HL, Pereira MN, Sabino-Silva R, et al. 2016. The Role of Metformin in Controlling Oxidative Stress in Muscle of Diabetic Rats. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016:6978625.
- Diradourian C, Girard J, Pégrier J-P. 2005. Phosphorylation of PPARs: from molecular characterization to physiological relevance. *Biochimie* 87:33-38.
- Dong X, Park S, Lin X, Copps K, Yi X, White MF. 2006. Irs1 and Irs2 signaling is essential for hepatic glucose homeostasis and systemic growth. *J. Clin. Invest.* 116:101-114.
- Donner NC, Lowry CA. 2013. Sex differences in anxiety and emotional behavior. *Pflugers Arch.* 465:601-626.
- Draznin B. 2006. Molecular mechanisms of insulin resistance: serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and increased expression of p85alpha: the two sides of a coin. *Diabetes* 55:2392-2397.
- Drummond AE. 2006. The role of steroids in follicular growth. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 4:16.
- Dumesic DA, Richards JS. 2013. Ontogeny of the ovary in polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.* 100:23-38.
- Dumesic DA, Schramm RD, Peterson E, Paprocki AM, Zhou R, Abbott DH. 2002. Impaired developmental competence of oocytes in adult prenatally androgenized female rhesus monkeys undergoing gonadotropin stimulation for in vitro fertilization. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87:1111-1119.
- Dunaif A. 1997. Insulin Resistance and the Polycystic Ovary Syndrome: Mechanism and Implications for Pathogenesis. *Endocr. Rev.* 18:774-800.
- 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.
- Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, Dobrjansky A. 1989. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 38:1165-1174.
- Dunaif A, Wu X, Lee A, Diamanti-Kandarakis E. 2001. Defects in insulin receptor signaling in vivo in the polycystic ovary syndrome (PCOS). *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 281:E392-E399.
- Dunaif A, Xia J, Book CB, Schenker E, Tang Z. 1995. Excessive insulin receptor serine phosphorylation in cultured fibroblasts and in skeletal muscle. A potential mechanism for insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Invest.* 96:801-810.

- Dupont J, Reverchon M, Cloix L, Froment P, Ramé C. 2013. Involvement of adipokines, AMPK, PI3K and the PPAR signaling pathways in ovarian follicle development and cancer. *Int. J. Dev. Biol.* 56:959-967.
- Dupont J, Scaramuzzi RJ. 2016. Insulin signalling and glucose transport in the ovary and ovarian function during the ovarian cycle. *Biochem. J.* 473:1483-1501.
- Eberlé D, Hegarty B, Bossard P, Ferré P, Foufelle F. 2004. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 86:839-848.
- Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. 2009. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr. Rev.* 30:624-712.
- Eisenberg ML, Maker AV, Slezak LA, Nathan JD, Sritharan KC, Jena BP, Geibel JP, Andersen DK. 2005. Insulin receptor (IR) and glucose transporter 2 (GLUT2) proteins form a complex on the rat hepatocyte membrane. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 15:51-58.
- 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.
- El-Gharabawy RM, Ahmed AS, Al-Najjar AH. 2017. Mechanism of action and effect of immune-modulating agents in the treatment of psoriasis. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 85:141-147.
- Elia E, Sander V, Luchetti CG, Solano ME, Di Girolamo G, Gonzalez C, Motta AB. 2006. The mechanisms involved in the action of metformin in regulating ovarian function in hyperandrogenized mice. *MHR Basic Sci. Reprod. Med.* 12:475-481.
- Elia EM, Pustovrh C, Amalfi S, Devoto L, Motta AB. 2011. Link between metformin and the peroxisome proliferator-activated receptor γ pathway in the uterine tissue of hyperandrogenized prepubertal mice. *Fertil. Steril.* 95:2534-2537.e1.
- Fang W, Cui H, Yu D, Chen Y, Wang J, Yu G. 2014. Increased expression of phospho-acetyl-CoA carboxylase protein is an independent prognostic factor for human gastric cancer without lymph node metastasis. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* 31:15.
- Fausser BC, Van Heusden AM. 1997. Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocr. Rev.* 18:71-106.
- 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.

- Foretz M, Guigas B, Bertrand L, Pollak M, Viollet B. 2014. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab.* 20:953-966.
- 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. *Reprod. Camb. Engl.* 127:515-526.
- Franks S. 1995. Polycystic ovary syndrome. *N. Engl. J. Med.* 333:853-861.
- Franks S. 2008. Polycystic ovary syndrome in adolescents. *Int. J. Obes.* 2005 32:1035-1041.
- Franks S, Gilling-Smith C, Watson H, Willis D. 1999. Insulin action in the normal and polycystic ovary. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 28:361-378.
- Franks S, Mason H, Willis D. 2000. Follicular dynamics in the polycystic ovary syndrome. *Mol. Cell. Endocrinol.* 163:49-52.
- Franks S, McCarthy MI, Hardy K. 2006. Development of polycystic ovary syndrome: involvement of genetic and environmental factors. *Int. J. Androl.* 29:278-285; discussion 286-290.
- Franks S, Stark J, Hardy K. 2008. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod. Update* 14:367-378.
- Frayn KN. 2003. The glucose-fatty acid cycle: a physiological perspective. *Biochem. Soc. Trans.* 31:1115-1119.
- Froment P, Fabre S, Dupont J, Pisselet C, Chesneau D, Staels B, Monget P. 2003. Expression and functional role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in ovarian folliculogenesis in the sheep. *Biol. Reprod.* 69:1665-1674.
- 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.
- Fulgencio JP, Kohl C, Girard J, Pégorier JP. 2001. Effect of metformin on fatty acid and glucose metabolism in freshly isolated hepatocytes and on specific gene expression in cultured hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 62:439-446.
- Gambaran-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.
- Garcia D, Shaw RJ. 2017. AMPK: mechanisms of cellular energy sensing and restoration of metabolic balance. *Mol. Cell* 66:789-800.
- Gilbert SF. 2001. *Ecological Developmental Biology: Developmental Biology Meets the Real World.* *Dev. Biol.* 233:1-12.

- Godfrey KM, Barker DJ. 2001. Fetal programming and adult health. *Public Health Nutr.* 4:611-624.
- Gómez-Valadés AG, Méndez-Lucas A, Vidal-Alabró A, Blasco FX, Chillon M, Bartrons R, Bermúdez J, Perales JC. 2008. Pck1 Gene Silencing in the Liver Improves Glycemia Control, Insulin Sensitivity, and Dyslipidemia in db/db Mice. *Diabetes* 57:2199-2210.
- Goto M, Iwase A, Ando H, Kurotsuchi S, Harata T, Kikkawa F. 2007. PTEN and Akt expression during growth of human ovarian follicles. *J. Assist. Reprod. Genet.* 24:541-546.
- Hakim C, Padmanabhan V, Vyas AK. 2016. Gestational Hyperandrogenism in Developmental Programming. *Endocrinology* 158:199-212.
- Hakimi P, Johnson MT, Yang J, Lepage DF, Conlon RA, Kalhan SC, Reshef L, Tilghman SM, Hanson RW. 2005. Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the critical role of cataplerosis in the control of hepatic metabolism. *Nutr. Metab.* 2:33.
- Hamann A, Benecke H, Greten H, Matthaei S. 1993. Metformin increases glucose transporter protein and gene expression in human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196:382-387.
- Hanson MA, Gluckman PD. 2015. Developmental origins of health and disease--global public health implications. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 29:24-31.
- 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.
- Hill JW, Elmquist JK, Elias CF. 2008. Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294:E827-832.
- Himsworth HP. 1936. MANAGEMENT OF DIABETES MELLITUS. *Br. Med. J.* 2:188-190.
- Hiort O. 2013. The differential role of androgens in early human sex development. *BMC Med.* 11:152.
- Hochberg Z, Feil R, Constancia M, Fraga M, Junien C, Carel J-C, Boileau P, Le Bouc Y, Deal CL, et al. 2011. Child Health, Developmental Plasticity, and Epigenetic Programming. *Endocr. Rev.* 32:159-224.
- Homburg R. 2009. Androgen circle of polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 24:1548-1555.
- 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 AJW, Kawamura K, Cheng Y, Fauser BCJM. 2015. Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocr. Rev.* 36:1-24.

- Huang J-C. 2008. The role of peroxisome proliferator-activated receptors in the development and physiology of gametes and preimplantation embryos. *PPAR Res.* 2008:732303.
- Hubbard SR. 2013. The insulin receptor: both a prototypical and atypical receptor tyrosine kinase. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5:a008946.
- Iozzo P, Hallsten K, Oikonen V, Virtanen KA, Parkkola R, Kemppainen J, Solin O, Lonnqvist F, Ferrannini E, et al. 2003. Effects of metformin and rosiglitazone monotherapy on insulin-mediated hepatic glucose uptake and their relation to visceral fat in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 26:2069-2074.
- Issemann I, Green S. 1990. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347:645-650.
- Ito Y, Oumi S, Nagasawa T, Nishizawa N. 2006. Oxidative stress induces phosphoenolpyruvate carboxykinase expression in H4IIE cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70:2191-2198.
- Jeanes YM, Reeves S. 2017. Metabolic consequences of obesity and insulin resistance in polycystic ovary syndrome: diagnostic and methodological challenges. *Nutr. Res. Rev.* 30:97-105.
- Jelenik T, Kaul K, Séquaris G, Flögel U, Phielix E, Kotzka J, Knebel B, Fahlbusch P, Hörbelt T, et al. 2017. Mechanisms of Insulin Resistance in Primary and Secondary Nonalcoholic Fatty Liver. *Diabetes* 66:2241-2253.
- Jonard S, Dewailly D. 2004. The follicular excess in polycystic ovaries, due to intra-ovarian hyperandrogenism, may be the main culprit for the follicular arrest. *Hum. Reprod. Update* 10:107-117.
- Kahn BB, Flier JS. 2000. Obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106:473-481.
- Kaplan JM, Hake PW, Denenberg A, Nowell M, Piraino G, Zingarelli B. 2010. Phosphorylation of Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK)-1/2 Is Associated with the Downregulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)- γ during Polymicrobial Sepsis. *Mol. Med.* 16:491-497.
- Kim J, Yang G, Kim Y, Kim J, Ha J. 2016. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. *Exp. Mol. Med.* 48:e224.
- Kim YD, Park K-G, Lee Y-S, Park Y-Y, Kim D-K, Nedumaran B, Jang WG, Cho W-J, Ha J, et al. 2008. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis through AMP-activated protein kinase-dependent regulation of the orphan nuclear receptor SHP. *Diabetes* 57:306-314.
- Kodaman PH, Behrman HR. 1999. Hormone-Regulated and Glucose-Sensitive Transport of Dehydroascorbic Acid in Immature Rat Granulosa Cells. *Endocrinology* 140:3659-3665.
- Komar CM. 2005. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and ovarian function – implications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue remodeling. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 3:41.

- Lemkul JA, Lewis SN, Bassaganya-Riera J, Bevan DR. 2015. Phosphorylation of PPAR γ Affects the Collective Motions of the PPAR γ -RXR α -DNA Complex. *PLOS ONE* 10:e0123984.
- Leonardini A, Laviola L, Perrini S, Natalicchio A, Giorgino F. 2009. Cross-Talk between PPAR γ and Insulin Signaling and Modulation of Insulin Sensitivity. *PPAR Res.* 2009:818945.
- Li M, Youngren JF, Dunaif A, Goldfine ID, Maddux BA, Zhang BB, Evans JL. 2002. Decreased Insulin Receptor (IR) Autophosphorylation in Fibroblasts from Patients with PCOS: Effects of Serine Kinase Inhibitors and IR Activators. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87:4088-4093.
- Li P, Fan W, Xu J, Lu M, Yamamoto H, Auwerx J, Sears DD, Talukdar S, Oh D, et al. 2011. Adipocyte NCoR Knockout Decreases PPAR γ Phosphorylation and Enhances PPAR γ Activity and Insulin Sensitivity. *Cell* 147:815-826.
- Lin Y, Fridström M, Hillensjö T. 1997. Insulin stimulation of lactate accumulation in isolated human granulosa-luteal cells: a comparison between normal and polycystic ovaries. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 12:2469-2472.
- Linden AG, Li S, Choi HY, Fang F, Fukasawa M, Uyeda K, Hammer RE, Horton JD, Engelking LJ, et al. 2018. Interplay between ChREBP and SREBP-1c coordinates postprandial glycolysis and lipogenesis in livers of mice. *J. Lipid Res.* 59:475-487.
- Loucks AB. 2003. Energy availability, not body fatness, regulates reproductive function in women. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 31:144-148.
- Ma HM, Chen DM, Xiang L, Liu CQ, Hou QN, He YT, Xin C, Zhang YF, Pei XY, Wang YR, Xu X. 2018. Effect of Metformin-Induced Stimulation on the Expression of Insulin Receptor Substrate 1 through Negative Regulation of P70S6k. *Reprod Dev Med* 2018 2:15-20.
- Madiraju AK, Erion DM, Rahimi Y, Zhang X-M, Braddock DT, Albright RA, Prigaro BJ, Wood JL, Bhanot S, et al. 2014. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature* 510:542-546.
- 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.
- Mansour HH, El kiki SM, Galal SM. 2017. Metformin and low dose radiation modulates cisplatin-induced oxidative injury in rat via PPAR- γ and MAPK pathways. *Arch. Biochem. Biophys.* 616:13-19.
- 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 NF κ B-dependent mechanism involving COX-2 activation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 337:1-6.

- 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.
- Matsusue K, Haluzik M, Lambert G, Yim S-H, Gavrilova O, Ward JM, Brewer B, Reitman ML, Gonzalez FJ. 2003. Liver-specific disruption of PPAR γ in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *J. Clin. Invest.* 111:737-747.
- McCarthy M, McCarthy MM. 2011. *Sex and the Developing Brain*. Morgan & Claypool Publishers.
- McGee EA, Hsueh AJ. 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr. Rev.* 21:200-214.
- de Melo AS, Dias SV, Cavalli R de C, Cardoso VC, Bettiol H, Barbieri MA, Ferriani RA, Vieira CS. 2015. Pathogenesis of polycystic ovary syndrome: multifactorial assessment from the foetal stage to menopause. *Reprod. Camb. Engl.* 150:R11-24.
- Meshkani R, Adeli K. 2009. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clin. Biochem.* 42:1331-1346.
- Murray AA, Gosden RG, Allison V, Spears N. 1998. Effect of androgens on the development of mouse follicles growing in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 113:27-33.
- Myers MG, Wang LM, Sun XJ, Zhang Y, Yenush L, Schlessinger J, Pierce JH, White MF. 1994. Role of IRS-1-GRB-2 complexes in insulin signaling. *Mol. Cell. Biol.* 14:3577-3587.
- Nada SE, Thompson RC, Padmanabhan V. 2010. Developmental programming: differential effects of prenatal testosterone excess on insulin target tissues. *Endocrinology* 151:5165-5173.
- Neganova I, Al-Qassab H, Heffron H, Selman C, Choudhury AI, Lingard SJ, Diakonov I, Patterson M, Ghatei M, et al. 2007. Role of Central Nervous System and Ovarian Insulin Receptor Substrate 2 Signaling in Female Reproductive Function in the Mouse. *Biol. Reprod.* 76:1045-1053.
- Nelson-Degrave VL, Wickenheisser JK, Hendricks KL, Asano T, Fujishiro M, Legro RS, Kimball SR, Strauss JF, McAllister JM. 2005. Alterations in Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase and Extracellular Regulated Kinase Signaling in Theca Cells Contribute to Excessive Androgen Production in Polycystic Ovary Syndrome. *Mol. Endocrinol.* 19:379-390.
- Nestler JE. 2008. Metformin for the Treatment of the Polycystic Ovary Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 358:47-54.
- Nestler JE, Jakubowicz DJ. 1996. Decreases in ovarian cytochrome P450c17 α activity and serum free testosterone after reduction of insulin secretion in polycystic ovary syndrome. *N. Engl. J. Med.* 335:617-623.

- Nishimoto H, Matsutani R, Yamamoto S, Takahashi T, Hayashi K-G, Miyamoto A, Hamano S, Tetsuka M. 2006. Gene expression of glucose transporter (GLUT) 1, 3 and 4 in bovine follicle and corpus luteum. *J. Endocrinol.* 188:111-119.
- Nordlie RC, Foster JD, Lange AJ. 1999. Regulation of glucose production by the liver. *Annu. Rev. Nutr.* 19:379-406.
- 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, Manikkam M, Recabarren S, Foster D. 2006. Prenatal testosterone excess programs reproductive and metabolic dysfunction in the female. *Mol. Cell. Endocrinol.* 246:165-174.
- 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.
- Padmanabhan V, Veiga-Lopez A, Abbott DH, Recabarren SE, Herkimer C. 2010. Developmental programming: impact of prenatal testosterone excess and postnatal weight gain on insulin sensitivity index and transfer of traits to offspring of overweight females. *Endocrinology* 151:595-605.
- 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/>
- Pal M, Gupta S. 2016. Testosterone supplementation improves glucose homeostasis despite increasing hepatic insulin resistance in male mouse model of type 2 diabetes mellitus. *Nutr. Diabetes* 6:e236.
- Palomba S, Falbo A, Zullo F, Orio F. 2009. Evidence-based and potential benefits of metformin in the polycystic ovary syndrome: a comprehensive review. *Endocr. Rev.* 30:1-50.
- Paschos P, Paletas K. 2009. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia* 13:9-19.
- Pasquali R, Venturoli S, Paradisi R, Capelli M, Parenti M, Melchionda N. 1982. Insulin and C-peptide levels in obese patients with polycystic ovaries. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Metab.* 14:284-287.

- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* 22:153-183.
- Pernicova I, Korbonits M. 2014. Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10:143-156.
- Petersen MC, Shulman GI. 2018. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol. Rev.* 98:2133-2223.
- Poretsky L, Cataldo NA, Rosenwaks Z, Giudice LC. 1999. The Insulin-Related Ovarian Regulatory System in Health and Disease. *Endocr. Rev.* 20:535-582.
- Poretsky L, Kalin MF. 1987. The gonadotropic function of insulin. *Endocr. Rev.* 8:132-141.
- Qiao L, Goldberg JL, Russell JC, Sun XJ. 1999. Identification of Enhanced Serine Kinase Activity in Insulin Resistance. *J. Biol. Chem.* 274:10625-10632.
- Quinn PG, Yeagley D. 2005. Insulin regulation of PEPCK gene expression: a model for rapid and reversible modulation. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metab. Disord.* 5:423-437.
- Rabiee AR, Lean IJ, Gooden JM, Miller BG, Scaramuzzi RJ. 1997. An evaluation of transovarian uptake of metabolites using arterio-venous difference methods in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 48:9-25.
- Radziuk J, Pye S. 2001. Hepatic glucose uptake, gluconeogenesis and the regulation of glycogen synthesis. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 17:250-272.
- Rai A, Tripathi S, Kushwaha R, Singh P, Srivastava P, Sanyal S, Bandyopadhyay S. 2014. CDK5-induced p-PPAR γ (Ser 112) downregulates GFAP via PPREs in developing rat brain: effect of metal mixture and troglitazone in astrocytes. *Cell Death Dis.* 5:e1033.
- Recabarren SE, Padmanabhan V, Codner E, Lobos A, Durán C, Vidal M, Foster DL, Sir-Petermann T. 2005. Postnatal developmental consequences of altered insulin sensitivity in female sheep treated prenatally with testosterone. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 289:E801-E806.
- Reddy P, Adhikari D, Zheng W, Liang S, Härmäläinen T, Tohonen V, Ogawa W, Noda T, Volarevic S, et al. 2009. PDK1 signaling in oocytes controls reproductive aging and lifespan by manipulating the survival of primordial follicles. *Hum. Mol. Genet.* 18:2813-2824.
- Rencurel F, Waeber G, Antoine B, Rocchiccioli F, Maulard P, Girard J, Leturque A. 1996. Requirement of glucose metabolism for regulation of glucose transporter type 2 (GLUT2) gene expression in liver. *Biochem. J.* 314:903-909.
- Rice S, Christoforidis N, Gadd C, Nikolaou D, Seyani L, Donaldson A, Margara R, Hardy K, Franks S. 2005. Impaired insulin-dependent glucose metabolism in granulosa-lutein cells from anovulatory women with polycystic ovaries. *Hum. Reprod.* 20:373-381.

- Rice S, Pellatt LJ, Bryan SJ, Whitehead SA, Mason HD. 2011. Action of metformin on the insulin-signaling pathway and on glucose transport in human granulosa cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96:E427-435.
- Rimon-Dahari N, Yerushalmi-Heinemann L, Alyagor L, Dekel N. 2016. Ovarian Folliculogenesis. *Results Probl. Cell Differ.* 58:167-190.
- el-Roeiy A, Chen X, Roberts VJ, Shimasakai S, Ling N, LeRoith D, Roberts CT, Yen SS. 1994. Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors (IGF-I and II), the IGF and insulin receptors, and IGF-binding proteins-1-6 and the localization of their gene products in normal and polycystic ovary syndrome ovaries. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78:1488-1496.
- Roland AV, Nunemaker CS, Keller SR, Moenter SM. 2010. Prenatal androgen exposure programs metabolic dysfunction in female mice. *J. Endocrinol.* 207:213-223.
- Rosenfield RL, Ehrmann DA. 2016. The Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The Hypothesis of PCOS as Functional Ovarian Hyperandrogenism Revisited. *Endocr. Rev.* 37:467-520.
- 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 (PCOS). *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 19:41-47.
- Rui L. 2014. Energy metabolism in the liver. *Compr. Physiol.* 4:177-197.
- Sacco R, Eggenhoffner R, Giacomelli L. 2016. Glutathione in the treatment of liver diseases: insights from clinical practice. *Minerva Gastroenterol. Dietol.* 62:316-324.
- Saltiel AR. 1996. Diverse signaling pathways in the cellular actions of insulin. *Am. J. Physiol.* 270:E375-385.
- Saltiel AR, Kahn CR. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806.
- Sanders FWB, Griffin JL. 2016. De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 91:452-468.
- Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN. 2001. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 120:1183-1192.
- Scaramuzzi RJ, Brown HM, Dupont J. 2010. Nutritional and metabolic mechanisms in the ovary and their role in mediating the effects of diet on folliculogenesis: a perspective. *Reprod. Domest. Anim. Zuchthyg.* 45 Suppl 3:32-41.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9:671-675.

- Schoppee PD, Garmey JC, Veldhuis JD. 2002. Putative activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma impairs androgen and enhances progesterone biosynthesis in primary cultures of porcine theca cells. *Biol. Reprod.* 66:190-198.
- Schultz GA, Hogan A, Watson AJ, Smith RM, Heyner S. 1992. Insulin, insulin-like growth factors and glucose transporters: temporal patterns of gene expression in early murine and bovine embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 4:361-371.
- Seeger R, Hanoch T, Rosenberg R, Dantes A, Merz WE, Strauss JF, Amsterdam A. 2001. The ERK signaling cascade inhibits gonadotropin-stimulated steroidogenesis. *J. Biol. Chem.* 276:13957-13964.
- Seli E, Duleba AJ. 2004. Treatment of PCOS with metformin and other insulin-sensitizing agents. *Curr. Diab. Rep.* 4:69-75.
- Seto-Young D, Paliou M, Schlosser J, Avtanski D, Park A, Patel P, Holcomb K, Chang P, Poretsky L. 2005. Direct thiazolidinedione action in the human ovary: insulin-independent and insulin-sensitizing effects on steroidogenesis and insulin-like growth factor binding protein-1 production. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90:6099-6105.
- Shah OJ, Wang Z, Hunter T. 2004. Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. *Curr. Biol. CB* 14:1650-1656.
- Shao D, Rangwala SM, Bailey ST, Krakow SL, Reginato MJ, Lazar MA. 1998. Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-gamma. *Nature* 396:377-380.
- Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo S-H, Bardeesy N, Depinho RA, Montminy M, Cantley LC. 2005. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 310:1642-1646.
- She P, Burgess SC, Shiota M, Flakoll P, Donahue EP, Malloy CR, Sherry AD, Magnuson MA. 2003. Mechanisms by Which Liver-Specific PEPCCK Knockout Mice Preserve Euglycemia During Starvation. *Diabetes* 52:1649-1654.
- Shoupe D, Kumar DD, Lobo RA. 1983. Insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 147:588-592.
- Simitsidellis I, Gibson DA, Cousins FL, Esnal-Zufiaurre A, Saunders PTK. 2016. A Role for Androgens in Epithelial Proliferation and Formation of Glands in the Mouse Uterus. *Endocrinology* 157:2116-2128.
- Sir-Petermann T, Hitchensfeld C, Maliqueo M, Codner E, Echiburú B, Gazitúa R, Recabarren S, Cassorla F. 2005. Birth weight in offspring of mothers with polycystic ovarian syndrome. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 20:2122-2126.
- Smith U. 2001. Pioglitazone: mechanism of action. *Int. J. Clin. Pract. Suppl.*:13-18.

- 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.
- Strable MS, Ntambi JM. 2010. Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 45:199-214.
- Stuart CA, Peters EJ, Prince MJ, Richards G, Cavallo A, Meyer WJ. 1986. Insulin resistance with acanthosis nigricans: the roles of obesity and androgen excess. *Metabolism.* 35:197-205.
- Su Y-Q, Denegre JM, Wigglesworth K, Pendola FL, O'Brien MJ, Eppig JJ. 2003. Oocyte-dependent activation of mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) in cumulus cells is required for the maturation of the mouse oocyte-cumulus cell complex. *Dev. Biol.* 263:126-138.
- 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 XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF. 1991. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352:73-77.
- Takayama S, White MF, Kahn CR. 1988. Phorbol ester-induced serine phosphorylation of the insulin receptor decreases its tyrosine kinase activity. *J. Biol. Chem.* 263:3440-3447.
- Tangvarasittichai S. 2015. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J. Diabetes* 6:456-480.
- Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. 2006. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:85-96.
- Taniguchi CM, Ueki K, Kahn CR. 2005. Complementary roles of IRS-1 and IRS-2 in the hepatic regulation of metabolism. *J. Clin. Invest.* 115:718-727.
- Tewari N, Awad S, Macdonald IA, Lobo DN. 2015. Obesity-related insulin resistance: implications for the surgical patient. *Int. J. Obes.* 2005 39:1575-1588.
- Thorens B. 2015. GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia* 58:221-232.
- Tosca L, Chabrolle C, Uzbekova S, Dupont J. 2007. Effects of metformin on bovine granulosa cells steroidogenesis: possible involvement of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (AMPK). *Biol. Reprod.* 76:368-378.

- Tosca L, Ramé C, Chabrolle C, Tesseraud S, Dupont J. 2010. Metformin decreases IGF1-induced cell proliferation and protein synthesis through AMP-activated protein kinase in cultured bovine granulosa cells. *Reproduction* 139:409-418.
- Valverde AM, Burks DJ, Fabregat I, Fisher TL, Carretero J, White MF, Benito M. 2003. Molecular Mechanisms of Insulin Resistance in IRS-2-Deficient Hepatocytes. *Diabetes* 52:2239-2248.
- Vassilatou E. 2014. Nonalcoholic fatty liver disease and polycystic ovary syndrome. *World J. Gastroenterol. WJG* 20:8351-8363.
- 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.* [Internet] 9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4928247/>
- Velez LM, Heber MF, Ferreira SR, Abruzzese GA, Reynoso RM, Motta AB. 2015. Effect of hyperandrogenism on ovarian function. *Reprod. Camb. Engl.* 149:577-585.
- Vendola KA, Zhou J, Adesanya OO, Weil SJ, Bondy CA. 1998. Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. *J. Clin. Invest.* 101:2622-2629.
- Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. 2012. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 122:253-270.
- Walters KA. 2015. Role of androgens in normal and pathological ovarian function. *Reprod. Camb. Engl.* 149:R193-218.
- Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ. 2012. Rodent models for human polycystic ovary syndrome. *Biol. Reprod.* 86:149, 1-12.
- Wang F, Wang S, Zhang Z, Lin Q, Liu Y, Xiao Y, Xiao K, Wang Z. 2017a. Defective insulin signaling and the protective effects of dimethyldiguanide during follicular development in the ovaries of polycystic ovary syndrome. *Mol. Med. Rep.* 16:8164-8170.
- Wang F, Wang S, Zhang Z, Lin Q, Liu Y, Xiao Y, Xiao K, Wang Z. 2017b. Defective insulin signaling and the protective effects of dimethyldiguanide during follicular development in the ovaries of polycystic ovary syndrome. *Mol. Med. Rep.* 16:8164-8170.
- Watson RT, Pessin JE. 2001. Subcellular compartmentalization and trafficking of the insulin-responsive glucose transporter, GLUT4. *Exp. Cell Res.* 271:75-83.
- Webber LJ, Stubbs S, Stark J, Trew GH, Margara R, Hardy K, Franks S. 2003. Formation and early development of follicles in the polycystic ovary. *Lancet Lond. Engl.* 362:1017-1021.
- 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.

- Werner ED, Lee J, Hansen L, Yuan M, Shoelson SE. 2004. Insulin Resistance Due to Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 at Serine 302. *J. Biol. Chem.* 279:35298-35305.
- White MF. 1998. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol. Cell. Biochem.* 182:3-11.
- White MF. 2002. IRS proteins and the common path to diabetes. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 283:E413-E422.
- Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. 2007. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol. Rev.* 87:1-28.
- 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.
- Wolf CJ, Hotchkiss A, Ostby JS, LeBlanc GA, Gray LE. 2002. Effects of Prenatal Testosterone Propionate on the Sexual Development of Male and Female Rats: A Dose-Response Study. *Toxicol. Sci.* 65:71-86.
- Wu XK, Zhou SY, Liu JX, Pöllänen P, Sallinen K, Mäkinen M, Erkkola R. 2003. Selective ovary resistance to insulin signaling in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.* 80:954-965.
- 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.
- Wu Y, Li P, Zhang D, Sun Y. 2018. Metformin and pioglitazone combination therapy ameliorate polycystic ovary syndrome through AMPK/PI3K/JNK pathway. *Exp. Ther. Med.* 15:2120-2127.
- 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.
- Youngren JF. 2007. Regulation of insulin receptor function. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 64:873-891.
- Yu C, Markan K, Temple KA, Deplewski D, Brady MJ, Cohen RN. 2005. The nuclear receptor corepressors NCoR and SMRT decrease peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcriptional activity and repress 3T3-L1 adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 280:13600-13605.
- Yuan L, Ziegler R, Hamann A. 2003. Metformin modulates insulin post-receptor signaling transduction in chronically insulin-treated Hep G2 cells. *Acta Pharmacol. Sin.* 24:55-60.
- Zhang B, Berger J, Zhou G, Elbrecht A, Biswas S, White-Carrington S, Szalkowski D, Moller DE. 1996a. Insulin- and Mitogen-activated Protein Kinase-mediated Phosphorylation and

Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ . J. Biol. Chem. 271:31771-31774.

Zhang B, Berger J, Zhou G, Elbrecht A, Biswas S, White-Carrington S, Szalkowski D, Moller DE. 1996b. Insulin- and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. J. Biol. Chem. 271:31771-31774.

Zhao S, Xu H, Cui Y, Wang W, Qin Y, You L, Chan W-Y, Sun Y, Chen Z-J. 2016. Metabolic actions of insulin in ovarian granulosa cells were unaffected by hyperandrogenism. Endocrine 53:823-830.

Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, et al. 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. J. Clin. Invest. 108:1167-1174.