

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**EVALUACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE
NOREPINEFRINA EN MUJERES EMBARAZADAS CON
SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO TRATADAS Y
NO TRATADAS CON METFORMINA: CONSECUENCIAS A
NIVEL PLACENTARIO**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado académico de
Doctor en Ciencias Farmacéuticas

Por

GRISEL ELISABET MEDINA CONSUEGRA

Directores de Tesis

Dr. Hernán Lara Peñaloza

Dra. Teresa Sir-Petermann

Santiago – Chile

2017

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado y Memoria de Título presentada por el candidato

GRISEL ELISABET MEDINA CONSUEGRA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de doctor en Ciencias Farmacéuticas en el examen público rendido el día

Director de Tesis:

Dr. Hernán Lara Peñaloza

Co-director de Tesis:

Dra. Teresa Sir-Petermann

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Guillermo Díaz

Dr. Cristián Miranda

Dra. Carmen Romero

Dr. Luis Sobrevía

*A mi esposo Jared por su gran amor e incansable dedicación
A mis padres Clarisa y Exequiel por su amor e incondicional apoyo
Con mucho cariño para mi gran familia*

Agradecimientos

Quisiera agradecer primeramente al Dr. Hernán Lara por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por su gran apoyo durante el período de realización de mi tesis y sobre todo durante el período en el cual me encontraba gravemente enferma. Junto con ello, recibí un gran aporte de su conocimiento y formación científica que me serán muy útiles siempre. Finalmente, agradezco el haber colaborado con un gran investigador cuya calidad humana no se encuentra fácilmente.

A la Dra. Teresa Sir-Petermann y su equipo de trabajo, por sus grandes aportes a mi trabajo y preocupación durante el período en el cual me encontraba gravemente enferma.

A Ruth Márquez, por brindarme una enorme ayuda en la realización de este trabajo y por su gran corazón.

A todo el grupo del Laboratorio de Neurobioquímica, por brindarme sus conocimientos y ayuda en cada etapa de este trabajo.

A mis padres por su incansable entrega y cariño, ya que sin ellos yo no estaría aquí. Y a todos aquellos integrantes de mi familia que siempre estuvieron conmigo en los buenos y malos momentos, con los cuales pude contar siempre.

Y en especial a mi esposo Jared por su infinito amor e incondicional apoyo. Es el mejor amigo, esposo y compañero que la vida pudo regalarme.

Financiamiento

Proyecto del Fondo Nacional para el Desarrollo de Ciencias y Tecnología de Chile FONDECYT 1090036 a H.L. y FONDECYT 1110864 a T.S-P.

Becas

1. Beca de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica CONICYT N°21080159, para estudiantes de doctorado en Chile. Años 2008-2012.
2. Beca de Rebaja de Arancel, otorgada por la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Departamento de Posgrado y Postítulo. Universidad de Chile. Años 2013-2016.

Publicaciones

G. Medina, M. Maliqueo, N. Crisosto, B. Echiburú, T. Sir-Petermann, H.E. Lara. Metformin increases norepinephrine transporter expression in placenta of patients with polycystic ovary syndrome. **Eur Rev Med Pharmacol Sci** 21 (15): 3482-3489, publicado en agosto del 2017.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	12
RESUMEN	16
ABSTRACT	18
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Antecedentes generales	20
1.2. Síndrome de ovario Poliquístico (SOP)	20
1.3. Metformina: origen, farmacocinética y farmacodinamia	22
1.4. Etiología del SOP	26
1.4.1. Actividad nerviosa simpática en la etiología del SOP	26
1.4.2. Acción de la insulina en la etiología del SOP	27
1.5. Embarazo en mujeres con SOP	29
1.5.1. Componentes del SOP durante el embarazo y su efecto programador	29
1.6. Placenta	35
1.6.1. Mecanismos de transporte placentario	37
1.6.2. Actividad nerviosa simpática placentaria	37
1.6.3. Efectos de la insulina a nivel placentario	40
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
2.1. Hipótesis	42
2.2. Objetivo general	42
2.3. Objetivos específicos	42
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. Sujetos	44
3.2. Muestras	46
3.2.1. Muestras de sangre	46
3.2.2. Muestras de placenta	46
3.3. Determinación de NE en plasma por HPLC	47

3.4. Determinación de los niveles de NET y evaluación de la señalización insulínica en placenta de término	47
3.4.1. Pre-absorción con péptido de bloqueo para anticuerpo anti-NET	47
3.4.2. Cuantificación de los niveles de la proteína NET mediante western blot	48
3.4.3. Evaluación de la señalización de insulina mediante western blot	49
3.5. Análisis estadístico	49
4. RESULTADOS	
4.1. Objetivo específico 1	50
4.1.1. Características clínicas de las pacientes	50
4.1.2. Determinación de los niveles plasmáticos de NE	51
4.2. Objetivo específico 2	52
4.2.1. Estudio de pre-absorción con péptido de bloqueo para anticuerpo anti-NET	53
4.2.2. Estudio de los niveles de proteína NET en placenta	55
4.2.3. Estudio de señalización de insulina en placenta	57
4.3. NET <i>versus</i> componentes de la señalización insulínica a nivel placentario	61
5. DISCUSIÓN	63
6. CONCLUSIONES	90
7. PROYECCIONES DEL TRABAJO	92
8. REFERENCIAS	93

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLA

FIGURAS.

Figura 1. Estructura de la placenta humana	36
Figura 2. Placenta humana de término	36
Figura 3. Sincitiotrofoblasto: la unidad funcional placentaria	38
Figura 4. Niveles plasmáticos de NE a las 24 y 35 semanas de gestación	52
Figura 5. Bloqueo de anti-NET empleando un péptido específico	54
Figura 6. Cantidad de proteína NET en la cara fetal y materna placentaria	56
Figura 7. Cambios en los niveles de IRS1 de la cara fetal y materna placentaria	58
Figura 8. Cambios en los niveles de GLUT4 de la cara fetal y materna placentaria	60
Figura 9. NET <i>versus</i> componentes de la señalización insulínica a nivel placentario	62
Figura 10. Alteraciones plasmáticas y placentarias observadas en pacientes con SOP embarazadas	91

TABLA

Tabla 1. Características clínicas de las embarazadas en los 3 grupos experimentales y de sus recién nacidos 51

ABREVIATURAS

ACTH: Adrenocorticotropic hormone

ADA: American diabetes association

ADMA: Asymmetric dimethylarginine

ADP: Adenosine diphosphate

AES: Androgen Excess Society

Akt: Protein kinase B

AMH: Anti-Mullerian hormone

AMPK: 5' AMP-activated protein kinase

AMP: Adenosine monophosphate

ANOVA: Analysis of variance

ATP: Adenosine triphosphate

BAT: Brown adipose tissue

3 β -HSD: 3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase

BSA: Bovine serum albumin

°C: Grados Celsius

Ca⁺²: Calcio

cAMP: Cyclic adenosine monophosphate

Cl⁻: Cloruro

C: Control

Cm: Centímetros

CPT1: Carnitine palmitoyl transferase 1

CRH: Corticotropin-releasing hormone

DHEA: Dehydroepiandrosterone

DHEAS: Dehydroepiandrosterone sulfate

EEUU: Estados Unidos de Norteamérica

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

EGF: Epidermal growth factor

FAI: Free androgen index

FAS: Fatty acid synthetase

FBPasa: Fructose biphosphatase

FDA: Food and Drug Administration
FSH: Follicle-stimulating hormone
GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GEG: Grande para la edad gestacional
GLUT1: Glucose transporter type 1
GLUT2: Glucose transporter type 2
GLUT4: Glucose transporter type 4
HLP: Human placental lactogen
HOXA10: Homeobox A10
HPLC: High Performance Liquid Chromatography
hPMEC: Human pulmonary microvascular endothelial cells
IGF1: Insulin-like growth factor 1
IGFBP1: IGF binding protein 1
IMC: Índice de masa corporal
IRS1: Insulin receptor substrate 1
IUGR: Intrauterine growth restriction
Kb: Kilo base
kD: Kilo Dalton
Kg: Kilogramo
LH: Luteinizing hormone
LKB-1: Liver Kinase B1
M: Molar
Mg: Miligramos
MHPG: 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol
miRNA: Micro ribonucleic acid
mM: Mili molar
mRNA: Messenger ribonucleic acid
mTOR: Mammalian target of rapamycin
MW: molecular weight
Na+: Sodio
NaCl: Cloruro de sodio

NaH₂PO₄: Bifosfato de sodio
NADH: Nicotinamide adenine dinucleotide
NE: Norepinephrine
NET: Norepinephrine transporter
NFκB: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NGF: Nerve growth factor
NO: Nitric oxide
NIH: National Institute of Health
OCT1: Organic cation transporter 1
OCT3: Organic cation transporter 3
PAI-1: Plasminogen activator inhibitor-1
PBS: Phosphate buffered saline
PEG: Pequeño para la edad gestacional
PCOS: Polycystic Ovary Syndrome
pg: picogramos
PI3K: Phosphoinositide 3-kinase
PKA: Protein kinase A
PKA-HSL: Protein kinase A-Hormone sensitive lipase complex
RI: Receptor de insulina
ROS: Reactive oxygen species
SEM: Standard error of the mean
SHBG: Sex hormone binding globulin
SOP: Síndrome de Ovario Poliquístico
SOPM: Síndrome de Ovario Poliquístico tratado con metformina durante el embarazo
S14: Spot-14
SREBP-1: Sterol regulatory element-binding protein 1
TBST: Tris, NaCl, Tween-20 buffer
TNFα: Tumor necrosis factor α
UCP1: Uncoupling protein 1
μg: Micro gramos
μL: Micro litros

V: Voltios

VEGF: Vascular endothelial growth factor

WHR: Waist-hip ratio

RESUMEN

El Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP) es una condición familiar, fuertemente apoyada en factores genéticos y ambientales. Bioquímicamente se caracteriza por una secreción alterada de gonadotrofinas, altos niveles de andrógenos libres, insulino resistencia (IR) y un bajo grado crónico de inflamación. Entre las estrategias farmacológicas empleadas en el SOP destaca la metformina, un sensibilizante de la acción de la insulina, que es administrada comúnmente a estas pacientes obteniendo resultados metabólicos favorables. En el año 2005 fue aprobado el uso de metformina en pacientes con SOP embarazadas, ya que en la práctica clínica este fármaco permite mejorar las complicaciones gestacionales propias del SOP. Aunque la fisiopatología del SOP es compleja y pobremente comprendida, se ha sugerido que las mujeres con SOP presentan una actividad simpática aumentada. Modelos de condición quística en ratas dan lugar a una hiperactivación de neuronas simpáticas periféricas que inervan el ovario y a un aumento en la incorporación de Norepinefrina (NE) dentro del mismo, lo que finalmente resulta en el desarrollo y mantención de una condición quística que parece ser reversible si se atenúa la actividad simpática. Un estudio realizado en mujeres con SOP, a las cuales se les midió la actividad simpática del músculo del lecho vascular, mostraron una elevada actividad relacionada positivamente a altos niveles de testosterona. La NE, efector simpático, es un potente mediador de eventos fisiológicos y patofisiológicos en todo el organismo, por lo que su concentración extracelular se encuentra altamente regulada, principalmente por transportadores a nivel de membrana plasmática y a nivel intracelular en la membrana de vesículas de almacenamiento. Estudios en animales y humanos sugieren que el SOP se desarrolla en la vida fetal, por tanto, perturbaciones en el compartimiento materno programan al feto, vía adaptación placentaria y fetal, para desarrollar enfermedades en la vida adulta. Evidencias experimentales indican que la expresión del transportador de NE (NET) a nivel placentario, se encuentra disminuida en enfermedades gestacionales como preeclampsia, de ahí que se ha sugerido una función protectora para NET en placenta. Aunque las mujeres con SOP presentan un alto riesgo de padecer preeclampsia, no existe evidencia de las posibles alteraciones en la expresión de este transportador en placenta de mujeres con SOP. Para resolver nuestra hipótesis de trabajo empleamos muestras de plasma y placenta de término de mujeres con SOP con y sin tratamiento con metformina y mujeres control. Al evaluar los niveles plasmáticos de NE

observamos que a las 24 semanas de gestación hubo un significativo incremento en la concentración plasmática de NE en mujeres con SOP que disminuyó significativamente a la semana 35, lo que podría estar dando cuenta de una desregulación en la actividad del sistema nervioso autónomo en estas pacientes durante el embarazo y de posibles mecanismos compensatorios frente a una hiperactividad adrenérgica. El tratamiento con metformina permitió disminuir significativamente los niveles plasmáticos de NE tanto en la semana 24 como 35 de gestación. En placenta de término de gestantes con SOP observamos una marcada disminución de la proteína NET en ambas caras placentarias, que está inversamente relacionada con los niveles de GLUT4. Sin embargo, el tratamiento con metformina restauró los niveles de proteína NET alcanzando niveles aún mayores que las mujeres control sólo en la cara materna placentaria, lo que sugiere que la actividad nerviosa autonómica no solo modifica la exposición fetal a catecolaminas, sino que el hecho de que responda al tratamiento con metformina también sugiere que está relacionada con alteraciones metabólicas asociadas con el síndrome. Por otro lado, componentes río abajo de la señalización del receptor de insulina, IRS1 y GLUT4, se encontraron alterados en placenta de término de pacientes con SOP. Sin embargo, el tratamiento con metformina durante el embarazo permitió corregir estas alteraciones principalmente en la cara materna de la placenta, lo que sugiere que el mejoramiento del estado hiperinsulinémico en la madre permite restablecer parcialmente la homeostasis metabólica placentaria. El conjunto de estos resultados muestra que las mujeres con SOP presentan un componente simpático alterado durante el embarazo, responsable de producir respuestas adaptativas placentarias a nivel de la proteína NET. Dicha respuesta adaptativa en conjunto con las alteraciones en la señalización insulínica placentaria, podrían ser responsables de la perpetuación del fenotipo SOP en la descendencia de estas pacientes. Por otro lado, la metformina ha demostrado ser una herramienta farmacológica útil que permite corregir las alteraciones simpáticas y metabólicas a distintos niveles, presentes en pacientes con SOP embarazadas, apareciendo como un agente integrador de patologías que involucran componentes metabólicos, circulatorios y neuroendocrinos.

ABSTRACT

Evaluation of plasma norepinephrine levels in pregnant women with Polycystic Ovary Syndrome treated and not treated with metformin: consequences at placental level

Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is a familial status, strongly supported by genetic and environmental factors. Biochemically characterized by an altered secretion of gonadotropins, high levels of free androgens, insulin resistance (IR) and chronic low -grade inflammation. Among the pharmacological strategies employed in PCOS stands metformin, sensitizer of insulin action, which is commonly administered to these patients obtaining favorable metabolic results. In 2005 was approved the use of metformin in pregnant patients with PCOS because in clinical practice this drug improves pregnancy complications of PCOS. Although the pathophysiology of PCOS is complex and poorly understood, it has been suggested that women with PCOS have increased sympathetic activity. Models of cystic condition in rats leading hyper activation to peripheral sympathetic neurons innervating the ovary and an increase in the uptake of norepinephrine (NE) therein, which ultimately results in the development and maintenance of a cystic condition that seems reversible if sympathetic activity is attenuated. A study in women with PCOS, to which muscle sympathetic activity of the vascular bed were measured, showed high sympathetic activity positively related to high levels of testosterone. The NE, sympathetic effector, is a potent mediator of physiological and pathophysiological events throughout the organism, so its extracellular concentration is highly regulated, primarily at the level of conveyor plasma membrane and intracellular level in the membrane of storage vesicles. Studies in animals and humans suggest that PCOS is developed in fetal life, therefore, disruptions in the maternal compartment programming to the fetus, via the placenta and fetal adaptation, for developing diseases in adulthood. Evidence indicates that expression of the NE transporter (NET) to placental level is decreased in gestational diseases as preeclampsia, there has been suggested a protective function for NET in placenta. Although women with PCOS are at high risk for preeclampsia, there is no evidence of possible alterations in the expression of this transporter in placenta of women with PCOS. To solve our working hypothesis, we use plasma samples and term placenta of women with PCOS with or without treatment with metformin and control women. In assessing plasma levels of NE we note that at 24 weeks of gestation was

a significant increase in the plasma concentration of NE in PCOS women and then decreased significantly at week 35, which could account for deregulation in activity of autonomic nervous system in these patients during pregnancy and compensatory mechanisms against adrenergic hyperactivity. Metformin allowed significantly decrease plasma levels of NE in both 24 and 35 week of gestation. In term placenta of pregnant PCOS women we observed a marked decrease in NET levels in both placental faces and is inversely related to levels of GLUT4. However, metformin restored levels of NET protein reaching even higher levels than control women only in placental maternal face, suggesting that the autonomic nervous activity not only modifies fetal exposure to catecholamines, but the fact to respond to treatment with metformin also suggests that it is related with metabolic disorders associated with this syndrome. On the other hand, we found altered levels of downstream components of the insulin receptor signaling, IRS1 and GLUT4. However, treatment with metformin during pregnancy was able to correct these alterations mainly in the maternal side of the placenta, suggesting that the improvement of hyperinsulinemic state in the mother can partially restore the placental metabolic homeostasis. All of these results shows that women with PCOS have a sympathetic component altered during pregnancy and it is responsible for producing adaptive responses in placental protein NET. Such adaptive response in conjunction with alterations in placental insulin signaling could be responsible for the perpetuation of PCOS phenotype in the offspring of these patients. Furthermore, metformin has proven be a useful pharmacological tool to correct the sympathetic and metabolic alterations at different levels, present in PCOS pregnant woman, appearing as an integrator agent for pathologies involving metabolic, circulatory and neuroendocrine components.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes generales.

El síndrome de ovario poliquístico (SOP), es un desorden reproductivo común en mujeres en edad fértil asociado a hiperandrogenemia, insulinoresistencia, obesidad e infertilidad, que puede tener implicancias importantes sobre el embarazo y la salud a largo plazo de las mujeres que lo padecen (1). Desde hace ya algunos años Lara y colaboradores, han estudiado la participación del estrés en la patología ovárica empleando modelos animales de condición quística que demuestran la existencia de un importante control neuronal sobre la función ovárica (2,3). El uso de estos modelos animales ha permitido trasladar este conocimiento hacia pacientes con SOP, apoyando fuertemente la participación de los nervios simpáticos en la función ovárica en condiciones normales y patológicas (4,5). En humanos, se ha propuesto que existe una alteración en la actividad del sistema nervioso simpático que contribuye a la etiología del SOP, aunque se desconoce su papel en la aparición de esta condición (4,6). La participación del sistema nervioso simpático en el SOP se ve reforzada por el hallazgo de una mayor densidad de fibras nerviosas catecolaminérgicas en ovarios de mujeres con SOP (7) y una alterada secreción periférica de catecolaminas en adolescentes con SOP (8). Aunque en la literatura encontramos un creciente número de evidencias que hacen mención de las repercusiones negativas a largo plazo que las alteraciones metabólicas y simpáticas tienen sobre la salud de las mujeres con SOP (4,6,9-11), no existe evidencia que indique cómo dichas alteraciones las afectarían en condiciones de embarazo y más específicamente a nivel placentario.

1.2. Síndrome de ovario Poliquístico (SOP)

El SOP afecta aproximadamente entre un 4 a 8% de las mujeres en edad reproductiva y es la causa más común de irregularidades menstruales e infertilidad (12,13). Su patofisiología exacta es compleja y pobremente comprendida (14) y su incidencia es mayor en personas de origen africano/caucásico y de ascendencia asiática (15). Los registros médicos que datan desde los tiempos de Hipócrates, proporcionan evidencia de la existencia de diversas características físicas en ciertas mujeres similares a las observadas en el SOP que incluyen oligo/amenorrea, infertilidad, contextura física robusta, hirsutismo y virilización (16).

Aunque las características físicas de este trastorno han sido reconocidas desde hace milenios, actualmente no existe una definición de SOP universalmente aceptada (17). En 1990 un panel de expertos convocados por el Instituto Nacional de Salud (sigla en inglés NIH) de Estados Unidos, propuso criterios diagnósticos para el SOP que requieren la presencia de hiperandrogenismo, oligomenorrea y/o amenorrea (17). En 2003, el consenso de Rotterdam amplió los criterios NIH al incluir evidencia de ovario poliquístico al ultrasonido pélvico (18). En 2006, la Sociedad de Exceso de Andrógenos (sigla en inglés AES) concluyó que la hiperandrogenemia es esencial en el diagnóstico del SOP y debe estar acompañada de disfunción ovárica o quistes ováricos evidenciados al ultrasonido pélvico (19). Todas las guías diagnósticas requieren de la presencia de al menos 2 de 3 de las características clásicas del SOP: irregularidad menstrual, hiperandrogenismo y morfología de ovario poliquístico evidenciada por ultrasonido pélvico (18). Bioquímicamente el SOP se caracteriza por una secreción alterada de gonadotrofinas (LH y FSH), altos niveles de andrógenos libres, insulino resistencia (20,21) y un bajo grado crónico de inflamación (22). Se ha sugerido que la insulino resistencia e inflamación, presentes en las mujeres con SOP, son responsables del aumento en el riesgo de padecer diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares, en el largo plazo (17,22,23). El creciente conocimiento enfocado en la comprensión de la fisiopatología del SOP, ha creado la necesidad de modificar el manejo terapéutico de las mujeres afectadas. Mucha de la investigación en este campo se ha enfocado en el descubrimiento de herramientas farmacéuticas eficaces para el manejo terapéutico global de este síndrome multicomponente (24). Un enfoque terapéutico racionalizado debería tener en cuenta el hecho de que en estas pacientes coexisten anormalidades reproductivas y cardiometabólicas. Por tanto, sensibilizadores de la insulina, especialmente metformina, han sido introducidos como una opción farmacéutica dirigida no sólo a la insulino resistencia, sino a varios otros aspectos de este síndrome incluyendo anormalidades reproductivas (24-26). La Federación Internacional de Diabetes (sigla en inglés ADA) recomienda el uso de metformina cuando los cambios en el estilo de vida no dan resultado (25). La metformina es una droga de categoría B, según la denominación de la FDA, es decir, no hay evidencia de riesgo en humanos y animales (27). Es por ello que algunos especialistas emplean metformina para el tratamiento de la diabetes en mujeres embarazadas (28). Desde el año 2005, la ADA aprobó su uso durante el embarazo, por lo que

actualmente es un tratamiento recomendado ya que disminuye el riesgo de diabetes gestacional, preeclampsia, abortos espontáneos y disminuye la exposición del feto a un exceso de andrógenos (29-31).

1.3. Metformina: origen, farmacocinética y farmacodinamia

La metformina es el fármaco por vía oral de primera línea para el tratamiento de la diabetes tipo 2, cuya estructura química presenta un grupo biguanida. Deriva originalmente de la *Galega officinalis*, que fue empleada por primera vez para el alivio de la poliuria en el antiguo Egipto y zonas europeas medievales (32). Algunos miembros de la familia de la biguanidas incluyen la metformina, fenformina y buformina, que fueron identificados como los componentes activos de la *Galega officinalis* en 1920, y posteriormente fueron desarrolladas como fármacos para el tratamiento de la diabetes tipo 2 en los países europeos durante la década de los cincuenta (32). Sin embargo, debido al desarrollo de acidosis láctica grave tras el uso de fenformina y buformina, sólo la metformina fue aprobada como un fármaco seguro y efectivo para el manejo de la diabetes tipo 2 en el Reino Unido en 1958 y en EEUU en 1990 (32). Ocasionalmente, la administración de metformina a pacientes con diabetes tipo 2 se relaciona a una baja tasa de incidencia de acidosis láctica y dentro de los casos reportados corresponden a pacientes con una pobre función renal o debido a impurezas presentes en la formulación del medicamento. Sin embargo, la metformina sigue siendo considerada un fármaco seguro, efectivo, de bajo costo y bien tolerado (32). Entre sus efectos benéficos destacan su acción hipoglucemiante, una reducción en la incidencia de enfermedades cardiovasculares y una posible reducción en la incidencia de cáncer, entre otros (33). Este fármaco disminuye la hiperglicemia sin estimular la secreción de insulina, ni producir aumento de peso o hipoglicemia. Su capacidad de disminuir los niveles plasmáticos de glucosa resulta de una disminución de la producción hepática de glucosa y de un aumento en la captación y utilización de glucosa en los tejidos periféricos, principalmente en músculo esquelético. Sus efectos benéficos sobre los lípidos circulantes se han relacionado a una disminución de la producción hepática de lípidos (34). En pacientes con SOP se observa que a los efectos benéficos ya mencionados para la metformina, se suman efectos benéficos sobre la fertilidad, entre los que destacan un mejoramiento de la función ovulatoria y un mejoramiento de la receptividad endometrial reflejada en una disminución de la impedancia

de las arterias uterinas gracias a una disminución en la expresión de endotelina-1 a nivel endometrial, junto con una disminución en los niveles séricos de andrógenos y la expresión de su receptor a nivel endometrial, durante la fase lútea, disminuyendo así su efecto vasoconstrictor; en un aumento en la expresión de marcadores de receptividad endometrial tales como integrina $\alpha 5\beta 3$, HOXA10, Glicodelina-1 e IGF-1, como consecuencia de la disminución en los niveles de andrógenos circulantes; en un mejoramiento de los parámetros ecogénicos uterinos; y en un aumento en la expresión de GLUT4 a nivel endometrial, cuya expresión se encuentra disminuida en pacientes con SOP (35). La mejoría de la receptividad endometrial permitiría disminuir la incidencia de abortos espontáneos recurrentes en mujeres con SOP y, una vez alcanzado el embarazo, el tratamiento con metformina disminuye significativamente la incidencia de enfermedades gestacionales a las cuales son propensas estas pacientes (36). La metformina es excretada en forma inalterada por la orina y bilis. La farmacocinética de la metformina es determinada por su transporte activo a través de transportadores de cationes orgánicos claves, principalmente OCT1. Los efectos potentes y diferenciales de la metformina en el hígado pueden ser explicados por el hecho de que este medicamento al ser ingerido por vía oral se transporta directamente desde el intestino (a través de la vena portal) hacia el hígado, alcanzando una concentración mucho mayor respecto de otros tejidos periféricos, sumado a un alto nivel de expresión de OCT1 en este órgano, que transporta activamente a la metformina hacia su sitio de acción en los hepatocitos (33). La metformina fue descubierta antes de la era del desarrollo de fármacos basados en dianas celulares y su mecanismo molecular de acción sigue siendo un área de intensa investigación (34). Se ha demostrado que la metformina activa la vía de señalización de AMPK, principal regulador celular del metabolismo de lípidos y glucosa, en hepatocitos de rata y humanos (33,34), observándose una reducción en la actividad de la acetil-CoA-carboxilasa, enzima que cataliza la síntesis de *novo* de ácidos grasos e inhibe a la CPT1, enzima limitante para la oxidación de ácidos grasos; además, se observa una supresión de la expresión de enzimas lipogénicas tales como FAS y S14; también se ha observado una supresión en la expresión de factores de transcripción lipogénicos tales como SREBP-1 (que codifica para FAS y S14); y una inducción de la oxidación de ácidos grasos gracias a los efectos antes mencionados (34). La activación de AMPK en hepatocitos es también responsable de la disminución en la producción hepática de glucosa. Por otro lado, en células

musculares de rata, la metformina estimula la captación de glucosa, efecto que coincide con la activación de AMPK y que es aditivo a la acción de insulina. La activación de AMPK proporciona una explicación unificada para los efectos pleiotrópicos de este fármaco (34).

Recientemente se ha cuestionado la acción antidiabética de la metformina vía activación de AMPK, cuestionamiento basado en datos obtenidos de modelos *knockout*, colocando a los efectos independientes de AMPK en el centro de atención por primera vez en más de una década. Los mecanismos moleculares independientes de AMPK incluyen su acción sobre las mitocondrias y que se cree es el sitio principal de acción (33,37). Los primeros estudios fisiológicos que emplearon biguanidas mostraron una reducción del consumo de oxígeno acompañada de hipoglicemia, sugiriendo que este orgánulo es un importante sitio de acción de agentes en cuya estructura química esté presente la guanidina (33). En mitocondrias aisladas de células hepáticas y cardíacas de rata, el tratamiento con metformina inhibe directamente el complejo 1 de la cadena respiratoria mitocondrial; esta inhibición es tiempo y concentración dependiente lo que sugiere que la metformina permea lentamente a través de la membrana mitocondrial interna en donde posteriormente produce la inhibición del complejo 1, la que puede ocurrir a concentraciones terapéuticas en pacientes tratados con este fármaco (37). Adicionalmente, muchos otros efectos conocidos del tratamiento con metformina como el incremento del metabolismo periférico de glucosa y la estimulación de la producción glicolítica de lactato por el intestino, se prevé que se produzcan como consecuencias de la inhibición de la cadena respiratoria (37). El aumento de la utilización de glucosa dependiente de insulina por los tejidos periféricos observado después del tratamiento con metformina, está asociado con el aumento en la expresión de transportadores de glucosa (sigla en inglés GLUT) 1 y 4 en la membrana plasmática de estas células. Es sabido que, en muchas células, por ejemplo en corazón, una modesta inhibición de la cadena respiratoria aumenta la expresión de transportadores de glucosa y enzimas glicolíticas (37). Así, una inhibición modesta de la cadena respiratoria por acción de la metformina podría tener un efecto similar. También podría pensarse que un aumento del lactato en sangre podría ocurrir como un resultado del incremento en la actividad glicolítica, que por lo general se observa en los pacientes tratados con metformina. El efecto usualmente es pequeño, reflejando la capacidad de otros tejidos tales como corazón y músculo para oxidar el exceso de ácido

láctico (37). Foretz y colaboradores, demostraron que el AMP *per se*, pero no AMPK, puede tener un papel vital en la inhibición de la producción hepática de glucosa. Estos autores también demostraron que la metformina produce una disminución de los niveles de ATP y un aumento concomitante en los niveles de AMP, existiendo una estrecha relación entre la magnitud de la reducción de los niveles de ATP y la inhibición de la producción hepática de glucosa. Así, los efectos mitocondriales de la metformina, que son río arriba de los efectos de AMPK y, por tanto, independientes de la cinasa, podrían contribuir directamente al control del flujo gluconeogénico. Por otro lado, Miller y colaboradores encontraron que la metformina antagoniza los efectos del glucagón sobre la adenilato ciclasa, atenuando el aumento en los niveles de cAMP dependientes de glucagón y la activación concomitante de la proteína cinasa dependiente de cAMP (PKA) y su vía de señalización, cuya acción es crítica en el control de la gluconeogénesis durante el ayuno (33). Otros efectos farmacológicos de la metformina se han obtenido de diversos estudios. Primeramente, estudios *in vitro* han mostrado que la metformina ejercería un efecto protector indirecto sobre el endotelio vascular, gracias a la reducción de la producción hepática de glucosa y niveles de insulina circulantes y un efecto protector directo vía activación de AMPK que resulta en un aumento en la síntesis de NO, junto con una disminución de las especies reactivas del oxígeno por inhibición del complejo I mitocondrial (33,38), disminuyendo el riesgo de enfermedades cardiovasculares en un 40% (39). En el caso de pacientes con SOP, se ha sugerido que el riesgo cardiovascular se asocia a elevados niveles de homocisteína, y que el tratamiento con metformina disminuye sus niveles en mujeres con SOP delgadas (40). Adicionalmente, el tratamiento con metformina mejora la función endotelial en pacientes con SOP al disminuir los niveles séricos de PAI-1 y ADMA (41). Finalmente, la metformina es capaz de disminuir la presión arterial en pacientes con diabetes tipo 2 (42). En segundo lugar, un gran número de reportes clínicos y epidemiológicos han señalado que la administración oral de metformina reduce el riesgo de desarrollo y progresión de varios tipos de tumores. Experimentos *in vitro* e *in vivo* dan cuenta de la actividad anti-cancerígena de la metformina mediada a través de la activación de las vías de señalización supresoras de tumores tales como LKB1-AMPK, e inhibición de vías pro-oncogénicas tales como Akt/mTOR, insulina/IGF-1, NFκB y VEGF (32). Por otro lado, cultivos de células cancerígenas que presentan un fenotipo muy agresivo muestran que, al ser tratadas con metformina son más

sensibles a la quimioterapia (32). Creciente evidencia sugiere que el tratamiento con metformina regula además la expresión génica vía miRNA, los cuales han mostrado tener una acción antitumoral (32).

1.4. Etiología del SOP

Aunque su etiología no es bien comprendida aún, numerosas evidencias indican que el SOP es una condición familiar, fuertemente apoyada en factores genéticos y ambientales (43-45). Aunque no hay genes universalmente aceptados en la etiología del SOP, algunas publicaciones señalan que existen modificaciones en la estructura molecular de gonadotropinas y sus receptores, de enzimas esteroidogénicas y en la acción y secreción de la insulina (43). Otros estudios sugieren que el SOP se origina en la vida fetal (46,47). Esta hipótesis se basa en datos obtenidos de modelos animales, principalmente monos u ovejas expuestas a altas concentraciones de andrógenos en la vida prenatal, apoyados por estudios clínicos (44,46,48). Se sugiere que mujeres expuestas a un exceso de andrógenos, en cualquier estado del desarrollo fetal del ovario hasta el inicio de la pubertad, conduce a muchas de las características del SOP, incluyendo anomalías en la secreción de hormona luteinizante (sigla en inglés LH) y la secreción de insulina (44,48,49).

1.4.1. Actividad nerviosa simpática en la etiología del SOP

El SOP es una condición patológica que presenta alteraciones tales como hiperandrogenemia, hiperinsulinemia, insulino resistencia, obesidad abdominal y enfermedades cardiovasculares, todos los cuales se piensa están asociados a un aumento de la actividad del sistema nervioso simpático (4,50,51). Este síndrome también se asocia con alteraciones en el eje somatotrópico (Hormona del crecimiento/IGF-1), que desempeña un papel central en la regulación del tráfico nervioso simpático (4,51). Estudios han mostrado que las mujeres con SOP presentan una correlación positiva entre los niveles de testosterona y la actividad nerviosa simpática, lo que sugiere que el grado de simpato-excitación está relacionado al grado de severidad del SOP (4). Otro estudio realizado en adolescentes con SOP, reveló que estas pacientes presentan una alteración catecolaminérgica periférica, sugiriendo una posible alteración en el metabolismo y/o captación de norepinefrina (NE) (8). A nivel ovárico, las mujeres con SOP presentan una mayor densidad de fibras catecolaminérgicas, relacionada con la

hiperandrogenemia en estas pacientes (51). Por otro lado, estudios clínicos muestran que las mujeres con SOP recuperan temporalmente la función ovárica después de una resección en cuña del ovario (52). Otros estudios en ratas, a las que se les indujo una condición quística por administración de una única dosis de estradiol valerato, resulta en profundos cambios en la homeostasis catecolaminérgica en el ovario, iniciados después del desarrollo de quistes y que persisten después de la formación de los mismos (3,53,54). Sin embargo, este proceso parece ser reversible si se atenúa la actividad simpática (3,53,54). Otro estudio de modelos SOP en ratas mostró que el tratamiento con electro-acupuntura disminuye la concentración del factor de crecimiento nervioso (sigla en inglés NGF), el cual aumenta la actividad del sistema nervioso simpático, logrando una inhibición de la hiperactividad simpática presente en este modelo (55).

1.4.2. Acción de la insulina en la etiología del SOP

Estudios de la acción insulínica en adipocitos aislados de mujeres con SOP, han revelado marcados descensos en la sensibilidad a la insulina, junto con una disminución en el transporte de glucosa estimulado por insulina, que es secundario a una disminución significativa en la abundancia de GLUT4 (56). Por otro lado, existe evidencia de una disminución en los niveles de adenosina en adipocitos de mujeres con SOP, pero si esto es un defecto primario o secundario a la hiperinsulinemia no está claro. Defectos similares se han observado en pacientes con diabetes *mellitus* no insulino dependiente y obesidad, pero mejoran al controlar la glicemia e hiperinsulinemia, como así también el peso corporal, lo que sugiere que son defectos adquiridos más que intrínsecos (56,57). En contraste, tales defectos en mujeres con SOP pueden ocurrir en ausencia de obesidad, intolerancia a la glucosa o cambios en la circunferencia de cintura (56,58). Además, estas anormalidades no se correlacionan significativamente con los niveles de hormonas sexuales, sugiriendo que tales anormalidades en el SOP pueden ser intrínsecas (58). Estudios en cultivos de fibroblastos aislados de la piel de mujeres con SOP, han evaluado la función del receptor de insulina observándose una disminución en la autofosforilación del receptor, específicamente se observa una disminución en la fosforilación de residuos de tirosina mientras que la fosforilación de residuos de serina se encuentra aumentada (59). Esta aumentada fosforilación en residuos de serina de los sustratos del receptor de insulina está presente

también en células de músculo esquelético provenientes de mujeres con SOP (59). Dicha anomalía parece ser un defecto único del SOP, ya que en otras condiciones de insulino resistencia como obesidad y diabetes *mellitus* no insulino dependiente, no está presente (57,59). Adicionalmente, estas pacientes presentan defectos río abajo en la señalización del receptor de insulina como una disminución de la activación de PI3K y una disfunción en las células β pancreáticas (60). La hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina presente en mujeres con SOP, afecta negativamente a la foliculogénesis y la ovulación (61,62). Estudios de morfología ovárica han mostrado que sólo aquellas mujeres que no ovulan y que presentan una morfología SOP, son insulino resistentes. En contraste, las mujeres que ovulan, que menstrúan regularmente y presentan hiperandrogenismo o con SOP detectado al ultrasonido ovárico, no son insulino resistentes (62). Estudios *in vitro* muestran que la insulina es capaz de estimular la secreción ovárica de estrógenos, andrógenos y progesterona (56). La presencia de receptores de insulina en las membranas ováricas, no necesariamente indica un papel fisiológico para la insulina en la regulación de la esteroidogénesis, ya que tales receptores se encuentran ampliamente distribuidos por todo el organismo (63). La insulina se encuentra en pequeñas concentraciones en fluido folicular, sugiriendo que la insulina no posee una producción local. En contraste el factor de crecimiento tipo insulina 1 (sigla en inglés IGF1), es producido en ovario y sus receptores están presentes en este tejido (56). Algunos estudios sugieren que IGF1, puede jugar un papel importante en la regulación de la maduración folicular ovárica (64,65) y esteroidogénesis (66,67). La acción de IGF1 es modulada por la proteína que une IGF1 (sigla en inglés IGFBP1), un producto de síntesis hepática que es inhibido por insulina (68,69). La síntesis de IGFBP1 también tiene lugar en las células de la granulosa ovárica (70) y endometrio (71), y en ambos sitios su síntesis es inhibida por insulina (56,61). En mujeres con SOP, se han observado bajos niveles plasmáticos de IGFBP1 (56,72,73), lo que conduce a un aumento en la biodisponibilidad ovárica de IGF1 y en consecuencia aumentan las anormalidades esteroidogénicas ováricas por activación de sus receptores (56). Altas concentraciones de insulina pueden imitar la acción de IGF1, al ocupar los receptores de IGF1. Este mecanismo ha sido propuesto para el hiperandrogenismo mediado por insulina (74,75). Sin embargo, se ha demostrado que la insulina ejerce sus efectos en la esteroidogénesis ovárica por acción sobre su propio receptor (76). Estudios en cultivos de fibroblastos provenientes de la piel de mujeres con SOP,

muestran que la actividad sobre la esteroidogénesis ovárica es preservada, aún en condiciones de insulino resistencia, sugiriendo un mecanismo que explica los defectos selectivos de la acción insulínica, ya que sólo se observa una alteración de la vía que regula el metabolismo de carbohidratos. Esto podría explicar la paradoja de la persistente producción de andrógenos estimulada por insulina en mujeres con SOP insulino resistentes (56).

1.5. Embarazo en mujeres con SOP

El embarazo es un período marcado por profundos cambios en el estado hormonal y metabólico de la mujer. La capacidad para regular el balance de nutrientes durante este período es crítica para la salud de la madre y del feto (77). Sin embargo, el estado hormonal y metabólico en las mujeres con SOP se encuentra profundamente alterado antes del embarazo (20,21) y se altera aún más durante el mismo (30). El SOP es la causa más común de infertilidad anovulatoria y da cuenta del 90 a 95% de las consultas de mujeres con anovulación en clínicas de fertilidad (14,78). Sin embargo, el 60% de las mujeres con SOP son fértiles y el 90% de las mujeres con SOP infértiles tiene sobrepeso u obesidad, la que se correlaciona con una exacerbación de la infertilidad, reducción de la eficacia de los tratamientos de fertilidad y aumento en la tasa de abortos espontáneos independiente de la edad de la madre (14,78). Además, las mujeres con SOP embarazadas tienen un riesgo aumentado de desarrollar diabetes gestacional (79) y preeclampsia, principalmente en la población de pacientes obesas (1). Un meta análisis y caso-control concluyeron que las mujeres con SOP embarazadas, presentan un mayor riesgo de complicaciones durante el embarazo y neonatales, junto con restricción del crecimiento intrauterino (sigla en inglés IUGR) (1,30,80), y que estas complicaciones pueden mejorarse si se trata a las embarazadas con metformina (80,81). Otro estudio realizado en mujeres embarazadas con SOP mostró que estas mujeres presentan una mayor prevalencia de niños pequeños para la edad gestacional (PEG) y/o niños grandes para la edad gestacional (GEG) (1,82).

1.5.1. Componentes del SOP durante el embarazo y su efecto programador

Modelos animales y observaciones clínicas muestran que la exposición fetal a un exceso de andrógenos puede inducir cambios en la diferenciación de tejidos dando lugar a un fenotipo SOP en la vida adulta (48). En ratones hembra, la exposición a testosterona durante el

desarrollo programa características de disfunción cardiometabólica similares a las observadas en mujeres con SOP, incluyendo un aumento del tono simpático, adiposidad visceral, insulino resistencia, prediabetes e hipertensión (50). Sir-Petermann y colaboradores han demostrado que, durante el embarazo, las mujeres con SOP presentan mayores niveles de insulina y andrógenos respecto de las gestantes normales (81), aunque el origen del exceso de andrógenos durante el embarazo es incierto (48,83). Normalmente los andrógenos maternos o aquellos provenientes de la adrenal fetal son rápidamente convertidos a estrógenos por acción de la aromatasas placentaria. Sin embargo, si la actividad de esta enzima se ve comprometida, la biodisponibilidad de los andrógenos aumenta. En cultivos de citotrofo blastos humanos, la insulina ha mostrado inhibir la actividad aromatasas y estimular la actividad 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Sigla en inglés 3 β -HSD). Así, en mujeres con SOP embarazadas, la hiperinsulinemia podría potencialmente contribuir a la exposición de la vida gestante a un exceso de andrógenos (48). Por su parte, Sir-Petermann y colaboradores demostraron que en placenta de término de mujeres con SOP la actividad de la enzima 3 β -HSD-1 se encuentra aumentada y la actividad de la P450 aromatasas se encuentra disminuida en placenta de mujeres con SOP, conduciendo a un aumento de los andrógenos maternos. Junto con ello, la disminución de la concentración de androstenediona en la sangre de cordón umbilical observada en este estudio, podría reflejar un mecanismo de adaptación fetal frente a una hiperandrogenemia en etapas tempranas de la gestación (84). Otros estudios sugieren que la exposición a andrógenos *in utero* predispone a los individuos a desarrollar una hiperandrogenemia, una hiperinsulinemia y una disfunción de las células β -pancreáticas (85). Modelos animales de androgenización *in utero* dan cuenta de la importancia del período gestacional en el cual los efectos programadores ejerzan su acción, ya que una androgenización en estadios tempranos de la gestación conduce a un fenotipo SOP insulino resistente e hipersecretor de LH, en cambio, una androgenización tardía conduce a un fenotipo SOP sin anormalidades en la secreción de insulina y LH (86). Por otro lado, la androgenización fetal conduce a un aumento en la secreción de insulina en estadios fetales como así también infantiles, y se ha sugerido que la adrenal fetal o infantil puede ser susceptible a la acción insulínica sobre la actividad del citocromo P450c17 conduciendo a un hiperandrogenismo adrenal, que puede ser corregido gracias al tratamiento con un sensibilizador de la insulina como pioglitazona (86). Maliqueo y colaboradores (87),

muestran que las alteraciones observadas en los modelos animales de androgenización también se observan en las hijas de pacientes con SOP, en cuanto a una hipersecreción de andrógenos adrenales e insulino resistencia, junto con un aumento en la maduración ósea para su edad y una aumentada adrenarquia. Estos hallazgos dan cuenta de los primeros eventos que tienen lugar en el desarrollo de SOP, e indican que los andrógenos adrenales pueden modular la aparición o progresión de la pubertad. Por otro lado, una aumentada actividad del citocromo P450c17 en la adrenal podría ser uno de los eventos moleculares que promuevan la aparición de adrenarquia, la cual se ha asociado también a hiperinsulinismo y bajo peso al nacer (87). Todas estas alteraciones podrían ser el paso inicial en el desarrollo de SOP en estas niñas en situación de riesgo, quienes fueron programadas *in utero*.

El embarazo trae consigo cambios importantes en los ejes hipotálamo-pituitario-adrenal, esenciales para el adecuado curso del mismo. Los glucocorticoides desempeñan un rol primordial en la maduración de los órganos fetales, la sincronización del parto y posiblemente en procesos de programación fetal del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal en los cuales se vea involucrado el estrés (88-90). A comienzos del segundo trimestre, la secreción materna de cortisol aumenta y hacia el final del embarazo la placenta, vía hormona liberadora de corticotrofina, juega un rol crucial en la regulación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal fetal para asegurar la sincronización de diversos procesos involucrados en el parto (88,91). Por otro lado, el aumento en los niveles de corticosteroides hacia el final del embarazo regula negativamente la actividad de los nervios simpáticos (92-94). Sin embargo, en condiciones patológicas como el SOP, se desconoce si dicha regulación negativa es efectiva o si pudiera existir una acción conjunta entre actividad simpática y el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal, ya que las catecolaminas estimulan su actividad (90). De hecho, la mujer SOP no gestante presenta una hiperactividad suprarrenal que conduce a elevados niveles plasmáticos de cortisol tras ser estimuladas con hormona liberadora de corticotropina (95), que además se asocia con obesidad central e insulino resistencia (96). Todas estas alteraciones podrían persistir durante el embarazo y contribuir al desarrollo de enfermedades gestacionales, complicaciones del embarazo y programación fetal relacionada con estrés (88).

A nivel cerebral, la ontogenia de los dimorfismos sexuales tiene lugar en el período perinatal y, en distinto grado, a lo largo de toda la vida. Estudios en ratas muestran que durante el período prenatal correspondiente al día gestacional 18 y el período postnatal correspondiente al día 10, el cerebro es vulnerable a la desfeminización/masculinización por hormonas esteroidales. Esta corta ventana de tiempo coincide con la secreción de altos niveles de testosterona proveniente de los testículos en desarrollo, que permanentemente desfeminiza/masculiniza el cerebro en machos. El cerebro femenino, referido como el fenotipo sexual “por defecto” se encuentra protegido del efecto androgénico gracias a los estrógenos circulantes de origen materno (97). El establecimiento temprano de la diferenciación sexual cerebral determina el comportamiento y fisiología relacionados con cada sexo en etapas adultas. Así, una breve exposición hormonal durante el período crítico para la diferenciación sexual del cerebro, provoca cambios neuroanatómicos permanentes producto de eventos programadores. De hecho, las hormonas esteroidales han mostrado alterar el patrón de metilación del DNA y de acetilación de histonas en el cerebro en desarrollo y en la periferia, lo que sugiere que la exposición perinatal a hormonas puede organizar el sustrato neuronal a través de mecanismos epigenéticos, impartiendo un control a largo plazo sobre la expresión génica (97). En el caso de mujeres con SOP embarazadas en donde tiene lugar una exposición fetal a un exceso de andrógenos, se observa cómo los andrógenos *in utero* generan profundos cambios neuroendocrinos y metabólicos que perpetúan el fenotipo SOP sobre su descendencia tal como lo observado en modelos animales y estudios clínicos, enfocados principalmente en el componente femenino. Sin embargo, los efectos sobre la función reproductiva y metabólica de los hijos de estas pacientes han comenzado a evaluarse recientemente (97). Recabarren y colaboradores (98), han demostrado que los hijos nacidos de madres con SOP tienen profundas alteraciones en el peso, perfil lipídico, niveles de hormona AMH y sensibilidad insulínica en comparación a los hijos de madres control. Aunque no presenten alteraciones en los niveles de gonadotropinas u hormonas esteroidales en el transcurso de las distintas etapas etarias, si presentan un volumen testicular menor una vez alcanzada la adultez (99), contrario a lo observado en modelos de androgenización fetal en donde los machos androgenizados *in utero* presentan profundas alteraciones en el eje gonadal, evidenciadas por una hipersecreción de

LH, reducción significativa en el conteo de esperma, movilidad de espermatozoides y circunferencia de escroto (97).

El SOP es considerado una forma de síndrome metabólico, y en ambos casos las pacientes presentan un tono simpático aumentado, el cual participaría en la patogénesis de ambos síndromes (50). Se ha sugerido que tanto el SOP como el síndrome metabólico tienen un origen común, en donde el exceso de andrógenos maternos durante el embarazo produce alteraciones en la función metabólica y reproductiva de su descendencia (50). En primer lugar, mujeres expuestas a un exceso de andrógenos en la vida prenatal manifiestan en la adultez síntomas reproductivos tipo SOP, obesidad central e insulino resistencia. Por otro lado, monos Rhesus hembra expuestos a un exceso de andrógenos *in utero* manifiestan en la adultez una acumulación de grasa visceral predominante, reflejando un patrón androgénico de adiposidad. De igual modo, la exposición perinatal a testosterona aumenta la adiposidad en ratas hembra adultas y masculiniza la estructura y función del hipotálamo (50). Todos estos antecedentes enfocados en la comprensión del papel que desempeña el exceso de andrógenos en el desarrollo de las anomalías metabólicas presentes en mujeres con SOP, sugieren que la exposición a un exceso de andrógenos *in utero* conduce a una masculinización del metabolismo observada a nivel de tejido adiposo o a un aumento del tono simpático a este nivel, ya que el sistema nervioso simpático está involucrado en la distribución y función del tejido adiposo y es susceptible a ser programado en la vida prenatal (50). Ratones hembra androgenizados durante el período neonatal, un período correspondiente al segundo trimestre del embarazo en seres humanos en donde tiene lugar la sinaptogénesis de centros hipotalámicos que controlan la adiposidad y el desarrollo del tejido adiposo, desarrollan muchas de las características metabólicas observadas en mujeres con SOP. Estas características incluyen aumentado tono simpático, disminución del gasto energético, adiposidad visceral con adipocitos agrandados, bajos niveles de adiponectina, disminuida actividad de osteocalcina, insulino resistencia e hipertensión. Además, muestran una desregulación del tono simpático a nivel de tejido adiposo subcutáneo y grasa perigonadal (50). En ratones, la activación del eferente simpático del tejido adiposo disminuye la lipogénesis, el número de células adiposas y con ello la masa adiposa. Por su parte, el aumento en el tono simpático observado en estos modelos puede reflejar un

mecanismo adaptativo para contrarrestar la acumulación crónica de grasa, ya que las hembras androgenizadas a pesar de contar con una supresión de la lipogénesis, retienen adiposidad por combinación de diversos factores tales como hipofunción de BAT, dada por una baja expresión de la proteína termogénica UCP1, una programación del número de adipocitos y una alterada identidad fenotípica de estas células (50). En ratas hembras o mujeres control ovariectomizadas la testosterona suprime el crecimiento de pre-adipocitos, sin embargo, no suprime la acumulación adiposa en hembras androgenizadas en el período neonatal que hayan sido ovariectomizadas, de hecho, desarrollan obesidad cuando son tratadas crónicamente con testosterona. Esto sugiere que la androgenización neonatal programaría la sensibilidad del tejido adiposo a los andrógenos de una manera en que se favorezca la adiposidad durante una hiperandrogenemia. El conjunto de estos antecedentes establece las bases para el síndrome metabólico que caracteriza a las mujeres con SOP (50).

En los mamíferos la principal fuente de energía almacenada son los lípidos, los que a su vez son almacenados en el tejido adiposo como triglicéridos, los cuales a través del proceso de lipólisis son movilizados desde el tejido adiposo blanco en la forma de ácidos grasos libres y glicerol. El proceso lipolítico se encuentra regulado principalmente por aferentes simpáticos, vía receptores β 1-3 y α 2-adrenérgicos, cuyo efecto final es la activación de la lipasa sensible a hormonas (sigla en inglés HSL) (100). Estudios en tejido adiposo visceral proveniente de pacientes con SOP delgadas, muestran una aumentada lipólisis inducida por catecolaminas debido a una aumentada actividad catalítica del complejo PKA-HSL, favoreciendo la acumulación hepática de lípidos que contribuye a la insulino resistencia por alteración de la vía de señalización insulínica vía estrés oxidativo e inflamación (101), y a un estado hiperandrogénico por reducción en la producción hepática de SHBG que a su vez estimula la lipólisis en tejido adiposo (102). Por su parte, en tejido adiposo marrón, cuya abundancia es máxima al momento de nacer y es indetectable después del período postnatal, la NE media la acción de la leptina sobre la expresión de UCP1, asegurando con ello una termorregulación efectiva del feto al momento del parto, como consecuencia del aumento de la innervación simpática, densidad de receptores β -adrenérgicos y concentración plasmática de catecolaminas a este nivel (103). La sensibilidad del tejido adiposo fetal a la estimulación de factores endocrinos parece ser mayor que en el tejido adiposo adulto. De hecho, la expresión

de UCP1 está sujeta al estado nutricional de la madre y a un estricto control hormonal, en donde la insulina ejerce una acción negativa sobre la expresión de esta proteína mitocondrial (103). Así, la programación de la función mitocondrial placentaria/fetal que tendría lugar en la gestante SOP producto de la hiperinsulinemia, podría ser uno de los tantos eventos moleculares asociados a alteraciones metabólicas en su descendencia. De hecho, pacientes con SOP y diabetes tipo 2 muestran una biogénesis y actividad mitocondrial disminuida a nivel muscular con una disminuida expresión de la isoforma UCP3, que es corregida por el tratamiento con sensibilizadores de la insulina. Alteraciones similares se observan en la descendencia de estos pacientes, sugiriendo que el componente familiar ejerce un importante papel sobre la homeostasis mitocondrial y se relaciona con insulino resistencia (104).

1.6. Placenta

En humanos, la placenta comienza su desarrollo alrededor del día 6-7 posterior a la fecundación, durante la ventana de implantación del blastocito. El blastocito se rodea de una pared exterior de células (trofoblasto) y en su interior posee un pequeño grupo de células grandes (citotrofoblasto) de las cuales derivan el embrión, el cordón umbilical y el epitelio amniótico. En el día 8-9 posterior a la fecundación, las células trofoblásticas se fusionan formando una bicapa que da lugar al sinciciotrofoblasto, la unidad funcional placentaria (105).

Los anexos fetales están compuestos por la placenta, las membranas fetales y el cordón umbilical (105). La placenta de término tiene forma discoide, con un diámetro de 15-20 cm y un espesor de 2-3 cm; es del tipo hemocorial, lo que significa que el tejido trofoblástico derivado del feto está en contacto directo con la sangre materna (106,107). Desde los márgenes del disco coriónico se extienden las membranas fetales, el amnios y el corión, los cuales encierran al feto dentro de la cavidad amniótica y la decidua endometrial (105). La placa coriónica es una estructura de múltiples capas que se enfrenta a la cavidad amniótica. Consta de dos estructuras diferentes: la membrana amniótica y el corión. Las vellosidades se originan desde la placa coriónica y anclan la placenta a través del trofoblasto de la placa basal y el endometrio materno. Desde el lado materno, protuberancias de la placa basal dentro de las vellosidades coriónicas dan lugar al septo placentario, que dividen el parénquima en

cotiledones irregulares (105). La placenta es un órgano fetal complejo que desempeña funciones endocrinas, de pulmón, intestino y riñón fetal (106). La figura 1 es un esquema representativo de la estructura de la placenta humana y la figura 2 muestra un diagrama esquemático de la placenta humana de término.

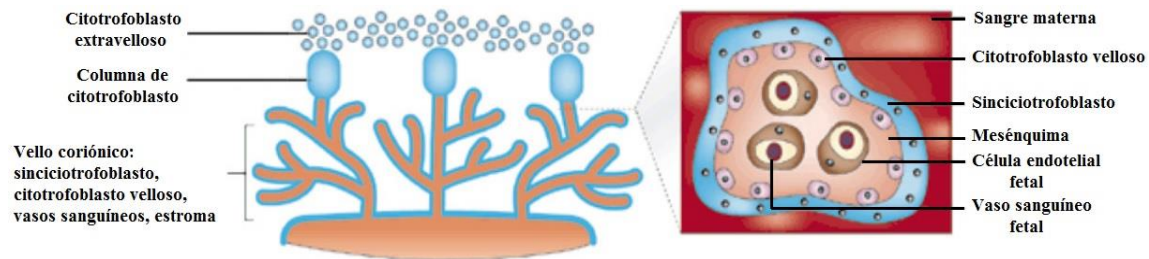


Figura 1. **Estructura de la placenta humana.** La imagen del recuadro muestra la sección transversal de un vello coriónico, estructuras derivadas del trofoblasto (azul) y tejidos derivados del mesodermo (naranja). Las imágenes del recuadro ilustran el número y tipo de capas celulares entre la sangre materna y fetal. Adaptado de Dilworth M.R. and Sibley C.P. *Placenta* 27: S34-S39, 2013.

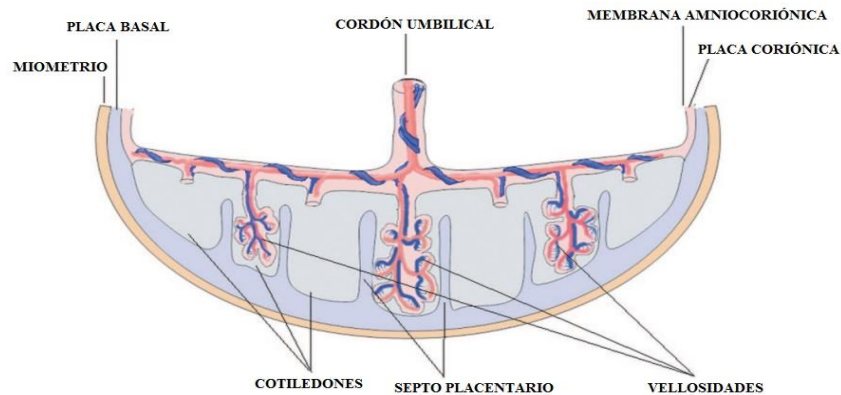


Figura 2. **Placenta humana de término.** Durante la formación de la placenta, desde el lado materno, protuberancias de la placa basal dentro de las vellosidades coriónicas dan lugar al septo placentario, que divide el parénquima en cotiledones irregulares. Cada cotiledón contiene algunas vellosidades, que se originan desde la placa coriónica. Los vasos sanguíneos fetales están localizados dentro de las ramificaciones de las vellosidades. Adaptado de Parolini O., et al. *Stem Cells* 26: 300–311, 2008.

1.6.1. Mecanismos de transporte placentario

Todos los solutos presentes en la circulación materna y fetal serán capaces de difundir a través de la placenta. La tasa de difusión dependerá de las características de la molécula en cuestión, del gradiente de concentración entre la sangre materna y fetal y del área superficial y grosor de la placenta en sí misma (108). En términos de la transferencia materno-fetal, las primeras membranas de intercambio son la membrana plasmática microvellosa (cara materna) y la membrana plasmática basal (cara fetal), presentes en la única capa de sinciotrofoblasto. El siguiente componente de barrera es el endotelio capilar fetal, que consta de amplios espacios intercelulares por donde las moléculas con un peso molecular menor a 1500 difundirán rápidamente (106,109). El tamaño molecular y la lipofilicidad de moléculas individuales tendrán un efecto importante en la velocidad de difusión (106,110). Moléculas pequeñas y lipofílicas cruzarán rápidamente la placenta y alcanzarán en poco tiempo el equilibrio en las circulaciones de ambos lados de la barrera. Por lo que la tasa de difusión dependerá grandemente del flujo sanguíneo en las circulaciones uterina y umbilical (106,110). Por el contrario, moléculas hidrofílicas no atraviesan la membrana plasmática debido a su pobre solubilidad lipídica. La difusión de estas moléculas es lenta y no depende de manera importante del flujo sanguíneo, sino más bien de las características físicas de la barrera de intercambio (108). El transporte transcelular de sustancias hidrofílicas desde la madre al feto dependerá de la presencia de canales/transportadores presentes en la membrana plasmática placentaria y de su número, afinidad y actividad. Esto incluye transportadores de difusión facilitada tales como la familia de transportadores de glucosa GLUT (111), transportadores activos y canales asociados con el transporte de calcio (112) y cotransportadores, transporte facilitado y transportadores que median la transferencia de aminoácidos (110,113). La figura 3 muestra de manera resumida los mecanismos de transporte placentario que tienen lugar en el sinciotrofoblasto.

1.6.2. Actividad nerviosa simpática placentaria

La placenta, aunque carece de inervación, es un tejido que posee receptores adrenérgicos (114,115) y transportadores para monoaminas como Serotonina y Norepinefrina (NE) (116,117). Este órgano fetal cuenta con toda la maquinaria para la síntesis, metabolismo y transporte de monoaminas como Dopamina, Serotonina, NE y Epinefrina (117). El

metabolismo y transporte placentario de monoaminas tiene por función mantener una homeostasis catecolaminérgica entre madre y feto (118). Aunque las catecolaminas son importantes durante la vida fetal (119,120), sus niveles circulantes son bajos en el feto, a pesar del alto tono simpático que posee, necesario para mantener la homeostasis cardiovascular (120). Estudios en fetos de ovejas muestran que el sistema simpático-adrenal fetal se caracteriza por una alta producción de catecolaminas y un alta tasa de depuración por parte de la placenta a través del transportador de Norepinefrina (NET) (120,121).

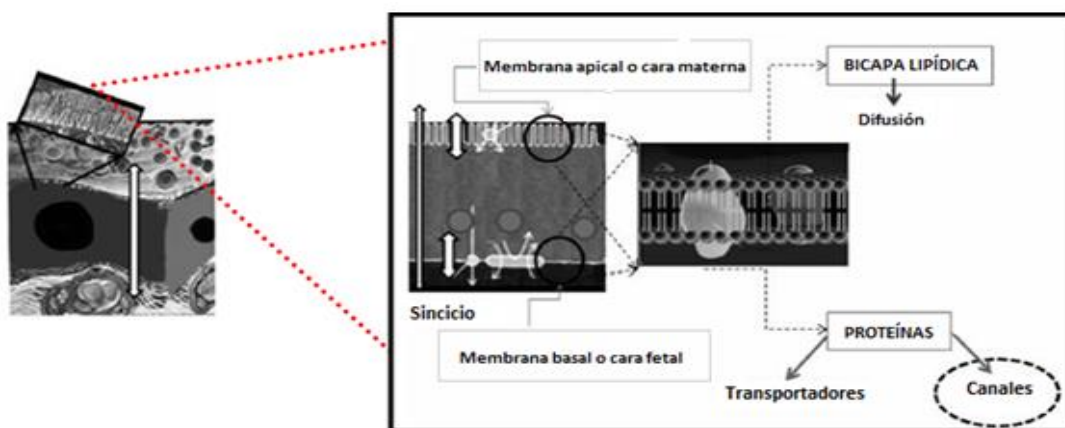


Figura 3. **Sinciotrofoblasto.** Unidad funcional placentaria que mantiene la homeostasis fetal. Todos los intercambios placentarios ocurren vectorialmente gracias a su naturaleza polarizada, controlando el flujo de solutos en una dirección definida. Adaptado de Riquelme G. *Placenta* 25: S196-S202, 2011.

Las monoaminas son potentes mediadores de eventos fisiológicos y patofisiológicos en todo el organismo, por lo que su concentración extracelular se encuentra altamente regulada (117). A diferencia de otros transmisores, las monoaminas son mayormente recicladas, más que inactivadas metabólicamente. Es por ello, que proteínas transportadoras específicas localizadas tanto en la membrana plasmática como en la membrana de vesículas de almacenamiento, se encargan de recaptar estas monoaminas desde los fluidos extracelulares hacia el interior celular (117). En la placenta existen 2 sistemas transportadores de monoaminas el uptake 1 (NET), dependiente de Na^+ y Cl^- , y el uptake 2 (OCT3), independiente de Na^+ . El uptake 2 se expresa principalmente en placenta y se localiza

probablemente en la cara fetal placentaria, suposición basada en la evidencia funcional que indica la presencia de un mecanismo de depuración de NE de la circulación fetal presente en la membrana basal, independiente de Na⁺ (116). Por su parte NET se expresa tanto en sistema nervioso central como periférico (122,123). Es una glicoproteína, que en humanos presenta dos isoformas cuyos pesos moleculares son 80 y 55 kDa, siendo la isoforma de 80 kDa la glicoproteína madura y la de 55 kDa un intermediario en el proceso de maduración de NET (124,125). NET está sujeto a varios mecanismos de regulación de su tráfico celular (122,123,126,127) y su función es regulada por diversos estímulos tales como drogas de abuso (122,128) e insulina (129,130). En la placenta humana, NET presenta una escasa expresión en el sincitiotrofoblasto que recubre las vellosidades coriónicas, por el contrario, en trofoblastos de los vellos de anclaje, presentes en la cara materna de la placenta, la expresión de NET es elevada (116,120,128). La expresión de NET puede variar en condiciones fisiopatológicas, tales como enfermedades gestacionales, en donde el mRNA del transportador NET se encuentra disminuido y en consecuencia aumentan los niveles de NE en la circulación fetal (117,120). Estudios realizados en placentas de mujeres normotensas y con preeclampsia muestran que la expresión de NET se encuentra disminuida en placentas de mujeres con preeclampsia, sugiriendo que NET podría ser un mecanismo protector fetal que mantiene la homeostasis circulatoria (117,125). Otro estudio realizado en ovejas preñadas mostró que una reducida capacidad de recaptación de NE conduce a un aumento en la presión sanguínea de madre y feto (131). En placenta humana, estudios revelaron la existencia de ciertos polimorfismos de NET que hacen más o menos eficiente su expresión y función en la placenta (132), lo que podría tener repercusiones sobre el desarrollo placentario y fetal. Otras enfermedades gestacionales en las cuales el sistema nervioso simpático fetal y materno tendría una participación importante, incluyen la insuficiencia placentaria e IUGR (133,134). Modelos de insuficiencia placentaria revelan una creciente hipoglicemia e hipoxemia fetal y en respuesta a ello aumentan los niveles de NE en el plasma fetal. En estos modelos los fetos son hipoxémicos e hipercatecolaminémicos, similar a lo observado en fetos humanos con IUGR (135-138). La médula adrenal fetal responde a la hipoglicemia e hipoxemia secretando catecolaminas, predominantemente NE (139-141). Ésta suprime la secreción de insulina desde las células β del páncreas vía receptores α 2-adrenérgicos (142,143). La exposición crónica a altos niveles de NE también estaría participando en la

supresión del crecimiento fetal junto con la desensibilización adrenérgica en músculo y tejido adiposo vía receptores β_2 adrenérgicos (141,144,145), además de respuestas adaptativas en el metabolismo, crecimiento y función de las células β pancreáticas en el feto (144,145).

1.6.3. Efectos de la insulina a nivel placentario

La insulina es una hormona polipeptídica de 51 aminoácidos, sintetizada y secretada por las células β pancreáticas como un polipéptido inactivo, pre-proinsulina, que tras diversas modificaciones proteolíticas se convierte en insulina como consecuencia del aumento en los niveles sanguíneos de D-glucosa (146,147). La insulina es la hormona del crecimiento arquetípica durante el desarrollo fetal, promoviendo el depósito de carbohidratos, lípidos y proteínas en los tejidos junto con la captación de D-glucosa, principal fuente de energía en el feto, cuyo metabolismo responde a la insulina fetal desde la doceava semana de gestación (107). La insulina es uno de los reguladores claves del metabolismo y se han documentado significativos cambios en la sensibilidad de insulina y su capacidad para controlar los niveles de glucosa, grasa y proteínas durante el embarazo (148). La insulino resistencia materna juega un importante rol en la regulación del metabolismo energético materno, acumulación de grasa y crecimiento fetal (149,150). Sin embargo, en condiciones de diabetes gestacional que pueden estar presentes en mujeres SOP (1,79), la creciente insulino resistencia puede conducir a niveles anormales de glucosa en sangre y macrosomía fetal, aumentando la probabilidad de complicaciones obstétricas y en algunos casos, puede aumentar el riesgo de muerte fetal. La insulino resistencia durante el embarazo se ha atribuido a alteraciones en mediadores celulares tales como el cortisol, hormonas derivadas de la placenta como lactógeno placentario humano (sigla en inglés HPL), progesterona y estrógenos (151), TNF α (152) y leptina (153) y elevados niveles plasmáticos de pancreatina y catecolaminas (154).

En placenta humana se ha descrito un clon de cDNA de 5 kb que contiene las secuencias que codifican para el receptor de insulina, cuya estructura general es una reminiscencia del receptor de EGF (155). Existen dos isoformas del receptor de insulina (RI): RI-A y RI-B, las cuales podrían tener una respuesta diferencial a insulina por activación selectiva (156,157). Ambas isoformas se expresan en tejidos sensibles a insulina (158), sin embargo, RI-A se expresa predominantemente en feto y placenta, en donde participa en el desarrollo

embrionario (159). La isoforma B del receptor de insulina se expresa principalmente en tejido adulto y se le asocia con los efectos metabólicos de la insulina (160). Aunque el receptor de insulina se encuentra expresado en la vasculatura placentaria (161), se dispone de limitada información en cuanto a la acción biológica de los receptores de insulina y los efectos vasculares de esta hormona en la circulación placentaria, en condiciones de diabetes gestacional (156). Sin embargo, esta enfermedad conduce a anormalidades en el transporte transplacentario debido a la pérdida en el equilibrio hormonal inducida por cambios en la síntesis y señalización de insulina (162). Estudios *in vitro* en células hPMEC provenientes de mujeres con diabetes gestacional, mostraron que estas células exhiben un fenotipo predominantemente metabólico comparado con células provenientes de mujeres con embarazos normales (157); y otros estudios en pacientes con diabetes *mellitus* muestran que la disminución en la respuesta a insulina se debe a la predominancia de la isoforma RI-A (163), por lo que una modulación en la expresión de las isoformas del RI podría tener consecuencias sobre el metabolismo de las células endoteliales placentarias en condiciones de diabetes gestacional (157). En células endoteliales de vena umbilical, la insulina activa la vía de señalización L-arginina/NO (164). Alteraciones en esta vía, observadas en condiciones de diabetes gestacional, conducen a una disfunción endotelial placentaria (156). Estos efectos también podrían ser modulados por la activación de receptores de adenosina (165). Sin embargo, no se cuenta con evidencia que indique los mecanismos potenciales asociados con esta respuesta específica de insulina a nivel placentario (156,162).

Considerando la evidencia establecida en la literatura. ¿Existirán alteraciones placentarias asociadas principalmente a los desórdenes simpáticos y metabólicos presentes en mujeres con SOP? Y ¿Estas alteraciones podrían ser revertidas empleando herramientas farmacológicas como la metformina durante el embarazo? El conjunto de antecedentes mencionados junto a estas interrogantes, nos llevaron a postular la siguiente hipótesis:

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Las mujeres con SOP presentan elevados niveles plasmáticos de NE durante el embarazo los que se relacionan con disminuidos niveles de NET a nivel placentario. Estas alteraciones pueden ser corregidas al tratar a estas pacientes con metformina durante todo el embarazo.

2.2. Objetivo general

Evaluar los niveles de NE en plasma de mujeres con SOP embarazadas con y sin tratamiento farmacológico. En placenta de término de estas pacientes, determinar los niveles de proteína NET junto con evaluar el efecto del tratamiento con metformina sobre componentes de la señalización insulínica y NET.

2.3. Objetivos específicos

2.3.1. Evaluar los niveles de NE en suero de mujeres con SOP embarazadas con y sin tratamiento farmacológico.

En pacientes con SOP existe una alta prevalencia de insulino resistencia, obesidad central y apnea obstructiva del sueño, los cuales se relacionan con una actividad simpática aumentada (6). Por lo que de acuerdo a estos antecedentes, se determinaron los niveles plasmáticos de NE en los grupos experimentales definidos en este trabajo mediante cromatografía líquida de alta resolución (sigla en inglés HPLC), ya que el desarrollo de detectores sensibles ha permitido el uso del HPLC para la determinación de catecolaminas en extractos de plasma, orina y en muestras de tejido (166). La actividad simpatoadrenal es a menudo evaluada al medir los niveles de catecolaminas en diversos fluidos corporales, convirtiéndolos en marcadores útiles de dicha actividad (166).

2.3.2. Determinar los niveles de proteína NET en placenta de término de mujeres con SOP embarazadas con y sin tratamiento farmacológico. Evaluar el efecto del tratamiento con metformina sobre componentes de la señalización insulínica placentaria y NET.

La expresión de NET puede verse alterada en condiciones fisiopatológicas. En humanos existe evidencia de que el mRNA de NET se encuentra disminuido en algunas enfermedades gestacionales como preeclampsia, observándose altos niveles de NE en la circulación fetal (117,120,125). Aunque las mujeres con SOP presentan una alta prevalencia de desarrollar preeclampsia e hipertensión durante el embarazo (1), no existe evidencia que vincule alteraciones en los niveles de mRNA/proteína NET y enfermedades gestacionales en el SOP.

Modelos de condición quística en ratas, dan cuenta de una correlación entre la insulino resistencia y un aumento en la actividad simpática ovárica (167). Otros estudios en animales han mostrado que inyecciones intracerebroventriculares de insulina, incrementan la activación simpática (6). En humanos, estudios de microneurografía y clamp hiperinsulinémico muestran a la insulina como una importante señal para la activación simpática (168,169). Por lo que, basados en esta evidencia, evaluamos si el tratamiento farmacológico con metformina es capaz de revertir las alteraciones metabólicas y simpáticas a nivel placentario, al estudiar componentes de la señalización de insulina y los niveles proteicos de NET mediante western blot.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Sujetos

Se empleó un diseño de estudio caso-control. Se estudiaron 16 mujeres SOP embarazadas, obteniendo muestras de tejido placentario y sangre materna. Como grupo control, se incluyeron 8 mujeres embarazadas con ciclos menstruales regulares y sin hiperandrogenismo.

Estas pacientes fueron parte de otros 2 estudios, el primero de ellos caracterizó el metabolismo de esteroides en el tejido placentario (84) y el segundo estudio determinó el efecto del tratamiento con metformina en estas pacientes y en sus hijas (81).

Todas las mujeres con SOP embarazadas fueron reclutadas en el Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo de la Sede Occidente de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, quienes habían deseado embarazarse. El diagnóstico de SOP fue hecho de acuerdo al criterio diagnóstico para SOP del Instituto Nacional de Salud (sigla en inglés NIH) de Estados Unidos y el Consenso de Rotterdam de la Sociedad Europea para Reproducción Humana y Embriología/Sociedad Americana de Medicina Reproductiva (170). Todas las pacientes reunieron los criterios NIH y Rotterdam (fenotipo A) para SOP. Todas las mujeres con SOP fueron evaluadas antes del embarazo, y todas ellas presentaron oligomenorrea crónica o amenorrea, hirsutismo (escala Ferriman-Gallwey $R \geq 8$), concentraciones séricas de testosterona > 0.8 ng/mL y/o índice de andrógenos libres (sigla en inglés FAI) > 5.0 , y concentraciones de androstenediona > 3.0 ng/mL. Adicionalmente, todas las mujeres con SOP mostraron la morfología ovárica característica al ultrasonido, basados en el criterio descrito por Adams et al. (171). Las madres SOP fueron normoglicémicas antes del embarazo, con diferentes grados de hiperinsulinemia evaluados mediante un Test de Tolerancia a la Glucosa oral. Todas las pacientes presentaron una relación cintura-cadera (sigla en inglés WHR) > 0.85 . Todas las mujeres se encontraban en una condición de anovulación según lo indicado por las mediciones de progesterona y los exámenes de ultrasonido. Se excluyeron a las pacientes con hiperprolactinemia, tumor secretor de andrógenos, Síndrome de Cushing, deficiencia de 21-hidroxilasa o enfermedad

tiroidea. Como parte de la evaluación inicial, todas las pacientes fueron sometidas a una evaluación de estilo de vida y posteriormente insertadas en un programa de tratamiento con dieta y ejercicio como se ha descrito previamente (172). Por otro lado, todas ellas recibieron metformina en dosis de 1,500–2,000 mg, cuya formulación estándar se basó en el peso, tolerancia a la medicación y niveles de insulina. Todas las mujeres SOP fueron instruidas para continuar con el programa de dieta y ejercicio durante el embarazo, que se ajustó según los requisitos de cada embarazo. Las muestras fueron obtenidas durante dos períodos: 1. Desde marzo del año 2002 hasta marzo del año 2005 fue reclutado la primera cohorte de pacientes con SOP. A estas pacientes se les dio instrucciones de detener el tratamiento con metformina hasta un test de embarazo positivo (SOP). 2. Desde marzo del año 2006 hasta marzo del año 2009 fue reclutado el Segundo cohorte de pacientes, quienes continuaron con la medicación, en la misma dosis antes señalada, durante todo el embarazo (SOPM). No se emplearon medicamentos inductores de la ovulación, tales como citrato de clomifeno o gonadotrofinas exógenas.

Como grupo sano de comparación (Control), se seleccionaron mujeres embarazadas de la misma edad y nivel socioeconómico que las mujeres SOP. Estas mujeres embarazadas tenían antecedentes de ciclos menstruales regulares de 28 a 32 días, ausencia de hirsutismo u otras manifestaciones clínicas de hiperandrogenismo, infertilidad, complicaciones del embarazo, galactorrea y disfunción tiroidea. Todas eran sanas y no recibían ningún tipo de medicamento. Estas mujeres fueron reclutadas desde la Unidad de Atención Prenatal del Hospital San Juan de Dios a las 12 semanas de gestación; por tanto, los perfiles hormonales anteriores al embarazo no están disponibles para este grupo. Sólo se incluyeron en nuestro estudio mujeres no fumadoras, no bebedoras de alcohol y que no abusaran de drogas. Cada una de las madres nos proporcionó su consentimiento escrito para la participación en este estudio. El protocolo fue aprobado por las Juntas de Revisión Institucional del Hospital San Juan de Dios y de la Universidad de Chile.

Fueron excluidas del estudio aquellas mujeres que fueran diagnosticadas durante el embarazo con preeclampsia, hipertensión del embarazo, diabetes gestacional y/o parto prematuro. Por

otro lado, pacientes con enfermedades crónicas severas como hipertensión o enfermedad renal fueron igualmente excluidas del estudio.

3.2. Muestras

3.2.1. Muestras de sangre

En todos los grupos experimentales, las muestras de sangre fueron obtenidas en las semanas 24 y 35 de embarazo. En la semana 24 se obtuvieron muestras de 16 pacientes control, 8 pacientes SOP y 8 pacientes SOPM. En la semana 35 las muestras obtenidas de cada grupo fueron 8. La sangre fue recolectada en una solución de EDTA para eliminar la coagulación. Las muestras así colectadas fueron inmediatamente centrifugadas y el plasma fue congelado a -80°C hasta los análisis de NE.

3.2.2. Muestras de placenta

Las placentas de término (37-40 semanas de gestación), fueron recolectadas inmediatamente después del parto o cesárea. Las muestras de placenta fueron rápidamente procesadas de acuerdo a lo descrito por Wyatt et al. (84,173). Brevemente, cada placenta fue seccionada transversalmente empleando un bisturí estéril, cerca del sitio de inserción del cordón umbilical (aproximadamente 5 cm), dividido en 3 segmentos horizontales desde la superficie coriónica hacia la placa basal y codificados como S1: cercano a la placa coriónica (cara fetal); S2: zona entre la placa coriónica y la placa basal (zona intermedia); y S3: cercano a la placa basal (cara materna).

En placenta humana, NET presenta una escasa expresión en los sincitiotrofoblastos que recubren las vellosidades coriónicas, por el contrario, en trofoblastos de los vellos de anclaje, presentes en la cara materna de la placenta, la expresión de NET es elevada (117,120,174). De acuerdo a los antecedentes descritos, en nuestro trabajo empleamos S1 y S3 para ver si existen diferencias en el patrón de expresión de NET entre los grupos experimentales.

3.3. Determinación de NE en plasma por HPLC

Las muestras de plasma (200µl) de mujeres SOP y Control fueron primeramente concentradas en alumina activada y cuantificadas por HPLC (Waters 464) con detección electroquímica, empleando dihidroxibencilamina (200 pg) como estándar interno. Un total de 20 µl de cada muestra fue inyectado en el HPLC. La fase móvil estuvo compuesta por NaH₂PO₄ 0,1 M, octil sulfato de sodio 0,42 mM, EDTA 1 mM y acetonitrilo 1%, el pH fue ajustado a 2.6. El flujo se mantuvo constante a 1ml/min, durante toda la determinación. El potencial del detector amperométrico fue de 0.650 V. Las muestras fueron analizadas por la comparación del área de los picos obtenidos, además del tiempo de retención, con valores estándar de referencia, siguiendo protocolos previamente publicados (167,175). El coeficiente de variación inter e intra ensayo fue de 7% y 4%, respectivamente.

3.4. Determinación de los niveles de NET y evaluación de la señalización insulínica en placenta de término

3.4.1. Pre-absorción con péptido de bloqueo para anticuerpo anti-NET

En algunas ocasiones puede ocurrir que un anticuerpo una de manera no específica a una proteína que no sea su antígeno, especialmente si el anticuerpo es policlonal (176). Por lo que la preabsorción con péptido de bloqueo se emplea para verificar la especificidad del anticuerpo primario (177,178). Para determinar la especificidad de anti-NET empleamos un péptido comercial (Santa Cruz Biotechnology, sc-51157 P) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, a 4 µg de anti-NET se añadió un exceso de péptido de bloqueo (10 veces el peso) en buffer PBS 1x, diluyendo anti-NET hasta 1:1000 (dilución de trabajo de anti-NET). Se incubó la mezcla por 2 horas a temperatura ambiente y luego se diluyó la mezcla en buffer de bloqueo TBST 0,3% (20 mM Tris, 137 mM NaCl, y 0,3% Tween-20, pH 7,6 conteniendo 5% de BSA) y luego se aplicó sobre una membrana de nitrocelulosa en la cual ya se habían transferido proteínas. Posteriormente se lavó la membrana 5 veces por 5 minutos con buffer TBST 0,1% (sin BSA) y se incubó con el anticuerpo secundario horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-goat (1:10.000, Abcam, ab97120) por 45 minutos. Después de 5 lavados (5 minutos cada vez) con TBST 0,1%, las bandas fueron

detectadas empleando un kit quimioluminiscente (EZ-ECL Kit, Biological Industries). Paralelamente se efectuó un *immunoblot* para anti-NET sin péptido de bloqueo para comparar posteriormente ambos *blots* y determinar la magnitud de la inhibición. Se acepta una inhibición superior al 50% como prueba de especificidad.

3.4.2. Cuantificación de los niveles de la proteína NET mediante western blot

Los extractos proteicos de la cara materna y fetal de la placenta fueron obtenidos de acuerdo al siguiente protocolo. En un tubo eppendorf de 1,5 mL se pesaron 70 mg de tejido pulverizado en hielo seco y se añadieron 150 μ L de un buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 50 mM, EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, and Tritón-x100 1%; pH 7.4) suplementado con un cocktail de inhibidores de proteasa (Sigma, St. Louis, MO), PMSF 35 mM y DTT 0.4 mM. Las muestras se agitaron en un vórtex (Heidolph Reax 2000) y luego se sonicaron por 10 minutos en un sonicador (Power Sonic 405), para eliminar el exceso de metal proveniente del papel de aluminio que recubría a las muestras. Se volvió a agitar en vórtex y luego el extracto proteico libre de *debris* celular fue obtenido por centrifugación del homogenizado a 13.500 x g por 20 minutos a 4°C. La concentración de proteínas del extracto fue determinado empleando el método de Lowry (179). Las proteínas de cada muestra (30 μ g) fueron resueltas a través de geles SDS-poliacrilamida al 8% y 10%. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa por *electroblotting*. Las membranas fueron bloqueadas por 1 hora a temperatura ambiente, con TBST (20 mM Tris, 137 mM NaCl, y 0.1% Tween-20, pH 7.6) conteniendo BSA o leche al 5%. Posterior al bloqueo con una solución de BSA o leche al 5%, las membranas fueron incubadas con los siguientes anticuerpos primarios: Goat anti-NET (1:500, Santa Cruz Biotechnology, sc-51157) y Rabbit anti-GAPDH (1:40.000, Sigma, G9545) a temperatura ambiente por 1 hora, seguido de una incubación de 45 minutos con horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-goat (1:10.000, Abcam, ab97120) y Goat anti-rabbit (1:10.000, Abcam, ab97200), como anticuerpo secundario. Después de 5 lavados (5 minutos cada vez) con TBST 0,1%, las bandas fueron detectadas empleando un kit quimioluminiscente (EZ-ECL Kit, Biological Industries). Los experimentos fueron repetidos al menos 2 veces.

3.4.3. Evaluación de la señalización de insulina mediante western blot

Para la obtención de los extractos proteicos purificados, se procedió de igual modo que en la sección 3.4.2. Posterior a la transferencia de proteínas por *immunoblotting*, las membranas fueron incubadas con los siguientes anticuerpos primarios: Mouse anti-IRS1 (1:1000, Millipore, 05-1085) y Rabbit anti-GLUT4 (1:500, Millipore, 07-1404), toda la noche a 4°C en TBST, seguido por una incubación de 45 minutos con horseradish peroxidase-conjugated Goat anti-mouse (1:1000, Thermo Scientific, 31430) y Goat anti-rabbit (1:5000, Abcam, ab97200), como anticuerpos secundarios. Después de 5 lavados (5 minutos cada vez) con TBST 0,1%, las bandas fueron detectadas empleando un kit quimioluminiscente (EZ-ECL Kit, Biological Industries). Los experimentos fueron repetidos al menos 2 veces.

3.5. Análisis estadístico

Los resultados son expresados como la media \pm SEM. Pada determinar la normalidad de los datos obtenidos se empleó el test de normalidad Shapiro-Wilk. Las comparaciones entre grupos fueron hechas con un ANOVA/T test de una vía para aquellos datos distribuidos normalmente o un test Kruskal-Wallis/Mann-Whitney para aquellos datos cuya distribución no fue normal. Se empleó un post test Tukey a los datos distribuidos normalmente o Dunn's para aquellos no distribuidos normalmente. Las variables categóricas fueron comparadas empleando el test χ^2 . El tamaño de la muestra fue calculado asumiendo una diferencia entre el grupo control y el grupo SOP de 30 unidades arbitrarias de expresión de NET, con un error tipo I de 0,05 y una potencia del 80%. El número de muestras requeridas fue de 8 por grupo.

4. RESULTADOS

4.1. Objetivo específico 1

Evaluar los niveles de NE en suero de mujeres con SOP embarazadas con y sin tratamiento farmacológico.

Antes de evaluar los niveles plasmáticos de NE en todos los grupos experimentales, comenzamos por definir las características clínicas de las pacientes y de sus recién nacidos, detallados en la tabla 1.

4.1.1. Características clínicas de las pacientes

La tabla 1 muestra las características clínicas de las embarazadas en los 3 grupos experimentales y de sus recién nacidos. De la tabla se observa que no hay diferencias significativas entre los grupos en cuanto a edad, peso e IMC inicial/final y la ganancia de peso durante el embarazo. Por otro lado, los porcentajes de cesáreas fueron comparables entre grupos (Control: 32,3 % (5/16); SOP: 25 % (2/8); SOPM: 37,5 % (3/8), $p = 0,864$). En conjunto, 56,5%, 62,5% y 75% de las mujeres en los grupos control, SOP y SOPM ($p = 0,670$), respectivamente, fueron primíparas.

Los recién nacidos de los 3 grupos de mujeres embarazadas fueron comparables en cuanto a edad gestacional, peso y tamaño. La proporción de fetos femeninos fue comparable entre grupos ($p = 0,956$).

	Control (N = 8)	SOP (N = 8)	SOPM (N = 8)
Madres			
Edad (años)	30.57 ± 1.87	32.88 ± 1.87	27.34 ± 2.63
Estatura (m)	1.58 ± 0.02	1.62 ± 0.02	1.60 ± 0.01
Peso inicial (Kg)	63.14 ± 1.80	66.58 ± 3.91	75.75 ± 5.46
IMC inicial (Kg/m²)	25.36 ± 0.43	25.30 ± 1.29	29.67 ± 2.05
Peso final (Kg)	77.00 ± 3.48	75.56 ± 3.23	83.21 ± 5.44
IMC final (Kg/m²)	30.88 ± 0.98	28.74 ± 1.05	32.64 ± 2.12
Peso ganado	13.86 ± 1.94	8.97 ± 1.66	9.15 ± 1.38
Recién nacidos			
Edad gestacional (semanas)	38.63 ± 0.32	38.87 ± 0.48	38.88 ± 0.35
Peso (Kg)	3.44 ± 0.09	3.49 ± 0.09	3.32 ± 0.10
Tamaño (cm)	48.81 ± 0.35	48.68 ± 0.38	50.50 ± 0.66

Tabla 1. **Características clínicas de las embarazadas y de sus recién nacidos.** La tabla muestra las características clínicas de mujeres embarazadas control (n=16), comparadas con mujeres SOP embarazadas (n=8) y SOPM (n=8), junto con las características clínicas de sus recién nacidos. Los resultados corresponden a la media ± SEM. Las diferencias no son significativas entre los grupos experimentales. SOP: mujeres embarazadas con Síndrome de Ovario Poliquístico sin tratamiento con metformina durante el embarazo; SOPM: mujeres embarazadas con Síndrome de Ovario Poliquístico en tratamiento con metformina durante el embarazo.

4.1.2. Determinación de los niveles plasmáticos de NE

La gráfica de la figura 4 muestra los cambios en la concentración plasmática de NE que fueron medidos a las semanas 24 y 35 de gestación, mediante HPLC con detección electroquímica. A las 24 semanas de embarazo, la concentración plasmática de NE fue significativamente mayor en el grupo SOP ($9,502 \pm 2,033$ ng/mL) en comparación al grupo control ($3,571 \pm 0,3929$ ng/mL, $p < 0,001$) y SOPM ($4,226 \pm 0,5688$ ng/mL, $p < 0,006$). En las pacientes SOPM se observaron niveles plasmáticos de NE similares al grupo control. Finalmente, no se observaron diferencias significativas entre grupos a las 35 semanas de

gestación (Control: $3,667 \pm 0,4845$ ng/mL; SOP: $4,968 \pm 0,9735$ ng/mL; SOPM: $3,045 \pm 0,3079$ ng/mL).

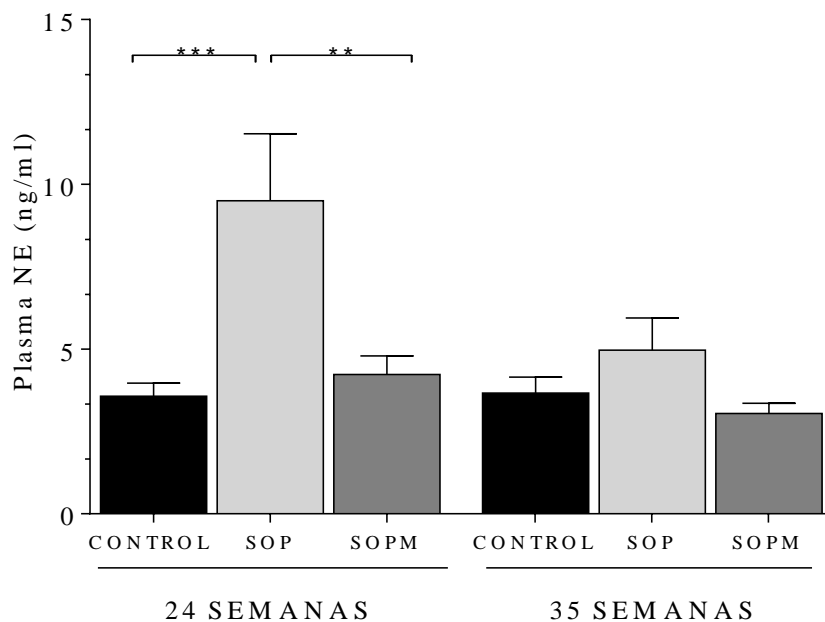


Figura 4. **Niveles plasmáticos de NE a las 24 y 35 semanas de gestación.** Cada barra representa los niveles plasmáticos de NE para el grupo Control (n=16 a las 24 semanas y n=8 a las 35 semanas), comparadas con el grupo SOP (n=8 a las 24 y 35 semanas) y SOPM (n=8 a las 24 y 35 semanas), expresados como la media \pm SEM. *** = $p < 0,001$ grupo control *versus* SOP a las 24 semanas de gestación; ** = $p < 0,01$ grupo SOP *versus* SOPM a las 24 semanas de gestación. A las 35 semanas no se observan diferencias significativas entre grupos. NE: Norepinefrina; SOP: mujeres embarazadas con Síndrome de Ovario Poliquístico sin tratamiento con metformina durante el embarazo; SOPM: mujeres embarazadas con Síndrome de Ovario Poliquístico en tratamiento con metformina durante el embarazo.

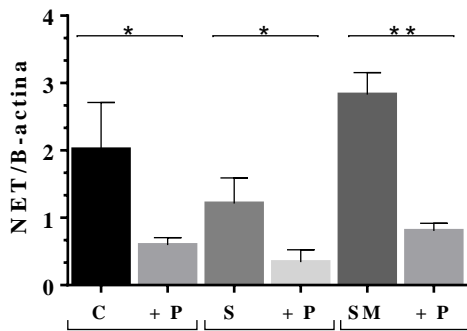
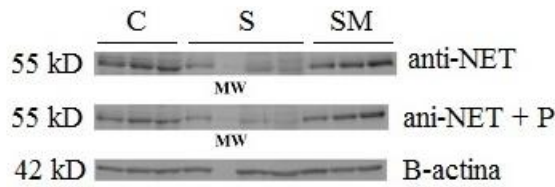
4.2. Objetivo específico 2

Determinar los niveles de proteína NET en placenta de término de mujeres con SOP embarazadas con y sin tratamiento farmacológico. Evaluar el efecto del tratamiento con metformina sobre componentes de la señalización insulínica placentaria y NET.

4.2.1. Estudio de pre-absorción con péptido de bloqueo para anticuerpo anti-NET

La gráfica de la figura 5 muestra la especificidad de la marca del anticuerpo anti-NET en la cara fetal y materna placentaria para cada grupo experimental, determinada mediante western blot. El panel superior muestra un gel representativo de las bandas correspondientes a la marca de anti-NET con y sin péptido de bloqueo a los 55 kD, junto al control de carga β -actina (42 kD). El panel inferior da cuenta de la densitometría de las bandas de anti-NET y su péptido de bloqueo, normalizadas por el control de carga β -actina. En la cara fetal se observa que para todos los casos la disminución en la marca de anti-NET fue superior al 50%, tras incubar las membranas con péptido de bloqueo (Control: $2,014 \pm 0,4029$ versus Control + Péptido: $0,5935 \pm 0,06453$; SOP: $1,213 \pm 0,2194$ versus SOP + Péptido: $0,3412 \pm 0,1062$; SOPM: $2,828 \pm 0,1894$ versus SOPM + Péptido: $0,8048 \pm 0,06639$). En la cara materna placentaria se observa un resultado similar (Control: $1,947 \pm 0,1644$ versus Control + Péptido: $0,3858 \pm 0,02809$; SOP: $0,6714 \pm 0,1323$ versus SOP + Péptido: $0,1467 \pm 0,03869$; SOPM: $1,595 \pm 0,4075$ versus SOPM + Péptido: $0,5720 \pm 0,1079$). Las diferencias entre grupos fueron significativas en ambas caras placentarias (cara fetal: control $p = 0,0253$; SOP $p = 0,0232$; SOPM $p = 0,0045$. Cara materna: control $p = 0,0093$; SOP $p = 0,0486$), excepto la cara materna del grupo SOPM ($p = 0,1206$).

Cara fetal



Cara materna

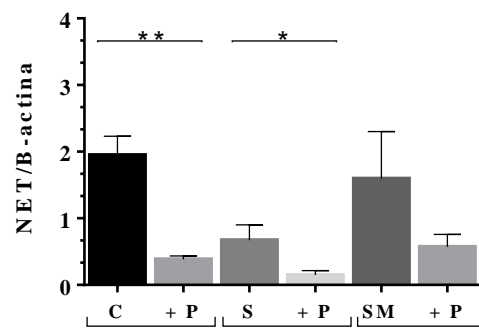
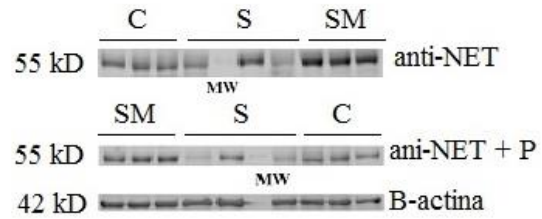


Figura 5. **Bloqueo de anti-NET empleando un péptido específico.** Las muestras de tejido placentario corresponden a la cara fetal y materna de cada condición (ver métodos). La especificidad del anticuerpo anti-NET se determinó mediante western blot empleando un péptido de bloqueo, considerándose específico un bloqueo superior al 50%. El panel superior da cuenta de un gel representativo para cada condición. El panel inferior representa la densidad de cada banda de anti-NET y péptido dividida por la densidad de cada banda de β -actina, proteína constitutiva empleada como control de carga. Se indica la media \pm SEM para cada condición. Se empleó un tamaño de muestra de $n = 3$ en cada caso. En la cara fetal: * = $p < 0,05$ grupos control y SOP *versus* péptido de bloqueo; ** $p < 0,01$ grupo SOPM *versus* péptido de bloqueo. En la cara materna: * = $p < 0,05$ grupo SOP *versus* péptido de bloqueo; ** = $p < 0,01$ grupo control *versus* péptido de bloqueo; el grupo SOPM no presenta diferencias significativas. C: control; MW: molecular weight; P: péptido de bloqueo para el anticuerpo anti-NET; S: mujeres embarazadas con Síndrome de Ovario Poliquístico sin tratamiento con metformina durante el embarazo; SM: mujeres embarazadas con Síndrome de Ovario Poliquístico en tratamiento con metformina durante el embarazo.

4.2.2. Estudio de los niveles de proteína NET en placenta

La gráfica de la figura 6 muestra la cantidad de proteína NET en la cara fetal y materna placentaria para cada grupo experimental, determinada mediante western blot. El panel superior en la figura muestra un gel representativo para cada condición; las bandas superiores corresponden a la marca de NET a los 55 kD y las bandas inferiores a las de la proteína constitutiva empleada como control de carga GAPDH, a los 37 kD. En la cara fetal placentaria se observa que los niveles de NET se encuentran significativamente disminuidos tanto en mujeres SOP ($0,2834 \pm 0,04992$; $p < 0,001$) como en mujeres SOP tratadas con metformina ($0,4366 \pm 0,1582$; $p = 0,002$), respecto del grupo control. En la cara materna de la placenta, las pacientes con SOP muestran una disminución significativa en los niveles de NET ($0,6670 \pm 0,1175$; $p = 0,035$) comparado con el tejido placentario de mujeres control. Sin embargo, el uso de metformina durante el embarazo produjo un aumento significativo en los niveles de NET ($1,310 \pm 0,2471$; $p = 0,002$) en el grupo de pacientes tratadas, respecto del grupo SOP. Finalmente, no se observaron diferencias significativas entre el grupo control y SOPM.

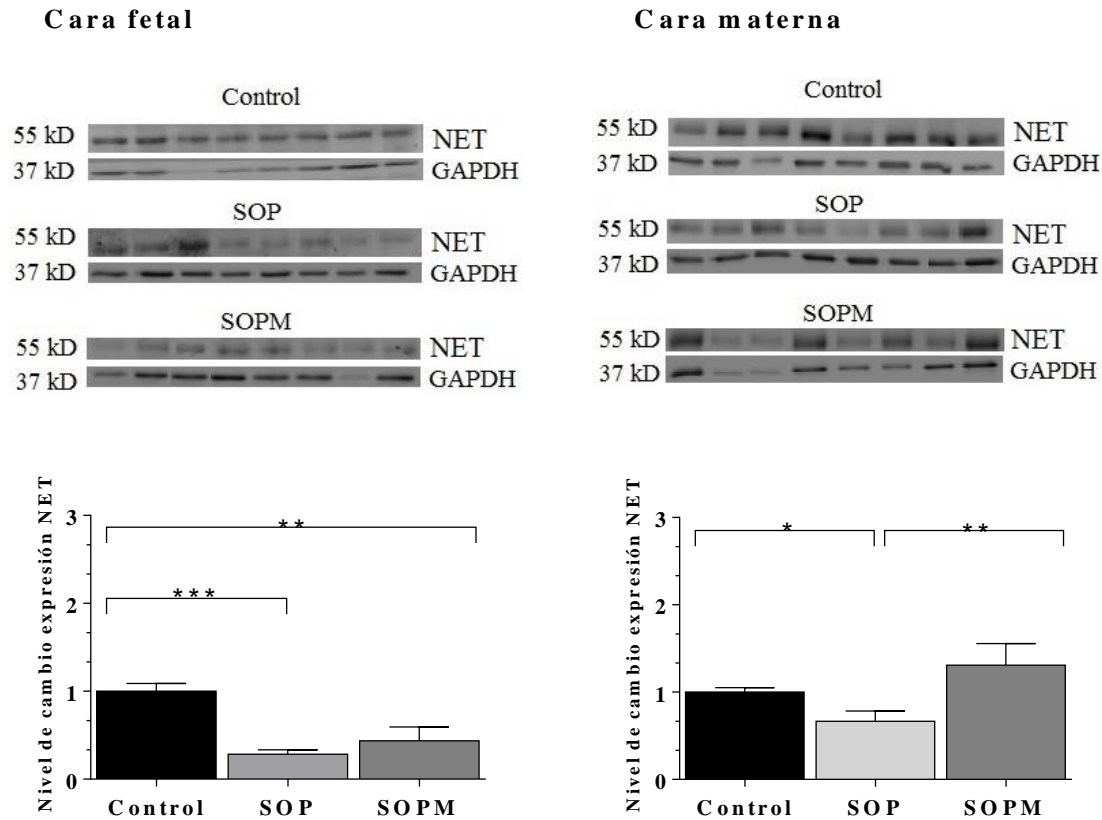


Figura 6. **Cantidad de proteína NET en la cara fetal y materna placentaria.** Las muestras de tejido placentario corresponden a la cara fetal y materna de cada condición (ver métodos). Los cambios en los niveles de NET fueron determinados mediante western blot. El panel superior da cuenta de un gel representativo para cada condición. El panel inferior representa el nivel de cambio en la cantidad de proteína NET respecto del grupo control. Se indica además la media \pm SEM para cada condición. Cada grupo experimental posee un $n = 8$. En la cara fetal: ** = $p < 0,01$ grupo control *versus* SOPM; *** = $p < 0,001$ grupo control *versus* SOP. En la cara materna: * = $p < 0,05$ grupo control *versus* SOP; ** = $p < 0,01$ grupo SOP *versus* SOPM. GAPDH: Glycerolaldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase; NET: Norepinephrine Transporter; SOP: mujeres embarazadas con Síndrome de Ovario Poliquístico sin tratamiento con metformina durante el embarazo; SOPM: mujeres embarazadas con Síndrome de Ovario Poliquístico en tratamiento con metformina durante el embarazo.

4.2.3. Estudio de señalización de insulina en placenta

Determinación de IRS1 placentario.

La gráfica de la figura 7 muestra los cambios en la cantidad de proteína IRS1 determinados mediante western blot provenientes de la cara fetal y materna placentaria de cada grupo experimental. El panel superior en la figura muestra un gel representativo para cada condición; las bandas superiores corresponden a la marca de IRS1 a los 185 kD y las bandas inferiores a las del control de carga GAPDH (37 kD). En la cara fetal placentaria se observa que el tejido placentario proveniente de mujeres SOP presenta niveles disminuidos de IRS1 ($0,7037 \pm 0,4527$; $p = 0,2130$) en comparación al control, aunque las diferencias no son significativas. El uso de metformina durante el embarazo estuvo relacionado a un aumento en los niveles de IRS1 en las pacientes SOP tratadas ($1,192 \pm 0,5837$; $p > 0,9999$), aunque las diferencias respecto del control no fueron significativas. En la cara materna de la placenta se observa que el tejido placentario proveniente de mujeres SOP presenta niveles disminuidos de IRS1 ($0,7260 \pm 0,2684$; $p = 0,1638$) en comparación al control, aunque las diferencias no son significativas. De modo similar a la cara fetal, el uso de metformina durante el embarazo estuvo relacionado a un aumento en los niveles de IRS1 en mujeres con SOP ($1,289 \pm 0,4920$; $p = 0,9229$), aunque las diferencias respecto del control no fueron significativas. Es importante destacar que en la cara materna placentaria el grupo control, SOP y SOPM, presentan niveles de IRS1 levemente mayores en comparación a la cara fetal y que el tratamiento con metformina produce un aumento de IRS1 en ambas caras placentarias.

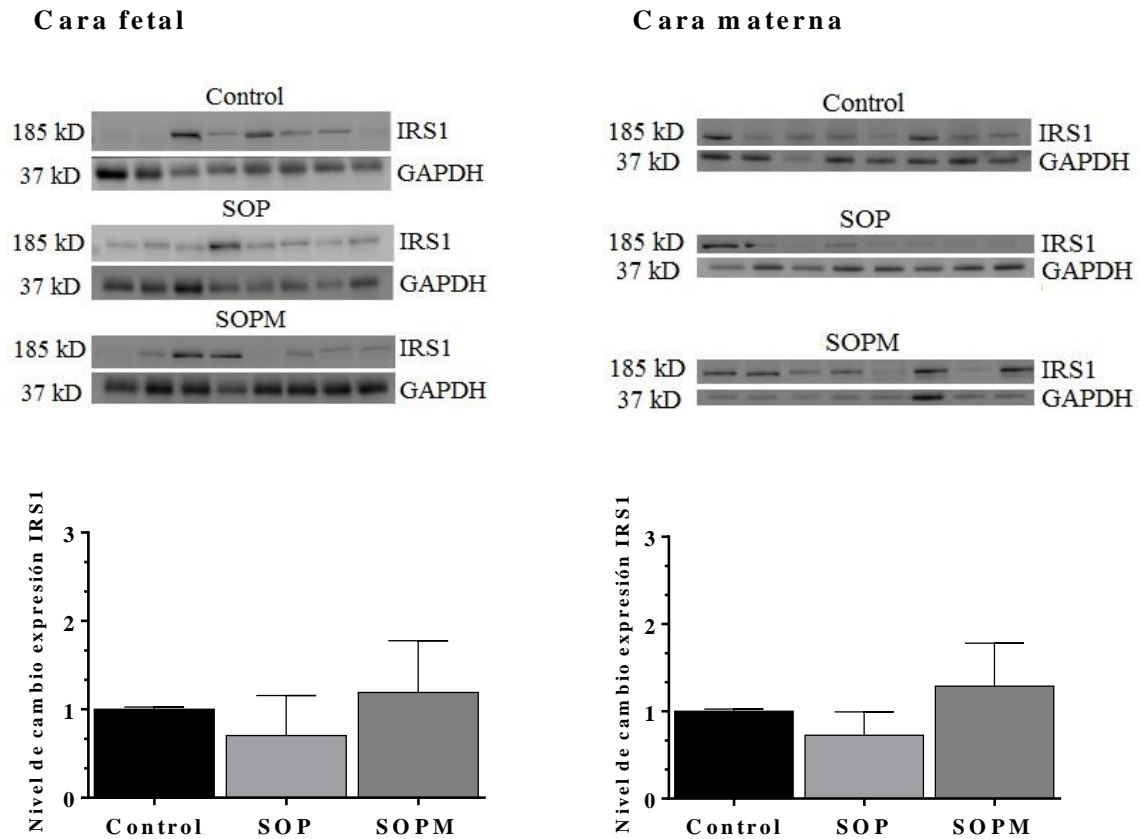


Figura 7. **Cambios en los niveles de IRS1 de la cara fetal y materna placentaria.** Las muestras de tejido placentario corresponden a la cara fetal y materna de cada condición (ver métodos). Los cambios en los niveles de IRS1 fueron determinados mediante western blot. El panel superior da cuenta de un gel representativo para cada condición. El panel inferior representa el nivel de cambio en la cantidad de proteína IRS1 respecto del grupo control. Se indica además la media \pm SEM para cada condición. Cada grupo experimental posee un $n = 8$. Las diferencias entre cada grupo no fueron significativas en ambas caras placentarias. GAPDH: Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase; IRS1: Insulin Receptor Substrate 1; SOP: mujeres embarazadas con Síndrome de Ovario Poliquístico sin tratamiento con metformina durante el embarazo; SOPM: mujeres embarazadas con Síndrome de Ovario Poliquístico en tratamiento con metformina durante el embarazo.

Determinación de GLUT4 placentario.

La gráfica de la figura 8 muestra la cantidad de proteína GLUT4 determinada mediante western blot, tanto en la cara fetal como materna de la placenta de cada grupo experimental. El panel superior en la figura muestra un gel representativo para cada condición; las bandas superiores corresponden a la marca de GLUT4 a los 55 kD y las bandas inferiores a las del control de carga GAPDH (37 kD). En la cara fetal placentaria se observa que tanto el grupo SOP ($0,8414 \pm 0,1404$; $p = 0,9488$) y SOPM ($0,8836 \pm 0,2668$; $p = 0,5958$) presentan niveles de GLUT4 cercanos al grupo control, por lo que no se observan diferencias significativas entre grupos. En la cara materna placentaria, el grupo de pacientes con SOP presenta niveles significativamente aumentados de GLUT4 ($2,037 \pm 0,2014$; $p = 0,003$), respecto del grupo control. Por otro lado, el uso de metformina durante el embarazo estuvo relacionado a un aumento significativo en los niveles de GLUT4 en mujeres SOP tratadas ($2,290 \pm 0,2651$; $p = 0,0002$). Se observa también que la cara materna de las pacientes SOP y SOPM presenta mayores niveles de GLUT4 respecto de la cara fetal.

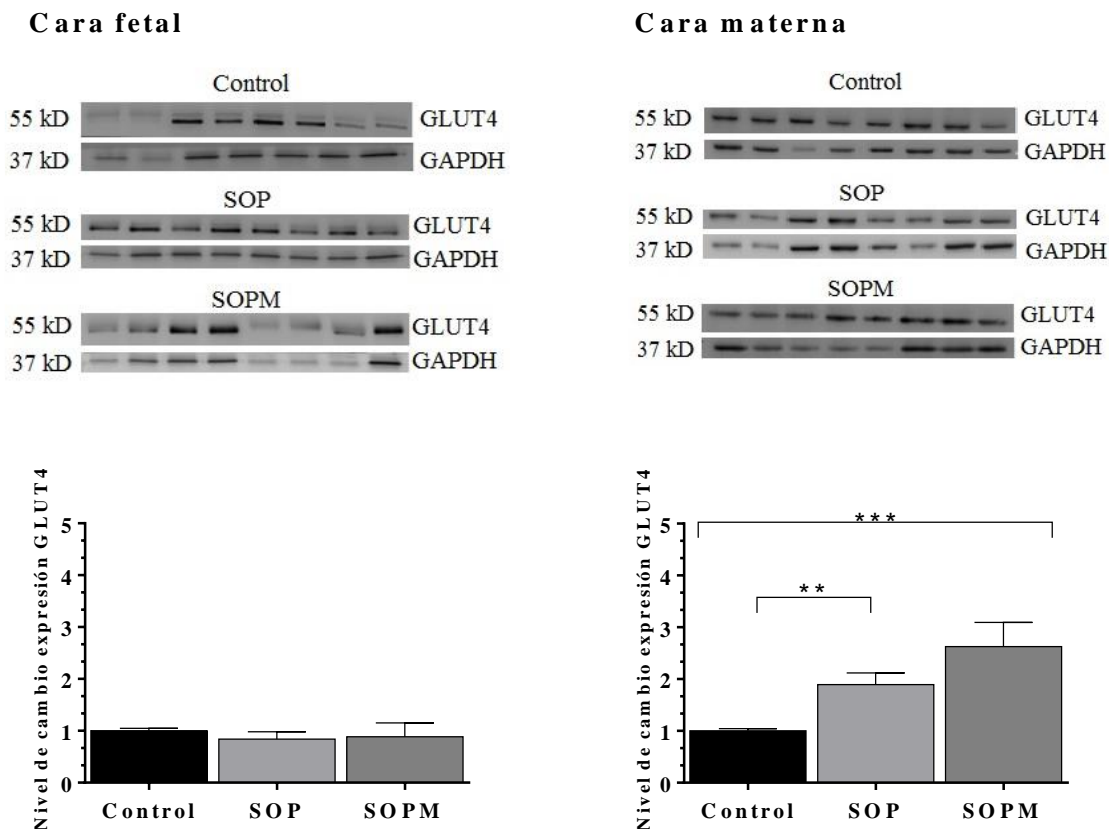


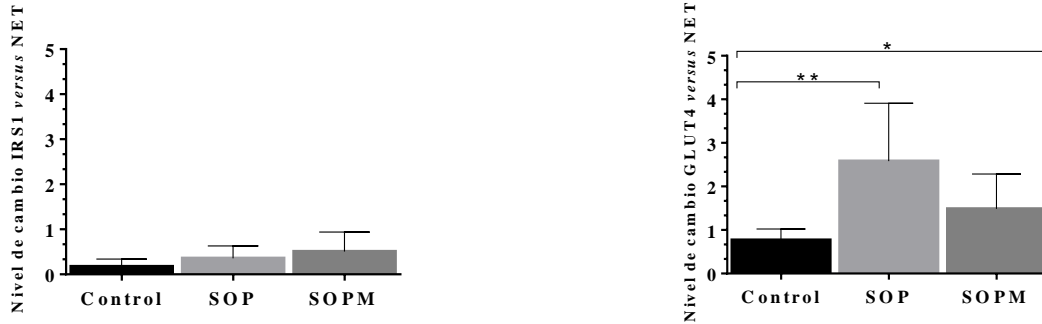
Figura 8. **Cambios en los niveles de GLUT4 de la cara fetal y materna placentaria.** Las muestras de tejido placentario corresponden a la cara fetal y materna de cada condición (ver métodos). Los cambios en los niveles de GLUT4 fueron determinados mediante western blot. El panel superior da cuenta de un gel representativo para cada condición. El panel inferior representa el nivel de cambio en la cantidad de proteína IRS1 respecto del grupo control. Se indica además la media \pm SEM para cada condición. Cada grupo experimental posee un $n = 8$. En la cara fetal: los cambios entre grupos no fueron significativos. En la cara materna: ** = $p < 0,01$ grupo control *versus* SOP; *** = $p < 0,001$ grupo control *versus* SOPM. GAPDH: Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase; GLUT4: Glucose transporter type 4; SOP: mujeres embarazadas con Síndrome de Ovario Poliquístico sin tratamiento con metformina durante el embarazo; SOPM: mujeres embarazadas con Síndrome de Ovario Poliquístico en tratamiento con metformina durante el embarazo.

4.3. NET versus componentes de la señalización insulínica a nivel placentario

La gráfica de la figura 9 muestra el nivel de cambio de la cantidad de proteína IRS1 y GLUT4 respecto de NET en ambas caras placentarias. El nivel de cambio de IRS1 respecto de NET no presenta diferencias significativas entre grupos, tanto en la cara fetal como materna de la placenta (Cara fetal: control $0,1740 \pm 0,07397$; SOP $0,3566 \pm 0,1116$; SOPM $0,5069 \pm 0,1928$; $p = 0,3463$. Cara materna: control $0,3759 \pm 0,09503$; SOP $0,3506 \pm 0,1129$; SOPM $0,34 \pm 0,1619$; $p = 0,7333$). Además, no se observa predominancia en los niveles de IRS1 o NET en la cara materna de la placenta, sin embargo, en la cara fetal se observa un leve predominio de IRS1 por sobre NET tanto en el grupo SOP como SOPM, mientras que en el grupo control se observa una predominancia inversa.

En cuanto al nivel de cambio de GLUT4 respecto de NET, vemos que tanto en la cara fetal como materna se conserva una relación inversa entre NET y GLUT4 en todos los grupos bajo estudio. En el grupo control se observa una significativa predominancia de los niveles de NET por sobre los de GLUT4 en ambas caras placentarias (cara fetal $0,77 \pm 0,09549$; cara materna $0,5755 \pm 0,07203$), si lo comparamos con el grupo SOP (cara fetal $2,579 \pm 0,5442$, $p = 0,0046$; cara materna $1,528 \pm 0,2240$, $p = 0,0046$) y el grupo SOPM (cara fetal $1,485 \pm 0,3268$, $p = 0,0459$; cara materna $1,272 \pm 0,1712$, $p = 0,0055$). Por el contrario, en el grupo SOP y SOPM se observa una significativa predominancia de los niveles de GLUT4 por sobre los de NET tanto en la cara fetal como materna de la placenta.

Cara fetal



Cara materna

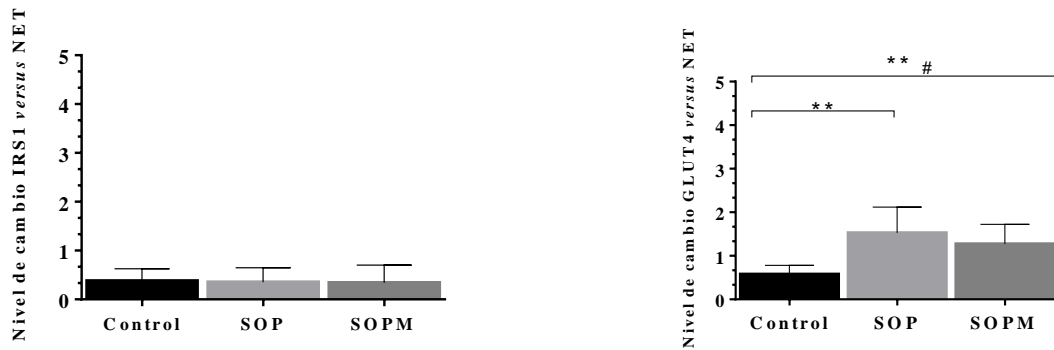


Figura 9. **NET versus componentes de la señalización insulínica a nivel placentario.** Las muestras de tejido placentario corresponden a la cara fetal y materna de cada condición (ver métodos). Los niveles de proteína NET, IRS1 y GLUT4 fueron determinados mediante western blot. Las gráficas muestran el nivel de cambio de la cantidad de proteína IRS1 y GLUT4 respecto de NET en ambas caras placentarias de cada grupo experimental. Se indica además la media \pm SEM para cada condición. Cada grupo experimental posee un $n = 8$. En la cara fetal: * = $p < 0,05$ grupo control *versus* SOPM; ** = $p < 0,01$ grupo control *versus* SOP. En la cara materna: ** = $p < 0,01$ grupo control *versus* SOP; **# = $p < 0,01$ grupo control *versus* SOPM. C: control; GAPDH: Glycerinaldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase; GLUT4: Glucose transporter type 4; IRS1: Insulin Receptor Substrate 1; NET: Norepinephrine Transporter; S: mujeres embarazadas con Síndrome de Ovario Poliquístico sin tratamiento con metformina durante el embarazo; SM: mujeres embarazadas con Síndrome de Ovario Poliquístico en tratamiento con metformina durante el embarazo.

5. DISCUSIÓN

En esta tesis logramos establecer que en pacientes con SOP embarazadas, los niveles placentarios de NET están disminuidos y los niveles plasmáticos de NE se encuentran aumentados. Por su parte, el tratamiento con metformina fue capaz de restablecer los niveles de NET a valores similares al grupo control en la cara materna de la placenta. Esto sugiere que la actividad nerviosa autónoma no solo modifica la exposición fetal a catecolaminas, sino que el hecho de que responda al tratamiento con metformina también sugiere que está relacionada con alteraciones metabólicas asociadas con el síndrome. De acuerdo a los estudios realizados, en el plasma de mujeres con SOP se observó que los niveles de NE se encuentran significativamente aumentados a las 24 semanas de gestación, para luego alcanzar valores similares a las mujeres control hacia el término del embarazo (35 semanas). El tratamiento con metformina mantuvo bajos niveles plasmáticos de NE durante toda la gestación. En la cara fetal y materna de la placenta, pudimos determinar que los niveles de proteína NET se encuentran significativamente disminuidos en mujeres con SOP y que el tratamiento con metformina aumentó significativamente dichos niveles, sólo en la cara materna de la placenta. Por otro lado, en placenta de mujeres con SOP se observó que efectores río abajo de la cascada de señalización de insulina como IRS1 y GLUT4 se encuentran alterados, principalmente en la cara materna de la placenta. El tratamiento con metformina aumentó significativamente los niveles de proteína GLUT4 sólo en la cara materna de la placenta y, junto con ello, los niveles de IRS1 experimentaron un leve aumento en ambas caras placentarias. Al estudiar el cambio en los niveles de IRS1 y GLUT4 en relación a la proteína NET, se observa que tanto en la cara materna como fetal de la placenta existe una relación inversa entre NET y GLUT4 en todos los grupos experimentales, observándose una predominancia de NET por sobre GLUT4 en el grupo control, a diferencia de los grupos SOP y SOPM en los cuales esta predominancia es inversa. Finalmente, el nivel de cambio de IRS1 respecto de NET no es significativo entre grupos, sólo se observa un leve predominio de IRS1 en los grupos SOP y SOPM en la cara fetal de la placenta.

5.1. Niveles de NE en suero de mujeres con SOP embarazadas en tratamiento con metformina y sin tratamiento.

El útero se encuentra ampliamente inervado por neuronas simpáticas, responsables de la contractilidad uterina (180). En el endometrio y decidua se han observado enzimas de síntesis de monoaminas, cuya síntesis local ejerce acciones fisiológicas paracrinas (181). Sin embargo, una síntesis y concentración anormal de monoaminas en estados tempranos del embarazo puede conducir a abortos espontáneos. Por lo que una adecuada concentración de monoaminas es esencial para una apropiada implantación y una apropiada evolución del embarazo, que es mantenida por un aumento de su degradación a nivel uterino (181). Las catecolaminas son importantes durante la vida fetal y del recién nacido. Los niveles circulantes de catecolaminas son bajos en el feto a pesar del alto tono simpático que posee, que es importante para la mantención de la homeostasis cardiovascular (120). Al nacer, los niveles de NE aumentan exponencialmente y son vitales para las adaptaciones cardiovasculares, pulmonares, metabólicas y endocrinas en la vida postnatal temprana (120). Sin embargo, enfermedades gestacionales tales como hipertensión inducida por el embarazo (182), preeclampsia (118) e IUGR (183), se han relacionado con elevados niveles plasmáticos de NE en la madre, los que posteriormente producen elevados niveles plasmáticos de NE en el feto. Elevados niveles de NE suprimen la secreción de insulina desde las células β del páncreas fetal vía receptores α_2 -adrenérgicos (142,143). La exposición crónica a altos niveles de NE sugiere que este neurotransmisor participaría en la supresión del crecimiento fetal junto con la desensibilización adrenérgica en músculo y tejido adiposo vía receptores β_2 adrenérgicos (118,121,122), además de respuestas adaptativas en el metabolismo, crecimiento y función de las células β pancreáticas en el feto (144,145). Durante el embarazo, niveles plasmáticos de NE elevados, pueden tener efectos nocivos sobre la circulación útero-placentaria, ya que la vasoconstricción local puede ser responsable de desprendimiento placentario e hipoxia intrauterina, imponiendo un serio riesgo fetal (184).

Los resultados de esta tesis muestran que las mujeres con SOP embarazadas presentan elevados niveles plasmáticos de NE a la semana 24 de gestación. Esto podría ser resultado de la aumentada actividad simpática presente en mujeres con SOP antes del embarazo

(4,6,7,54), a nivel de los nervios simpáticos ováricos, que contribuiría a una posible desregulación de la actividad del sistema nervioso simpático durante el embarazo, dado que en un embarazo normal la actividad nerviosa simpática es baja durante los primeros trimestres y aumenta durante el tercer trimestre (145). Contrariamente, nuestras pacientes SOP muestran elevados niveles plasmáticos de NE a las 24 semanas de gestación, lo que sugiere que la exposición crónica a NE ocurre durante un período en el cual las gónadas fetales están en desarrollo (185-187), y por tanto son más susceptibles a los cambios en el desarrollo que pudieran ocurrir durante el período posnatal. En este sentido, se ha descrito recientemente que el estrés gestacional en ratas no sólo aumenta los niveles plasmáticos de NE durante el embarazo, sino que también modifica la función reproductiva femenina en la progenie (188,189). Adicionalmente, estudios previos sugieren que el desarrollo gonadal fetal se encuentra alterado en niñas nacidas de mujeres con SOP (81). Por otro lado, la disminución en los niveles plasmáticos de NE a las 35 semanas de gestación, en el grupo de pacientes SOP, podría reflejar una reducción compensatoria de la actividad del sistema nervioso simpático tal como se ha observado en pacientes que desarrollan hipertensión durante el embarazo (190). Por lo que, esta desregulación en el tono simpático antes y durante el embarazo podría ser uno de los tantos factores que contribuyen a la infertilidad en mujeres con SOP (191), y una vez embarazadas, a una invasión trofoblástica decidual alterada (192) y al nefasto historial obstétrico de estas pacientes (1).

Se ha sugerido que en mujeres con SOP existe una estrecha relación entre una hiperactividad simpática/eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y los niveles de andrógenos e insulina (193), los que se encuentran aumentados en la gestante SOP (81). Además, se ha sugerido que en el SOP existen defectos en la síntesis de andrógenos que aumentan la producción ovárica de andrógenos y una alteración en el metabolismo del cortisol, resultando en una mayor producción de andrógenos adrenales (51). Por su parte, la hiperinsulinemia presente en estas pacientes puede activar al citocromo P450C17 en el ovario y glándula adrenal, con el consecuente aumento en la síntesis de andrógenos (86). Dada la heterogeneidad de este síndrome, la hiperandrogenemia puede tener un origen ovárico, adrenal o ambos (193,194). Sin embargo, las mujeres con SOP cuya hiperandrogenemia es de origen adrenal presentan mayores trastornos reproductivos y metabólicos respecto de aquellas cuya

hiperandrogenemia era de origen ovárico. Esto sugiere que una cierta población de pacientes con SOP presenta una hiperactividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (193), que explicaría las alteraciones reproductivas que se relacionan con respuestas de estrés en esa población de pacientes. De hecho, las mujeres con SOP presentan una correlación positiva entre los niveles urinarios de MHPG y los niveles séricos de DHEAS (195), dando cuenta de una estrecha relación entre una aumentada actividad simpática y alterados niveles plasmáticos de andrógenos. Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen ante tal interacción no se conocen en su totalidad. Estudios en animales muestran que los andrógenos son esenciales para la síntesis de NE a nivel de la glándula adrenal, ya que favorecen la expresión de la enzima tirosina hidroxilasa, enzima limitante en la síntesis de catecolaminas, por lo que a mayores niveles de andrógenos mayor será la síntesis de catecolaminas adrenales (196). Así, los elevados niveles de NE en la gestante SOP, observados a las 24 semanas de gestación, podrían ser consecuencia de la acción sinérgica del hiperandrogenismo e hiperinsulinemia materna sobre la glándula adrenal y en conjunto podrían generar respuestas adaptativas placentarias y fetales.

En el grupo de pacientes control, los niveles plasmáticos de NE se mantienen relativamente constantes durante el embarazo, no evidenciándose cambios bifásicos en la actividad del sistema nervioso autónomo, sin embargo, estas discrepancias podrían deberse a una inadecuada estratificación de la edad gestacional y a un número insuficiente de pacientes en nuestro estudio (145).

Una importante observación para esta tesis es que la administración de metformina a las mujeres con SOP embarazadas reguló la actividad del sistema nervioso simpático en estas pacientes, al mantener bajos niveles plasmáticos de NE durante todo el embarazo. Esta afirmación se apoya en la evidencia de que la administración de metformina a pacientes hipertensos disminuye la presión arterial, la frecuencia cardíaca y la actividad nerviosa simpática (197-199). En pacientes con preeclampsia, el tratamiento con metformina reduce la disfunción endotelial y mejora la vasodilatación de las arterias omentales (200). Por tanto, los resultados presentados en esta tesis confirman estas sugerencias y amplían las observaciones previas en cuanto a la capacidad de la metformina de regular la actividad del

sistema nervioso simpático, incluyendo a las mujeres embarazadas con SOP (6). Los mecanismos que subyacen al efecto de la metformina sobre el sistema nervioso simpático de pacientes con SOP embarazadas, no están completamente claros. En este sentido, la metformina ha demostrado tener efectos simpato-inhibidores agudos sobre el sistema nervioso central en ratas (197). Otro mecanismo podría implicar la regulación de la secreción de andrógenos, los cuales actúan como reguladores positivos de la biosíntesis de catecolaminas en la médula suprarrenal (196).

5.2. Niveles de NET en placenta de mujeres con SOP y cambios en la señalización insulínica placentaria.

Estudio de los niveles de proteína NET en placenta

El tejido placentario no contiene fibras nerviosas que controlen su actividad, sin embargo, posee numerosos transportadores monoaminérgicos, entre los cuales se encuentra NET (116,117). Los niveles de catecolaminas son muy bajos en la circulación fetal, aunque son importantes para la mantención de la homeostasis cardiovascular (120). Modelos fetales ovinos muestran que el sistema simpático-adrenal fetal se caracteriza por una alta producción y depuración de catecolaminas, siendo la placenta el principal responsable de la depuración intrauterina y fetal de NE, casi exclusivamente vía NET (120,201). Este transportador presenta una pobre expresión en el sinciotrofoblasto de los vellos coriónicos, contrario a lo observado en el sinciotrofoblasto de las vellosidades de anclaje de la cara materna de la placenta (116,201).

Na y colaboradores (125), demostraron que la expresión de NET se encuentra disminuida en mujeres embarazadas con preeclampsia, respecto a mujeres embarazadas control. Específicamente en cultivos de células trofoblásticas humanas la expresión de la isoforma de NET glicosilado de 85 kDa disminuye a medida que aumenta la concentración de NE en el medio de cultivo. En cambio, la isoforma de 55 kDa no sufre cambios dependientes de la concentración de NE. Esta disminución traería como consecuencia una disminución en la recaptación de NE, en la actividad de invasión trofoblástica, y cambios en la respuesta

inmune, los cuales pueden ocurrir durante el período de placentación, conduciendo al desarrollo de preeclampsia. Este estudio también sugiere que el balance entre la concentración de NE y NET es importante para el proceso de invasión trofoblástica al modular la expresión de metaloproteasas en trofoblastos. Además, estos investigadores encontraron una relación inversa entre los niveles plasmáticos de NE y la expresión de NET, lo cual es similar a los resultados presentados en esta tesis. El hallazgo más notable del estudio de Na y colaboradores (125) fue que la disminución en los niveles de NET estuvo relacionada a una disminución en la depuración de NE desde la cara fetal placentaria, dando lugar a una mayor exposición fetal a NE durante el desarrollo. Un resultado similar fue descrito por Bzoskie y colaboradores (120), quienes encontraron una relación inversa entre los niveles de NE en sangre de cordón umbilical y la expresión placentaria de NET. Sin embargo, la comparación entre la expresión de NET y la concentración de catecolaminas en sangre de cordón umbilical, no puede tener en cuenta los cambios repentinos en las catecolaminas circulantes como resultado de eventos perinatales. Este estudio sugiere que los factores crónicos asociados con una alterada condición fetal y del embarazo están asociados con una disminución en la expresión placentaria de NET, más que eventos perinatales entre los que pueden incluirse el parto (120).

En general, existen muchas similitudes entre preeclampsia y SOP, en particular, debido a la prevalencia de preeclampsia en pacientes con SOP que estén embarazadas (1), especialmente aquellas que no han sido tratadas con metformina durante el embarazo (29), por lo que nuestros resultados pueden ser comparables con los obtenidos por Na y colaboradores (125). Nuestros resultados muestran una clara disminución en la isoforma de 55 kDa de NET, pero no en la isoforma de 85 kDa. En esta tesis no pudimos determinar la isoforma de 85 kDa de NET tal como lo hizo Na y colaboradores (125). Además, los cambios en los niveles de la proteína NET que tienen lugar frente a elevados niveles plasmáticos de NE encontrados en este trabajo, involucran isoformas diferentes. Esta discrepancia podría deberse en parte a la diferencia étnica de los pacientes empleados en ambos estudios, ya que Na y colaboradores emplea mujeres caucásicas y nuestro estudio emplea mujeres hispanas, quienes tienen más riesgos de padecer diabetes mellitus, macrosomía e hipertensión severa en comparación a las caucásicas (202); a diversos polimorfismos de NET en las placentas estudiadas que

repercuten directamente en su función transportadora (132); a que en el SOP los mecanismos de senescencia placentaria podrían diferir de aquellos observados en otras patologías del embarazo (203); a un patrón de glicosilación diferente dependiendo del tipo celular involucrado (126); a las diferencias en las condiciones de trabajo y muestras en estudio. Aunque existan estas diferencias, es claro que en ambos estudios se observa una alteración en los niveles de NET, quien es responsable en gran medida de mantener la concentración sérica de NE dentro de parámetros normales para asegurar la correcta placentación fetal y su posterior desarrollo.

Dada la isoforma de NET disminuida en placenta de término de las pacientes estudiadas, es posible sugerir que en la embarazada SOP existiría una alteración en el proceso de maduración de NET, ya que, se ha descrito en la literatura que inhibidores de la glicosilación producen la desaparición de la isoforma de 55 kDa a las pocas horas (126). Junto con ello es probable que la alterada glicosilación de NET se sume a una expresión placentaria disminuida. En el caso de nuestras pacientes, sería la hiperinsulinemia/hiperglicemia y el riesgo de desarrollar diabetes gestacional lo que estaría alterando la maduración de NET o su expresión. La glucosa, insulina y ácidos grasos no esterificados, son potentes estimulantes de la actividad simpática y de la liberación de NE (204). La insulina por su parte, modula negativamente la expresión de NET (130), con lo cual disminuye la recaptación de NE desde el espacio extracelular, sugiriendo que la insulina podría modular además la actividad de vías noradrenérgicas a nivel de sistema nervioso central (205), pudiendo influenciar profundamente la función neuroendocrina a este nivel (206). Por otro lado, estudios en pacientes diabéticos y con sobrepeso muestran una correlación negativa entre la expresión periférica de NET y los niveles plasmáticos de glucosa/hemoglobina glicosilada y la hipertrofia del ventrículo izquierdo; junto con ello presentan aumentados niveles plasmáticos de NE y una disminuida actividad de NET (207). En una condición hiperinsulinémica y/o hiperglicémica, como en el caso de nuestras pacientes (83,208), la modulación negativa sobre la expresión de NET sería significativa (209), o el proceso de maduración de NET se encontraría alterado de un modo similar a lo observado con la población de ciertas proteínas en pacientes con diabetes gestacional (210). Por tanto, el mejoramiento del estado hiperinsulinémico/hiperglicémico de la embarazada SOP al ser tratada con metformina,

podría explicar por qué el tratamiento farmacológico permite restablecer los niveles de NET en la placenta y disminuir los niveles plasmáticos de NE, ya que la expresión de NET se correlaciona positivamente con la sensibilidad a la insulina (207). Esto sugiere que el alcance de estos efectos podría incluir no sólo la interface materno-fetal, sino acciones centrales directas o indirectas que contribuyan al mejoramiento de la homeostasis metabólica y neuroendocrina en estas pacientes.

NET desempeña un papel preponderante en la modulación de la transmisión de las sinapsis catecolaminérgicas, a nivel central y periférico (211), y su función puede ser alterada por numerosas drogas, hormonas, neurotransmisores y diversos componentes celulares. Estas sustancias pueden unirse directamente al transportador e inhibir su función esencialmente por antagonismo o competencia. Además, los cambios funcionales en NET producto de la unión de estas sustancias al transportador pueden ser resultado de interacciones con otros receptores o sitios de unión, actuando por activación de sistemas de segundos mensajeros o inhibiendo otras vías de señalización aún desconocidas (130). Cambios en la función de NET producen profundas respuestas a nivel cardiovascular y metabólico. La inhibición de NET a nivel central reduce el flujo simpático por activación de receptores α 2-adrenérgicos. En contraste, la inhibición periférica de NET aumenta la disponibilidad de NE. Junto con ello, la variabilidad genética también afecta la función de NET como lo observado en pacientes con síndrome de taquicardia postural, que afecta más a mujeres en sus años reproductivos que a hombres (211). Sin embargo, factores no genéticos como los ya mencionados anteriormente también afectan la función de NET. En animales, la expresión de NET y su función en diferentes áreas cerebrales es modulada por testosterona, estradiol y progesterona. Además, se ha observado una diferencia de género en la respuesta cardiovascular a la inhibición de NET, lo que sugiere que la función cardíaca de NET podría estar reducida en mujeres producto de la acción del estradiol y progesterona (211). En el caso de nuestras pacientes SOP la hiperinsulinemia y las alteraciones hormonales presentes en estas pacientes podrían regular positiva o negativamente la función de NET a distintos niveles, principalmente a nivel periférico dado los elevados niveles de NE plasmática, dependiendo de la población celular involucrada. De hecho, estudios *in vitro* muestran que el tratamiento con corticosteroides aumenta la expresión de NET (212), por lo que podríamos pensar que

en la mujer SOP la expresión de NET podría estar aumentada, producto de la hipercortisolemia que podrían presentar durante el embarazo (211). Sin embargo, los resultados de esta tesis muestran que las mujeres con SOP presentan una disminuida expresión de NET a nivel placentario y aumentados niveles plasmáticos de NE en estadios tempranos de la gestación, lo que podría estar dando cuenta de una desregulación en el sistema nervioso autónomo en estas pacientes (145), evidenciada por alteraciones de las vías relacionadas con respuestas de estrés antes del embarazo (4,6,145) y que persistirían durante el mismo. Por otro lado, estudios en ratas macho castradas, sugieren que la castración reduce la actividad de NET en el bulbo olfatorio de estos animales, posicionando a la testosterona como un regulador de la expresión y función de NET a nivel de sistema nervioso central (213), contrario a lo observado con insulina (205) y estrógenos (130). Sin embargo, en nuestras pacientes SOP, las cuales presentan elevados niveles de andrógenos respecto de las gestantes normales (83), se observan disminuidos niveles placentarios de NET y elevados niveles plasmáticos de NE, por tanto, las acciones centrales de las hormonas esteroidales y otras sustancias endógenas parecen tener efectos diferenciales en tejidos periféricos y más aún en condiciones de embarazo, en donde tienen lugar importantes cambios en la homeostasis de diversos sistemas en la madre con la finalidad de asegurar el adecuado desarrollo fetal. Sin embargo, en nuestras mujeres con SOP los cambios fisiológicos que tienen lugar durante el embarazo se encuentran profundamente alterados y darían cuenta de las complicaciones durante el embarazo a las cuales son propensas este grupo de pacientes y de un sin número de respuestas adaptativas en su descendencia.

Finalmente, un hallazgo sorprendente de esta tesis fue la completa recuperación de los niveles de NET en la cara materna de la placenta, proveniente de mujeres con SOP que fueron tratadas con metformina durante todo el embarazo. Esto puede ser resultado de la disminución en los niveles plasmáticos de NE inducido previamente por el tratamiento farmacológico, en acuerdo a lo descrito por Na y colaboradores (125).

Estudio de señalización de insulina en placenta

Determinación de IRS1 placentario.

El embarazo es un estado metabólico complejo que involucra alteraciones a nivel hormonal o de citocinas, por ejemplo, un aumento en los niveles de estrógenos, progesterona, prolactina, cortisol, gonadotropina coriónica humana, hormona del crecimiento de origen placentario, lactógeno placentario humano, TNF α , resistina y leptina, junto con una disminución en los niveles de adiponectina; así como una carga creciente de utilización de combustible por el concepto. Metabólicamente, el primer trimestre se caracteriza por un incremento en la sensibilidad a la insulina y lipogénesis. En contraste, el segundo y tercer trimestre se caracterizan por insulino resistencia y un aumento en la lipólisis. El incremento en los niveles de resistina y leptina que contrasta con la disminución en los niveles de adiponectina, serían responsables de la creciente insulino resistencia hacia el término del embarazo (214). Esto estaría en concordancia con lo observado en el grupo control de las pacientes estudiadas, en donde los disminuidos niveles placentarios de IRS1 dan cuenta de una insulino resistencia fisiológica propia del embarazo. De igual modo, en placenta proveniente de mujeres con SOP encontramos bajos niveles de IRS1 tanto en la cara fetal como materna de la placenta. Sólo el grupo de pacientes tratadas con metformina durante todo el embarazo, presenta un leve aumento en los niveles de IRS1 en ambas caras placentarias.

La señalización insulínica es crítica para la mantención de los niveles plasmáticos e intracelulares de glucosa. La activación de esta vía involucra la unión de la insulina a su receptor, la autofosforilación del mismo y la posterior fosforilación de los substratos de receptor de insulina (sigla en inglés IRS), permitiendo la asociación de los IRS con efectores río abajo del receptor para así ejercer su acción (215). Aunque no se disponen de muchos datos sobre la señalización insulínica placentaria, algunos estudios han investigado cambios en la expresión de IRS1 y PI3K en placenta de mujeres con diabetes gestacional, encontrando una expresión diferencial entre el lado materno y fetal de la placenta, lo que implica una regulación placentaria variada entre madre y feto, con un posible papel protector de la placenta frente al alterado estado de la madre o puede ser un indicador importante de

senescencia placentaria (216). Estudios en placenta humana han mostrado que el receptor de insulina se encuentra bajo control fetal y que el transporte de glucosa se encuentra bajo control materno. Otros estudios han encontrado una correlación negativa entre la expresión de IRS1 y los niveles de insulina de la madre, sugiriendo que la expresión de IRS1 obedece a un control materno (215), hecho que permitiría explicar por qué el mejoramiento del estado hiperinsulinémico de las pacientes con SOP de nuestro estudio, tras ser tratadas con metformina, permitió aumentar levemente los niveles de IRS1 en la placenta.

Las mujeres con SOP son propensas a diversas complicaciones durante el embarazo, tales como preeclampsia y diabetes gestacional (1,217). Alteraciones comunes del SOP como obesidad e insulino resistencia, que generalmente persisten durante el embarazo, han mostrado ser factores de riesgo para el desarrollo de preeclampsia, sin embargo, los mecanismos mediante los cuales estas alteraciones se relacionan entre si no están claros (218). Un estudio realizado en placenta de mujeres con preeclampsia, tratadas con insulina en el medio de cultivo, mostró una fosforilación de IRS-1 y de la subunidad reguladora p85 de PI3K disminuida, junto con una aumentada fosforilación en residuos de serina en IRS 1 y 2, mostrando que en una condición de preeclampsia la cascada de señalización de insulina se encuentra alterada (218). El conjunto de estas observaciones nos permite sugerir que en condiciones en donde el componente simpático se encuentre alterado (117,125), el componente metabólico también lo está, estableciendo una suerte de sinergismo entre ambos. Un origen posible para esta situación sería un desbalance en el control simpático bajo el cual está sujeto el tejido adiposo, conduciendo a alteraciones en su función endocrina (219,220), que repercuten en la homeostasis metabólica de todo el organismo. Así, el mejoramiento de las alteraciones metabólicas y hormonales en las pacientes con SOP tras ser tratadas con metformina durante el embarazo, conduciría a la corrección de las alteraciones simpáticas en estas pacientes.

Al analizar el nivel de cambio de IRS1 respecto de NET, en la cara fetal de la placenta observamos un leve predominio de IRS1 por sobre NET en los grupos SOP y SOPM, que en el grupo SOP obedece más bien a una menor expresión de NET más que a un aumento en los niveles de IRS1. En contraste, el tratamiento con metformina produjo un aumento discreto

en los niveles de IRS1 en ambas caras placentarias, aunque en la cara fetal no aumentó los niveles de NET, lo que estaría en concordancia con la predominancia de IRS1 observada en este grupo de pacientes. En cuanto al grupo control, la predominancia de NET por sobre IRS1 obedecería a la insulino resistencia fisiológica propia del embarazo, más que a una mayor expresión de NET. Por otro lado, en la cara materna de la placenta no se observan diferencias entre grupos respecto de IRS1 y NET. A pesar de lo anteriormente señalado, en esta tesis no pudimos encontrar una clara relación entre los niveles de NET e IRS1, ni establecer una correlación entre los niveles plasmáticos de NE y los niveles de IRS1, posiblemente debido al pequeño número de pacientes estudiadas y a la falta de muestras de otras edades gestacionales.

El nivel de la proteína IRS1 es crítico para la regulación del transporte de glucosa en tejidos sensibles a la insulina (221). A diferencia del receptor de insulina, la proteína IRS1 sufre una disminución de un 30-50% en músculo esquelético de mujeres embarazadas obesas que presentan o no diabetes gestacional, en comparación con mujeres obesas no embarazadas, sugiriendo un efecto regulador importante del embarazo sobre los niveles de IRS1 que es aún mayor en una condición de diabetes gestacional (222). Resultados similares se han obtenido de biopsias de tejido adiposo provenientes de la pared abdominal de mujeres con diabetes gestacional (223). Posterior al parto los niveles de IRS1 vuelven a la normalidad al cabo de 6 semanas en mujeres que no presentaron diabetes gestacional (221); y aunque los niveles de IRS1 disminuyen más severamente en mujeres con diabetes gestacional, parece ser que esta condición es reversible después del embarazo (215,224). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en nuestro trabajo, en cuanto a los disminuidos niveles de IRS1 observados en placentas provenientes de mujeres con SOP no tratadas con metformina y de pacientes control. Finalmente, la evidencia sugiere que las complicaciones subyacentes en pacientes con SOP embarazadas se relacionan entre sí potenciando sus efectos deletéreos sobre la señalización insulínica placentaria.

Determinación de GLUT4 placentario.

El paso final de la cascada de señalización insulínica es la captación de glucosa por la célula, que es vital para la mantención de la euglicemia dentro de los individuos. Esto involucra la translocación de los GLUTs desde el *pool* intracelular hacia la membrana plasmática, permitiendo la captación de glucosa por la célula. La expresión placentaria de GLUT1, isoforma ubicua, está inversamente relacionada con la concentración extracelular de glucosa, mientras que GLUT4, cuya población placentaria es menor, es la isoforma sensible a la acción insulínica (215). En una condición de diabetes gestacional, los niveles placentarios de GLUT4 presentan una leve disminución respecto del control (225), sin embargo, en células de tejido adiposo y muscular se ha observado una notable disminución (226), dependiendo del grado de insulino resistencia (221,227). Estas diferencias sugieren que GLUT4 estaría sujeto a una regulación tejido-específica (225). Algunos estudios han mostrado una disminuida captación de glucosa en tejido placentario de pacientes con diabetes gestacional, junto con una aumentada expresión de GLUT1 en la cara materna de la placenta. Sin embargo, no se ha logrado determinar el papel de GLUT4 en la diabetes gestacional (215). Colomiere y colaboradores (215), mostraron una disminuida expresión y niveles proteicos de GLUT4 en placenta de mujeres con diabetes gestacional tratadas con insulina y dieta durante el embarazo o en pacientes obesas. Por el contrario, en esta tesis los niveles proteicos de GLUT4 en la cara materna de la placenta de mujeres con SOP no tratadas con metformina, se encuentran aumentados sugiriendo que, en el SOP a diferencia de la diabetes gestacional, los mecanismos compensatorios para el transporte placentario de glucosa involucran isoformas diferentes. Es probable que esta discrepancia en los resultados se deba a que en las pacientes con SOP estudiadas el componente simpático participaría activamente en las adaptaciones placentarias que observamos en estas pacientes, el que no se encontraría presente en mujeres con diabetes gestacional. Por su parte, el tratamiento con metformina al normalizar el alterado estado metabólico de las pacientes con SOP, permite aumentar los niveles de GLUT4 en la cara materna de la placenta, lo que estaría dando cuenta de una mayor sensibilidad a la insulina en el compartimento materno. GLUT4 se expresa principalmente en la cara materna de la placenta (225), lo que da cuenta de los bajos niveles de GLUT4 encontrados en la cara fetal de todos los grupos estudiados. Por otro lado, la expresión de GLUT4 disminuye a medida que el embarazo llega a término (228), por la

insulino resistencia fisiológica presente durante este período, es por ello que los niveles de GLUT4 se encuentran disminuidos en el tejido placentario proveniente de las mujeres control estudiadas en esta tesis.

El transportador GLUT4 es el único transportador de glucosa dependiente de insulina y se asocia estrechamente con el metabolismo de glucosa. Se expresa principalmente en células que transportan glucosa, desempeñando un importante papel en la homeostasis de esta hexosa. Hace algunos años se creía que GLUT4 sólo se expresaba en músculo esquelético, músculo cardíaco y tejido adiposo (229). Sin embargo, estudios recientes muestran que GLUT4 también se expresa en otros tejidos tales como endometrio (229) y en esta tesis, en placenta. Dado que la diferenciación y maduración de las células endometriales dependen de un adecuado metabolismo de la glucosa, GLUT4 desempeña un importante papel en el proceso de maduración del tejido glandular endometrial. En pacientes con SOP las anomalías metabólicas pueden afectar estos procesos, ya que la expresión de GLUT4 se correlaciona negativamente con la insulino resistencia presente en estas pacientes (229). Otros estudios han mostrado que, además de la alterada expresión de GLUT4 a nivel endometrial, las pacientes con SOP presentan disminuidos niveles de IRS1 y otros efectores de la cascada de señalización insulínica (229). Esto concuerda con lo observado en esta tesis, ya que las pacientes con SOP presentan disminuidos niveles de IRS1 respecto del grupo control y tratado con metformina, en ambas caras placentarias, evidenciando una alteración en la señalización insulínica de la placenta. En nuestro trabajo también pudimos observar disminuidos niveles de GLUT4 en la cara fetal de la placenta de mujeres con SOP sin tratamiento farmacológico. Por el contrario, en la cara materna de la placenta SOP los elevados niveles de GLUT4 obtenidos dan cuenta de un posible mecanismo compensatorio frente a un alterado control materno de la captación de glucosa y de la señalización insulínica placentaria. Se ha demostrado que el receptor de insulina colocaliza con GLUT4 en placenta humana (225). Esto hace posible la regulación del transporte placentario de glucosa por insulina, como se sugiere para las células amnióticas. Basados en la movilización de los receptores de insulina hacia el lado fetal de la placenta con la progresión del embarazo y en el consenso clásico de que, en condiciones fisiológicas, la insulina materna no atraviesa la barrera placentaria, entonces la insulina fetal, en lugar de la materna, estaría implicada en la

regulación de GLUT4 en la placenta hacia el término (225). Sin embargo, los resultados de esta tesis indican una mayor población de GLUT4 en la cara materna del tejido placentario proveniente de mujeres con SOP con y sin tratamiento con metformina durante el embarazo, otorgando protagonismo a la insulina materna sobre el control de la expresión de GLUT4.

Modelos animales de IUGR (230), en los cuales se observa un componente simpático aumentado, muestran mecanismos adaptativos fetales sobre el metabolismo de la glucosa evidenciados por una marcada hipoglicemia a pesar de presentar un transporte de glucosa normal o aumentado; una tasa de utilización de glucosa mayor al transporte indicando una producción fetal de glucosa, gracias a un aumento en la expresión de enzimas gluconeogénicas producto de elevados niveles de glucagón y NE, lo que estaría en contraposición a un embarazo normal en donde se observa una limitada capacidad de la placenta y feto para producir glucosa, haciéndolo dependiente del transporte de esta hexosa desde la madre (231); y una disminuida tasa de oxidación de glucosa. La insulina estimula la utilización fetal de glucosa, sin embargo, en estos modelos se observa una baja concentración de insulina fetal. Por lo que, la mantención de la utilización fetal de glucosa se debe a una aumentada sensibilidad a la insulina para este proceso, gracias al aumento en la expresión de GLUT1 en diversos tejidos y de GLUT4 en corazón (230) y placenta (231). En el caso de nuestras pacientes SOP, los aumentados niveles de GLUT4 en la cara materna de la placenta podrían dar cuenta de respuestas adaptativas sobre el metabolismo y transporte de glucosa similares a las observadas en los modelos de IUGR, en donde participe activamente el componente simpático materno y fetal. Pese a que en las mujeres con SOP estudiadas en esta tesis el embarazo llegó a término, se pone en evidencia lo siguiente: 1. La existencia de mecanismos compensatorios sobre el metabolismo placentario de glucosa que favorecen la supervivencia fetal frente a un ambiente intrauterino adverso y 2. La existencia de efectos programadores negativos que no pueden ser corregidos a pesar de los esfuerzos compensatorios, los que se manifiestan en la descendencia de estas mujeres en etapas tempranas de la vida (81,97). Sin embargo, el tratamiento con metformina permite reprogramar positivamente a la descendencia de estas pacientes al hacerlos menos insulino resistentes (232) y al disminuir alteraciones hormonales como elevados niveles de AMH (81).

Es sabido que la función mitocondrial en pacientes con SOP y diabetes tipo 2, se encuentra alterada en tejidos sensibles a la acción insulínica y se piensa que desempeña un papel importante en el desarrollo de insulino resistencia (233). Estudios en animales muestran que la depleción de GLUT4 en modelos Knock-out genera respuestas adaptativas paradójicas que promueven la biogénesis mitocondrial, captación/oxidación de ácidos grasos y que la recuperación restringida de la captación de glucosa a nivel muscular mejora el fenotipo diabético de estos animales (104). Sin embargo, en el caso de las pacientes con SOP de nuestro estudio, en donde la NE materna parece estimular la síntesis *de novo* de GLUT4 a nivel de la cara materna placentaria, es probable que este estímulo sea responsable de producir respuestas adaptativas que vayan en desmedro de la función mitocondrial placentaria y fetal. Esta suposición estaría en concordancia con lo observado en modelos murinos de androgenización fetal en donde se observa una hipofunción del tejido adiposo marrón (sigla en inglés BAT) y una baja expresión de UCP1 (50), conduciendo a obesidad, hiperandrogenismo e insulino resistencia en la adultez.

Receptores acoplados a proteína Gs, los cuales aumentan los niveles intracelulares de cAMP, tienen la capacidad de estimular la vía de señalización de AMPK (234). Por ejemplo, se ha demostrado que la NE vía activación de receptores β -adrenérgicos en diversos tejidos, estimula la vía de AMPK por un mecanismo aún desconocido (234,235). Por otro lado, la insulina inhibe la activación de AMPK vía fosforilación de la subunidad catalítica α de esta enzima, por acción de la proteína cinasa B (235). En corazón, la activación de AMPK protege al corazón de isquemia gracias al aumento en la captación de glucosa y glicolisis (235). Por otro lado, la exposición al frío ha demostrado aumentar la captación de glucosa en BAT, sitio principal controlado simpáticamente para la producción metabólica de calor. Ratas expuestas al frío por un período prolongado de tiempo (mayor a 10 días), muestran un aumento paralelo en la expresión de GLUT4 y la captación de glucosa en BAT. La denervación simpática suprime estos efectos. Esto sugiere que la exposición al frío aumenta la captación de glucosa en BAT mediante 2 mecanismos distintos, dependientes de la actividad simpática: 1. Aumento en la cantidad de GLUT4 por estimulación de su síntesis *de novo* y 2. Aumento sin estimulación de la síntesis de GLUT4, probablemente debido a un cambio en la actividad de transporte y/o su translocación desde el *pool* intracelular hacia la membrana plasmática (236).

Efectos similares podrían explicar el aumento en los niveles de GLUT4 en la cara materna de la placenta proveniente de pacientes con SOP no tratadas farmacológicamente, ya que modelos animales de condición quística pueden obtenerse por exposición al frío, en donde el componente simpático ovárico se encuentra activado (175). Por lo que en el caso de nuestras pacientes, en donde el componente simpático también se encuentra activado, los elevados niveles de NE plasmática materna activarían receptores $\alpha 1$ o β -adrenérgicos placentarios (237) acoplados a proteína G (238), y en consecuencia la vía de AMPK con el subsecuente aumento en la captación de glucosa placentaria, gracias al aumento en los niveles de GLUT4. Sin embargo, en tejido cardíaco de rata se ha observado que un aumento persistente en los niveles plasmáticos de NE produce una disminución en la expresión de receptores β -adrenérgicos y de NET (204), por tanto, la NE materna podría estar actuando vía receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos principalmente, como lo observado en líneas celulares de cardiomiocitos y adipocitos (239). Por otro lado, Mulder y colaboradores (240) demostraron que en cultivos de adipocitos de ratón, la activación de receptores β -adrenérgicos disminuye el transporte de glucosa al inhibir la translocación de GLUT4 hacia la membrana plasmática, al igual que en células de músculo esquelético de rata. Este conjunto de evidencia da cuenta de los diversos mecanismos que podrían estar involucrados en la regulación de los niveles placentarios de GLUT4 en los que participe la NE. Sea como fuere el mecanismo en la placenta SOP, la activación de AMPK por acción de la NE del plasma materno podría tener por objetivo, al igual que en corazón, evitar la posible isquemia placentaria producto del efecto vasoconstrictor de la NE a nivel local. Sin embargo, al presentar menor cantidad de NET en placenta este efecto compensatorio se vería comprometido, favoreciéndose sólo el aporte energético necesario para la supervivencia fetal a través de un mecanismo independiente de la acción insulínica (241), pese al efecto antagónico sobre AMPK que pudiera tener la hiperinsulinemia materna. Por otro lado, vemos que la acción de la NE materna sobre la placenta SOP estaría aumentando la síntesis *de novo* de GLUT4 en la cara materna placentaria, de modo similar a lo observado en BAT, posiblemente para asegurar la supervivencia fetal frente a un ambiente intrauterino adverso.

Al observar el nivel de cambio de la cantidad de GLUT4 respecto de la cantidad placentaria de NET, pudimos determinar en ambas caras placentarias una predominancia de GLUT4 por

sobre NET, resultado que sugeriría que en estas pacientes la mayor actividad simpática va en desmedro de la expresión placentaria de NET, pero favorecería la captación de glucosa. No obstante, en la cara fetal de la placenta estas diferencias se deben más bien a una menor cantidad de NET, más que a una mayor expresión de GLUT4.

En las pacientes SOP estudiadas podría cuestionarse la funcionalidad de GLUT4, a pesar de presentar mayores niveles placentarios respecto del control, ya que se ha sugerido que las alteraciones en la señalización insulínica obedecen a defectos río abajo de esta vía de señalización (242), por lo que, el control materno de la captación de glucosa estaría alterado en la mujer con SOP. No obstante, Dantas y colaboradores demostraron que, en tejido muscular, la translocación de GLUT4 es similar tanto en mujeres control como SOP (242). Aunque en esta tesis no determinamos la fracción de membrana de GLUT4 respecto de su *pool* intracelular con el fin de evaluar de manera semi-cuantitativa el transporte de glucosa placentario, el estudio de Dantas permite hacernos una idea de cómo se estaría dando este proceso en la placenta de mujeres con SOP y, que la mayor cantidad de GLUT4 placentario observada en estas pacientes sería directamente proporcional al transporte de glucosa hacia el feto. Junto con ello, el aumento de GLUT4 evidenciado sólo en la cara materna de la placenta sugiere que, en el control materno del transporte de glucosa la NE desempeñaría un papel fundamental. De acuerdo a nuestros resultados, los elevados niveles plasmáticos de NE repercutirían no sólo sobre el componente simpático de la placenta, reflejado en los niveles de NET, sino también sobre el componente metabólico. Estos resultados sugieren una estrecha relación entre mecanismos de acción metabólicos y simpáticos, tal como se ha observado en otros tejidos (236), los que se encontrarían profundamente alterados en mujeres con SOP. Sin embargo, la metformina se posicionaría como una herramienta terapéutica útil que a través de un mecanismo común es capaz de corregir tanto las alteraciones simpáticas como metabólicas en estas pacientes.

El feto crece y se desarrolla en un ambiente en el cual la disponibilidad de sustratos es limitada. Comparado con la madre, el feto está sujeto a una persistente hipoxia e hipoglicemia, y como consecuencia de las elevadas demandas metabólicas que debe suplir la grasa fetal en comparación con la deposición proteica, el tejido adiposo fetal crece con mayor

lentitud respecto del período postnatal (103). El estrés desencadena respuestas adaptativas importantes que permiten a un organismo hacer frente a un entorno cambiante. Sin embargo, cuando es prolongado o repetido, el estrés puede ser muy perjudicial. La liberación de catecolaminas es un evento inicial clave en respuesta a factores de estrés y es seguido por un aumento en la expresión de genes que codifican para las enzimas de síntesis de catecolaminas, que tiene lugar en la glándula adrenal y el locus *coeruleus* (243), el principal núcleo noradrenérgico del cerebro implicado en el control cardiovascular (211). Estudios en animales muestran que la disminución de la disponibilidad de glucosa hacia el feto produce hipoglicemia e hipoinsulinemia fetal junto con un retraso en el crecimiento (244). La hipoglicemia e hipoxia, por su parte, estimulan la secreción de catecolaminas en la glándula adrenal (133,245) y con ello la lipólisis fetal (103). Esta evidencia concuerda con los hallazgos obtenidos en modelos animales de IUGR, en donde los fetos son hipoglicémicos, hipoxémicos y presentan elevados niveles de NE plasmática (246). Nuestros resultados muestran que la placenta proveniente de mujeres con SOP sin tratamiento farmacológico presenta una alterada señalización insulínica, evidenciada por bajos niveles de IRS1 en la cara fetal y materna placentaria, pudiendo resultar en un alterado transporte de glucosa hacia el compartimento fetal. Pese a los bajos niveles de GLUT4 en la cara fetal de los 3 grupos experimentales, los elevados niveles de GLUT4 en la cara materna de la placenta SOP podrían reflejar un mecanismo compensatorio que intente asegurar la supervivencia del concepto pese a lo adverso de su ambiente. Así, de manera similar a los modelos animales de androgenización o IUGR, la hipoglicemia fetal activaría la secreción de NE en la glándula adrenal fetal, conduciendo a elevados niveles plasmáticos de NE, los cuales a su vez inducirían respuestas adaptativas a nivel del tejido adiposo fetal, cuya alterada identidad fenotípica favorecería la obesidad e insulino resistencia en la adultez. Estas respuestas adaptativas fetales serían producto de una programación efectuada conjuntamente por los elevados niveles de NE, insulina y andrógenos en la madre en etapas tempranas del desarrollo, cuya acción sinérgica conduce a un desarrollo placentario alterado.

5.4. Metformina: acción pleiotrópica en la embarazada con SOP

Estudios siguieren que la metformina mejora la función reproductiva de pacientes con SOP y posiblemente beneficie la salud de estas pacientes en el largo plazo. La metformina puede actuar indirectamente al reducir los niveles sistémicos de insulina y directamente sobre la función ovárica y adrenal al reducir la actividad del CYP17 con la consecuente reducción en la producción de andrógenos. El tratamiento con metformina permite a estas pacientes aumentar la tasa de ovulación y disminuir la tasa de abortos espontáneos, permitiendo a estas pacientes lograr un embarazo. Una vez logrado el embarazo, el tratamiento con metformina durante este período permite disminuir la incidencia de preeclampsia, diabetes gestacional, hipertensión inducida por el embarazo y la mortalidad neonatal (247). En vista de los efectos favorables de la metformina sobre eventos trombóticos en la población diabética, parece factible que la disfunción microvascular y acontecimientos posteriores río abajo podrían mejorarse en pacientes con SOP que sean tratadas con metformina durante el embarazo (247). La metformina es un fármaco con un alto perfil de seguridad ya que no existe evidencia de efectos teratogénicos en animales o humanos (27). Las pacientes con SOP que han sido tratadas con metformina durante el embarazo ganan menos peso durante este período en comparación al grupo control, lo que se piensa podría estar asociado con beneficios a largo plazo sobre la salud de estas pacientes. Esto estaría en concordancia con lo observado en nuestro grupo de pacientes tratadas, quienes presentaron un peso final aproximado de 5 Kg menos respecto del control. Otra observación importante, es que el tratamiento con metformina no produce hipoglicemia ni en la madre ni en el feto, en comparación con pacientes tratadas con insulina durante el embarazo (247).

Las acciones antiinflamatorias de la metformina podrían tener efectos benéficos durante el embarazo, tanto para la madre como para el feto, ya que la moderación de la disfunción metabólica e inflamación produciría cambios en el desarrollo y función placentaria, reduciría la probabilidad de activación endotelial vascular y potencialmente reduciría la insulino resistencia fetal. La metformina cruza la placenta, vía p-glicoproteína, OCT2, OCT3 y otros transportadores presentes en el sinciotrofoblasto (85,248), cuantificándose niveles terapéuticos de este fármaco en sangre de cordón umbilical, por tanto, es probable que la metformina ejerza algún efecto sobre el metabolismo placentario y fetal (247). La familia de

transportadores OCT, a la que pertenece NET, se divide en 3 categorías principales: OCT1 y 2 poseen una localización restringida principalmente a órganos excretores como hígado y riñón y OCT3 posee una amplia distribución incluyendo músculo esquelético, corazón, cerebro y placenta. Además de poseer una función depuradora para aminas y xenobióticos, estos transportadores formarían parte del Uptake-2, encargado de la remoción sistémica de monoaminas en tejidos periféricos que poseen innervación simpática. Chen y colaboradores (249) demostraron que OCT3 modula positivamente el efecto farmacológico de la metformina principalmente en músculo esquelético. Esto no quiere decir que esta modulación se restrinja sólo a este tejido, ya que en este estudio no se emplearon placentas. Además, evaluaron el significado funcional de mutaciones en OCT3 en voluntarios de diversas etnias y cómo éstas repercutirían en su función de transporte, expresión y localización subcelular. Algunas de estas variantes genéticas tuvieron repercusiones en el transporte de metformina y de catecolaminas, por modificaciones en la estructura proteica del transportador más que por alteraciones en la distribución subcelular del mismo (249). Por otro lado, estudios *in vitro* de Schlessinger y colaboradores (248) identificaron a la metformina como un nuevo ligando de NET que no presenta efectos inhibitorios sobre su actividad de transporte. Por lo que, si extrapolamos estos resultados al presente estudio podríamos sugerir que NET potenciaría los efectos de la metformina sobre la interface materno-placentaria y que la metformina a su vez modularía la expresión de NET en la placenta, tal como lo observado en nuestro trabajo.

Es importante considerar que el aclaramiento renal de la metformina aumenta durante la mitad y la última etapa del embarazo, encontrándose niveles casi indetectables en sangre de cordón umbilical al momento del parto (85), por lo que sus efectos programadores tendrían lugar en estadios tempranos de la organogénesis fetal, posiblemente durante los días 20-32, ventana de tiempo crítica en este proceso de desarrollo (250). El seguimiento de hijos de madres con SOP expuestos a metformina durante la gestación muestra que estos infantes presentan una mayor circunferencia en la parte superior del brazo, grandes bíceps y tejido subescapular, sugiriendo que la exposición a metformina *in utero* conduce a un cambio de los depósitos de grasa visceral hacia sitios subcutáneos, lo que tiene importantes implicaciones para el desarrollo de resistencia a la insulina en el futuro (247). Ali y colaboradores (232) plantearon una hipótesis que indica que en casos de resistencia a la

insulina se observa una movilización de depósitos de grasa subcutánea hacia la grasa visceral, por el contrario, en el caso de los niños expuestos a metformina *in utero* esta distribución es inversa (247) y por tanto serían menos insulino resistentes en el futuro. Finalmente, los niveles de metformina en la leche materna son muy bajos, similar a lo encontrado en sangre de cordón umbilical al momento del parto, por tanto, la exposición fetal a la metformina es considerada insignificante y no está relacionada con anomalías en los niveles de glucosa en infantes, haciendo seguro su uso antes, durante y después del embarazo (85).

Un gran cuerpo de evidencia ha mostrado que una de las principales dianas moleculares de la metformina es la AMPK, cuya activación proporciona una explicación unificada para los efectos pleiotrópicos de este fármaco (34). La AMPK es un regulador central y periférico de mecanismos de homeostasis energética, que interviene en el metabolismo de lípidos, proteínas y carbohidratos. Este sensor metabólico regula también la función ovárica, al regular la esteroidogénesis en las células de la granulosa y la maduración de los ovocitos, en varias especies. Estos datos sugieren que esta cinasa puede jugar un papel importante en la interfaz entre reproducción y metabolismo energético. Algunas hormonas metabólicas tales como la leptina, adiponectina, resistina y grelina, regulan la función reproductiva a nivel central y de ovario, vía AMPK. Por lo que, la desregulación de este sistema podría ser la causa de ciertas enfermedades como el SOP, comúnmente tratada con metformina, un agente farmacológico activador de AMPK (251). Por otro lado, estudios *in vitro* e *in vivo* muestran que el tratamiento con metformina inhibe la cadena respiratoria mitocondrial y activa a AMPK vía formación de especies reactivas del nitrógeno con una posterior acción de la vía de señalización PI3K (252). Sin embargo, las concentraciones de especies reactivas del nitrógeno generadas a concentraciones de metformina de relevancia clínica son sub-tóxicas y no contribuyen al estrés oxidativo causado por una hiperglicemia (252). En este mismo estudio se determinó que la sobreexpresión de UCP1, proteína que bloquea la transferencia de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial y con ello la formación de ROS, atenúa la activación de AMPK estimulada por metformina, ya que las ROS también tienen la capacidad de activar a AMPK (252). Por otro lado, estudios *in vitro* han mostrado que la NE inhibe la actividad de NET vía estrés de retículo por acción de especies reactivas del oxígeno (253), estrés oxidativo que se encuentra aumentado en mujeres con SOP (85) y que podría

explicar la disminución de los niveles de NET en la placenta de las pacientes no tratadas con metformina durante el embarazo, por activación de AMPK. Adicionalmente, es posible sugerir que la NE materna estaría conduciendo a respuestas adaptativas, vía activación de AMPK, que favorezcan la supervivencia fetal y que explicarían lo observado en esta tesis para los aumentados niveles de GLUT4 en la cara materna placentaria de mujeres con SOP sin tratamiento farmacológico. Sin embargo, gracias al tratamiento con metformina es que se logra equilibrar los disturbios metabólicos en la triada madre-placenta-feto, ejerciendo una acción programadora positiva que permite poner fin al ciclo madre SOP-hijos SOP, ya que la sola activación de AMPK por acción de la NE materna o las especies reactivas del oxígeno, en las pacientes no tratadas, no es suficiente para mejorar las alteraciones metabólicas y simpáticas observadas a nivel plasmático y placentario.

Reportes recientes sugieren que la diferenciación trofoblástica puede ser regulada por la activación de AMPK y una reducción en sus niveles produciría alteraciones en la morfología celular, tasa de crecimiento y transporte de nutrientes (254). Aunque la activación de AMPK tiene lugar frente a distintos estresores, como así también por acción de la NE sobre sus receptores y por acción de la metformina (255), es probable que en la mujer SOP la activación de AMPK se encuentre alterada (251), dado el aumento en los niveles de GLUT4 en la cara materna de la placenta. En condiciones patológicas como enfermedades neurodegenerativas y cáncer (256), AMPK se encuentra anormalmente activada (257), dando lugar a depósitos proteicos o una supervivencia celular aumentada. Basados en esta evidencia, es posible sugerir que en la mujer SOP existe una activación anormal de AMPK en placenta, evidenciada por el aumento en los niveles de GLUT4 en la cara materna de la placenta y una disminución en los niveles de NET en ambas caras placentarias. Sin embargo, la regulación de la activación de este sensor metabólico maestro por acción de la metformina, permitiría mejorar gran parte de las alteraciones placentarias presentes en mujeres con SOP, reduciendo así la alta prevalencia de enfermedades gestacionales durante el embarazo.

Al analizar los niveles plasmáticos de NE en las pacientes tratadas con metformina durante el embarazo, es alentador sugerir que la metformina podría ser responsable de no sólo mejorar los perfiles metabólicos de las pacientes estudiadas en este trabajo, sino también de la

regulación de la actividad del sistema nervioso simpático. Esta última sugerencia ha sido previamente documentada por diversos estudios. En pacientes hipertensos a quienes se les administró metformina se observó una disminución en los valores de presión sanguínea, frecuencia cardíaca y actividad nerviosa simpática (197,198). Petersen y colaboradores (197), mostraron que en un modelo de ratas hipertensas el tratamiento crónico con metformina previene la hipertensión al inhibir la actividad nerviosa simpática periférica gracias a su acción a nivel de sistema nervioso central. La estructura química de la metformina (dimetilbiguanida) está relacionada con la estructura química del agonista del receptor tipo 3 de serotonina, bifenilbiguanida, quien produce una respuesta vagal mediada por una inhibición simpática (197). Por lo que el mecanismo mediante el cual la metformina pudiera estar mediando estos efectos a nivel de sistema nervioso central podría ser similar a la bifenilbiguanida. Por otro lado, Giugliano y colaboradores (258) encontraron que el tratamiento por 12 semanas con metformina redujo significativamente la presión arterial en mujeres obesas e hipertensas, la que estuvo asociada con una concentración plasmática de NE disminuida y un menor índice de masa ventricular izquierda. Si ocurriese lo mismo en el tejido placentario, sería un efecto inesperado pero sorprendente de la metformina. En cualquier caso, la metformina tiene muchos efectos que están relacionados con la actividad nerviosa simpática en pacientes con SOP (6), principalmente a nivel de metabolismo y hormonas esteroidales.

Cuando observamos el nivel de cambio de la cantidad de GLUT4 respecto de NET, vemos que al igual que en el grupo de mujeres con SOP sin tratamiento farmacológico, existe una predominancia de GLUT4 por sobre NET en el grupo de pacientes tratadas con metformina. Sin embargo, los mecanismos involucrados en tal aumento involucrarían vías diferentes, ya que el tratamiento con metformina disminuye los niveles plasmáticos de NE en la madre y junto con ello aumenta los niveles de NET en placenta.

Otro hallazgo importante en esta tesis fue la completa recuperación placentaria de los niveles de proteína NET en el grupo de mujeres que fueron tratadas con metformina. Este hallazgo puede ser el resultado, ya sea, de una disminución en los niveles plasmáticos de NE inducida por metformina debida a una acción directa en los nervios simpáticos; o sobre la glándula

adrenal gracias a la disminución en los niveles de andrógenos y/o hiperinsulinemia; o al ejercer un efecto directo sobre la expresión de NET a nivel placentario. La primera de estas afirmaciones es sustentada por los hallazgos de un estudio realizado por Salvesen y colaboradores (200), en el que se demostró que el tratamiento farmacológico con metformina a mujeres con SOP embarazadas, disminuyó la impedancia de la arteria uterina entre las 12 y 19 semanas de gestación, lo cual se correlaciona directamente con una reducción en la prevalencia de preeclampsia e IURG. Cualquiera sea el caso, se sugiere que la aplicación de un tratamiento farmacológico es ventajosa, ya que ha demostrado ser una estrategia farmacológica útil y conveniente para la prevención de complicaciones durante el embarazo en mujeres con SOP (30,31). Un estudio prospectivo observacional demostró que el principal beneficio de continuar el tratamiento farmacológico con metformina en mujeres con SOP durante el embarazo, fue evitar la obesidad y el deterioro en la sensibilidad a la insulina durante este período (259). Este estudio señala además que sin un tratamiento farmacológico con metformina durante el embarazo, las mujeres con SOP son más propensas a desarrollar preeclampsia y diabetes gestacional. Otros beneficios del tratamiento de estas pacientes con metformina durante el embarazo fueron la disminución en los niveles plasmáticos de testosterona, reduciendo el riesgo de virilización fetal (259). Elevados niveles de andrógenos en la adultez se han asociado a una previa preeclampsia. En un reporte de caso, el tratamiento con metformina redujo notablemente los niveles de andrógenos en una mujer embarazada hiperandrogénica, para prevenir la masculinización de fetos femeninos (18). Sin embargo, Vanky y colaboradores (18) mostraron que el tratamiento con metformina no afectó los niveles plasmáticos de andrógenos en mujeres con SOP tratadas farmacológicamente durante el embarazo. Por el contrario, la Marca y colaboradores (260) mostraron que en mujeres con SOP el tratamiento con metformina fue capaz de reducir la esteroidogénesis adrenal, apoyando la hipótesis de que elevados niveles de insulina asociados con el SOP pueden causar un aumento en los niveles plasmáticos de andrógenos de origen adrenal.

Como ya se ha comentado en apartados anteriores, las pacientes con SOP presentan una alterada función mitocondrial, producto de una alterada expresión de las proteínas UCP relacionada con insulino resistencia, ya que puede ser corregida al tratar a estas pacientes con sensibilizadores de la insulina (104,261). Estudios en células endoteliales de aorta de bovino,

muestran que la sobreexpresión de UCP1 inhibe la activación de AMPK por acción de la metformina, al disminuir la producción de ROS (252). Sin embargo, otros estudios en células endoteliales umbilicales humanas o murinas, mostraron que el tratamiento con metformina aumenta la expresión de UCP2 en estas células inhibiendo la producción de ROS y la nitración de ciertas proteínas, frente a elevados niveles de glucosa (262). Estudios *in vitro* han demostrado que la hiperglicemia induce la producción de ROS en pacientes diabéticos, la que puede ser abolida por inhibidores del metabolismo mitocondrial y/o la sobreexpresión de UCP1 o de la enzima manganeso superóxido dismutasa (263). Además, la normalización de la producción mitocondrial de ROS por cada uno de estos agentes impide la activación inducida por glucosa de la proteína cinasa C, la formación de productos de glicación avanzada y la acumulación de sorbitol en células endoteliales vasculares, que son conocidas alteraciones involucradas en el desarrollo de complicaciones de la diabetes (263). Así, el uso de agentes hipoglucemiantes permite prevenir estas complicaciones, destacando la metformina por sobre las sulfonilureas e insulina. Dado que la metformina activa la vía de señalización de AMPK, estimula la biogénesis y función mitocondrial al actuar sobre factores de transcripción involucrados en la respiración celular y en la expresión de enzimas antioxidantes como manganeso superóxido dismutasa, y con ello disminuye la producción de ROS inducida por hiperglucemia (263). Por otro lado, en ovario de pacientes con SOP se ha observado una mayor expresión de UCP2 y de la enzima CYP11A1, alteraciones que podrían dar lugar al perturbado desarrollo folicular en pacientes con SOP (261). Estas discrepancias reflejan una acción tejido-específica diferencial de la metformina a nivel mitocondrial y que involucra isoformas diferentes de las UCP. Por lo tanto, es probable que la acción de la metformina sobre la expresión de las UCP produzca una disminución de aquellas isoformas que alteran los procesos fisiológicos y favorezca la expresión de aquellas isoformas que permitan restablecer la homeostasis de los procesos fisiológicos que puedan estar alterados, como lo observado a nivel de tejido muscular de pacientes con SOP y diabetes tipo 2 (104).

Aunque los mecanismos mediante los cuales la metformina mejora las alteraciones metabólicas, neuroendocrinas y simpáticas en pacientes con SOP son muy variados y poco conocidos, es claro que este fármaco es una herramienta terapéutica útil para el manejo de

las alteraciones hormonales y metabólicas que producen enfermedades gestacionales y otras complicaciones del embarazo en este grupo de pacientes. En las pacientes con SOP de esta tesis podemos observar que el mejoramiento de las alteraciones metabólicas repercute directamente sobre las alteraciones del componente simpático, dando cuenta de una estrecha relación entre ambos sistemas en la madre, sin embargo, es probable que las respuestas adaptativas encontradas en la descendencia de las mujeres con SOP respondan a una activación simpática inicial frente a un exceso de andrógenos, insulina y, como lo observado en esta tesis, frente a elevados niveles de NE en el plasma materno, dando lugar a un desarrollo placentario alterado. Las respuestas adaptativas placentarias podrían generar profundas alteraciones en tejidos sensibles a la insulina y otros sistemas homeostáticos del concepto, dependiendo de la etapa del desarrollo fetal en la que actúen, con el consecuente desarrollo de insulino resistencia, obesidad e infertilidad en la adultez. Afortunadamente, nuestros resultados nos permiten tener una visión optimista, ya que el fenotipo SOP podría ser manipulado *in utero* gracias al tratamiento con metformina.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten sugerir que en las mujeres con SOP embarazadas, el aumento en los niveles plasmáticos de NE en estadios tempranos de la gestación en combinación con la disminución en los niveles placentarios de NET, podrían atenuar la capacidad de este transportador para depurar la NE desde la circulación fetal y, por tanto, aumentar la exposición fetal a NE con consecuencias a largo plazo similares a las observadas en modelos animales. El mejoramiento de las alteraciones simpáticas observadas en el grupo de pacientes tratadas con metformina, nos permite pensar que dichas alteraciones se encuentran estrechamente relacionadas al componente metabólico a través de mecanismos aún desconocidos. Es probable que el hiperandrogenismo e hiperinsulinemia presente en la embarazada SOP, asociados a respuestas de estrés como un aumentado tono simpático evidenciado en los resultados de este trabajo, podrían ejercer un efecto programador conjunto sobre las respuestas de estrés y procesos de regulación neuroendocrina en la descendencia de estas pacientes, tal como lo observado en modelos de androgenización fetal o IUGR, afectando la función reproductiva y otros eventos fisiológicos a través de cambios en la homeostasis corporal, creando *in utero* un sinergismo entre activación simpática por estrés e insulino resistencia, al que en el transcurso de los años se sumará el componente hiperandrogénico dando lugar a un nuevo fenotipo SOP. Dicho efecto programador no estaría limitado a la descendencia inmediata, sino que podría tener un efecto transgeneracional si las modificaciones epigenéticas son estables y se mantienen en la línea germinal. Finalmente, la figura 10 propone un esquema que explicaría las alteraciones plasmáticas y placentarias observadas en pacientes con SOP durante el embarazo y cómo la metformina se perfila como una herramienta terapéutica útil que permite corregir dichas alteraciones.

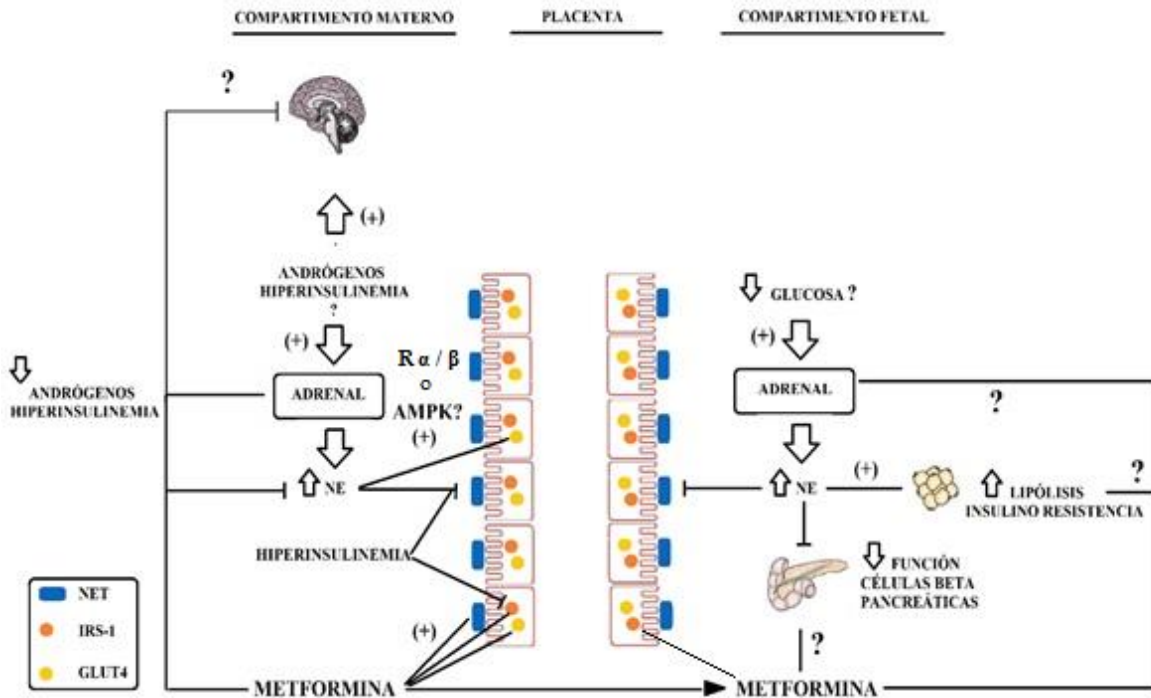


Figura 10. **Alteraciones plasmáticas y placentarias observadas en pacientes con SOP embarazadas.** En el compartimento materno, la hiperinsulinemia e hiperandrogenemia en la mujer SOP podría actuar a nivel central o adrenal con el fin de aumentar el tono simpático en estas pacientes en estadios tempranos del embarazo, evidenciado por elevados niveles de NE plasmática a la semana 24 de gestación, dando lugar a respuestas adaptativas placentarias como disminuidos niveles de NET e IRS1 y aumentados niveles de GLUT4, vía AMPK o receptores $\alpha 1/ \beta$ -adrenérgicos. La hiperinsulinemia también podría participar en la disminución de los niveles placentarios de NET al regular negativamente su expresión. Por su parte, los aumentados niveles de GLUT4 podrían dar cuenta de mecanismos compensatorios orientados a la supervivencia fetal. El tratamiento con metformina permite corregir las alteraciones simpáticas y metabólicas en estas pacientes al disminuir los niveles plasmáticos de NE y aumentar los niveles placentarios de NET, IRS1 y GLUT4, a través de diversos mecanismos como: 1. una posible acción vagal a nivel central y, 2. por acción sobre dianas moleculares como AMPK y mitocondrias, enfocada en la corrección de la insulino resistencia e hiperandrogenismo, evitando una programación fetal por andrógenos. En el compartimento fetal, dada la disminución en los niveles de IRS1 y un alterado patrón de expresión de GLUT4 en la placenta, tendría lugar una hipoglicemia fetal con el consecuente aumento en la producción de NE en la adrenal fetal que, junto a una reducción en su aclaramiento por una disminución en los niveles de NET, induciría respuestas adaptativas sobre la función de las células β pancreáticas, adrenal y el tejido adiposo fetal, que darían lugar a un fenotipo SOP en la adultez. Sin embargo, el tratamiento con metformina permite restaurar los niveles placentarios de GLUT4 e IRS1, pudiendo paliar hasta cierto punto la hipoglicemia fetal con la consecuente activación simpática. Es probable que este fármaco también induzca respuestas adaptativas sobre el metabolismo fetal y la función neuroendocrina como lo observado en hijos de mujeres con SOP tratadas con metformina durante el embarazo. AMPK: 5' AMP-activated protein kinase; GLUT4: Glucose transporter type 4; IRS1: Insulin Receptor Substrate 1; NE: Norepinephrine; NET: Norepinephrine transporter; SOP: mujeres embarazadas con Síndrome de Ovario Poliquístico sin tratamiento con metformina durante el embarazo.

7. PROYECCIONES DEL TRABAJO

Consideramos relevante hacer posteriores estudios con una mayor cantidad de pacientes para aumentar la robustez de nuestros resultados. Se hace necesario obtener muestras de plasma de otras edades gestacionales con la finalidad de construir una cinética de los cambios en los niveles plasmáticos de NE propios del embarazo y de la condición SOP. Junto con ello, se debe analizar el plasma de cordón umbilical en las mismas ventanas de tiempo antes señaladas, para evaluar la repercusión de la aumentada actividad simpática de las madres SOP sobre los niveles de catecolaminas circulantes en el feto. Finalmente, se deben efectuar mediciones de otros marcadores hormonales en estas pacientes antes y durante el embarazo y cómo podrían correlacionarse con los niveles plasmáticos de NE.

En cuanto a los resultados obtenidos con el tratamiento farmacológico, se abren las puertas para el estudio de otros posibles mecanismos mediante los cuales la metformina ejerce su acción terapéutica. Se hace necesario dilucidar al menos en parte, el mecanismo mediante el cual el tratamiento con metformina permite restaurar los niveles de NET en placenta y estudiar si existen correlaciones entre la expresión de NET y las alteraciones simpático/metabólicas presentes en estas pacientes durante el embarazo.

Finalmente, para determinar un posible efecto programador de la metformina se debe evaluar la actividad simpática de los hijos de las mujeres con SOP tratadas y no tratadas con metformina durante el embarazo, junto con un perfil hormonal detallado. Posteriormente determinar si existen correlaciones entre estas mediciones.

8. REFERENCIAS

1. Boomsma CM, Eijkemans MJ, Hughes EG, Visser GH, Fauser BC, Macklon NS. A meta-analysis of pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update*. 2006;12(6):673-683.
2. Greiner M, Paredes A, Araya V, Lara HE. Role of stress and sympathetic innervation in the development of polycystic ovary syndrome. *Endocrine*. 2005;28(3):319-324.
3. Lara HE, Dorfman M, Venegas M, Luza SM, Luna SL, Mayerhofer A, Guimaraes MA, Rosa ESAA, Ramirez VD. Changes in sympathetic nerve activity of the mammalian ovary during a normal estrous cycle and in polycystic ovary syndrome: Studies on norepinephrine release. *Microsc Res Tech*. 2002;59(6):495-502.
4. Sverrisdottir YB, Mogren T, Kataoka J, Janson PO, Stener-Victorin E. Is polycystic ovary syndrome associated with high sympathetic nerve activity and size at birth? *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;294(3):E576-581.
5. Paredes A, Galvez A, Leyton V, Aravena G, Fiedler JL, Bustamante D, Lara HE. Stress promotes development of ovarian cysts in rats: the possible role of sympathetic nerve activation. *Endocrine*. 1998;8(3):309-315.
6. Lansdown A, Rees DA. The sympathetic nervous system in polycystic ovary syndrome: a novel therapeutic target? *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012;77(6):791-801.
7. Heider U, Pedal I, Spanel-Borowski K. Increase in nerve fibers and loss of mast cells in polycystic and postmenopausal ovaries. *Fertil Steril*. 2001;75(6):1141-1147.
8. Garcia-Rudaz C, Armando I, Levin G, Escobar ME, Barontini M. Peripheral catecholamine alterations in adolescents with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1998;49(2):221-228.
9. Geisthovel F, Rabe T. The ESHRE/ASRM consensus on polycystic ovary syndrome (PCOS)--an extended critical analysis. *Reprod Biomed Online*. 2007;14(4):522-535.
10. Kolodziejczyk B, Duleba AJ, Spaczynski RZ, Pawelczyk L. Metformin therapy decreases hyperandrogenism and hyperinsulinemia in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2000;73(6):1149-1154.
11. Pasquali R, Stener-Victorin E, Yildiz BO, Duleba AJ, Hoeger K, Mason H, Homburg R, Hickey T, Franks S, Tapanainen JS, Balen A, Abbott DH, Diamanti-Kandarakis E, Legro RS. PCOS Forum: research in polycystic ovary syndrome today and tomorrow. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011;74(4):424-433.
12. Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(6):2745-2749.
13. Asuncion M, Calvo RM, San Millan JL, Sancho J, Avila S, Escobar-Morreale HF. A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(7):2434-2438.
14. Teede H, Deeks A, Moran L. Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan. *BMC Med*. 2010;8:41.
15. Casarini L, Brigante G. The polycystic ovary syndrome evolutionary paradox: a genome-wide association studies-based, in silico, evolutionary explanation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(11):E2412-2420.

16. Azziz R, Dumesic DA, Goodarzi MO. Polycystic ovary syndrome: an ancient disorder? *Fertil Steril*. 2011;95(5):1544-1548.
17. Shannon M, Wang Y. Polycystic ovary syndrome: a common but often unrecognized condition. *J Midwifery Womens Health*. 2012;57(3):221-230.
18. Vanky E, Salvesen KA, Heimstad R, Fougner KJ, Romundstad P, Carlsen SM. Metformin reduces pregnancy complications without affecting androgen levels in pregnant polycystic ovary syndrome women: results of a randomized study. *Hum Reprod*. 2004;19(8):1734-1740.
19. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Janssen OE, Legro RS, Norman RJ, Taylor AE, Witchel SF, Task Force on the Phenotype of the Polycystic Ovary Syndrome of The Androgen E, Society P. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril*. 2009;91(2):456-488.
20. Codner E, Iniguez G, Villarroel C, Lopez P, Soto N, Sir-Petermann T, Cassorla F, Rey RA. Hormonal profile in women with polycystic ovarian syndrome with or without type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(12):4742-4746.
21. Moran L, Teede H. Metabolic features of the reproductive phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update*. 2009;15(4):477-488.
22. Escobar-Morreale HF, Luque-Ramirez M, Gonzalez F. Circulating inflammatory markers in polycystic ovary syndrome: a systematic review and metaanalysis. *Fertil Steril*. 2011;95(3):1048-1058 e1041-1042.
23. Moran LJ, Misso ML, Wild RA, Norman RJ. Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2010;16(4):347-363.
24. Diamanti-Kandarakis E, Christakou CD, Kandaraki E, Economou FN. Metformin: an old medication of new fashion: evolving new molecular mechanisms and clinical implications in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2010;162(2):193-212.
25. Barbieri RL. Metformin for the treatment of polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol*. 2003;101(4):785-793.
26. Palomba S, Falbo A, Zullo F, Orio F, Jr. Evidence-based and potential benefits of metformin in the polycystic ovary syndrome: a comprehensive review. *Endocr Rev*. 2009;30(1):1-50.
27. Thessaloniki EA-SPCWG. Consensus on infertility treatment related to polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 2008;23(3):462-477.
28. Glueck CJ, Bornovali S, Pranikoff J, Goldenberg N, Dharashivkar S, Wang P. Metformin, pre-eclampsia, and pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome. *Diabet Med*. 2004;21(8):829-836.
29. Velazquez EM, Mendoza S, Hamer T, Sosa F, Glueck CJ. Metformin therapy in polycystic ovary syndrome reduces hyperinsulinemia, insulin resistance, hyperandrogenemia, and systolic blood pressure, while facilitating normal menses and pregnancy. *Metabolism*. 1994;43(5):647-654.
30. Iavazzo C, Vitoratos N. Polycystic ovarian syndrome and pregnancy outcome. *Arch Gynecol Obstet*. 2010;282(3):235-239.
31. Villarroel AC, Echiburu B, Riesco V, Maliqueo M, Carcamo M, Hitschfeld C, Sanchez F, del Solar MP, Sir-Petermann T. [Polycystic ovary syndrome and pregnancy: clinical experience]. *Rev Med Chil*. 2007;135(12):1530-1538.

32. Bao B, Azmi AS, Ali S, Zaiem F, Sarkar FH. Metformin may function as anti-cancer agent via targeting cancer stem cells: the potential biological significance of tumor-associated miRNAs in breast and pancreatic cancers. *Ann Transl Med.* 2014;2(6):59.
33. Rena G, Pearson ER, Sakamoto K. Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? *Diabetologia.* 2013;56(9):1898-1906.
34. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* 2001;108(8):1167-1174.
35. Palomba S, Russo T, Orio F, Jr., Falbo A, Manguso F, Cascella T, Tolino A, Carmina E, Colao A, Zullo F. Uterine effects of metformin administration in anovulatory women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2006;21(2):457-465.
36. Glueck CJ, Goldenberg N, Pranikoff J, Loftspring M, Sieve L, Wang P. Height, weight, and motor-social development during the first 18 months of life in 126 infants born to 109 mothers with polycystic ovary syndrome who conceived on and continued metformin through pregnancy. *Hum Reprod.* 2004;19(6):1323-1330.
37. Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J.* 2000;348 Pt 3:607-614.
38. Davis BJ, Xie Z, Viollet B, Zou MH. Activation of the AMP-activated kinase by antidiabetes drug metformin stimulates nitric oxide synthesis in vivo by promoting the association of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase. *Diabetes.* 2006;55(2):496-505.
39. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet.* 1998;352(9131):854-865.
40. Riahiinejad S, Mirdamadi A, Alizadeh E. Effects of Metformin Treatment on Homocysteine Levels and Metabolic Parameters of Women With Polycystic Ovary Syndrome. *J Family Reprod Health.* 2015;9(4):172-176.
41. Teede HJ, Meyer C, Hutchison SK, Zoungas S, McGrath BP, Moran LJ. Endothelial function and insulin resistance in polycystic ovary syndrome: the effects of medical therapy. *Fertil Steril.* 2010;93(1):184-191.
42. Wulffele MG, Kooy A, de Zeeuw D, Stehouwer CD, Gansevoort RT. The effect of metformin on blood pressure, plasma cholesterol and triglycerides in type 2 diabetes mellitus: a systematic review. *J Intern Med.* 2004;256(1):1-14.
43. Prapas N, Karkanaki A, Prapas I, Kalogiannidis I, Katsikis I, Panidis D. Genetics of polycystic ovary syndrome. *Hippokratia.* 2009;13(4):216-223.
44. Franks S, McCarthy MI, Hardy K. Development of polycystic ovary syndrome: involvement of genetic and environmental factors. *Int J Androl.* 2006;29(1):278-285; discussion 286-290.
45. Strauss JF, 3rd. Some new thoughts on the pathophysiology and genetics of polycystic ovary syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;997:42-48.
46. Franks S, Berga SL. Does PCOS have developmental origins? *Fertil Steril.* 2012;97(1):2-6.
47. Bremer AA. Polycystic ovary syndrome in the pediatric population. *Metab Syndr Relat Disord.* 2010;8(5):375-394.

48. Xita N, Tsatsoulis A. Review: fetal programming of polycystic ovary syndrome by androgen excess: evidence from experimental, clinical, and genetic association studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(5):1660-1666.
49. Abbott DH, Tarantal AF, Dumesic DA. Fetal, infant, adolescent and adult phenotypes of polycystic ovary syndrome in prenatally androgenized female rhesus monkeys. *Am J Primatol.* 2009;71(9):776-784.
50. Nohara K, Waraich RS, Liu S, Ferron M, Waget A, Meyers MS, Karsenty G, Burcelin R, Mauvais-Jarvis F. Developmental androgen excess programs sympathetic tone and adipose tissue dysfunction and predisposes to a cardiometabolic syndrome in female mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013;304(12):E1321-1330.
51. Stener-Victorin E, Jedel E, Manneras L. Acupuncture in polycystic ovary syndrome: current experimental and clinical evidence. *J Neuroendocrinol.* 2008;20(3):290-298.
52. Nakamura Y. Treatment of polycystic ovary syndrome: an overview. *Horm Res.* 1990;33 Suppl 2:31.
53. Lara HE, Ferruz JL, Luza S, Bustamante DA, Borges Y, Ojeda SR. Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. *Endocrinology.* 1993;133(6):2690-2695.
54. Barria A, Leyton V, Ojeda SR, Lara HE. Ovarian steroidal response to gonadotropins and beta-adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation. *Endocrinology.* 1993;133(6):2696-2703.
55. Stener-Victorin E, Lundeberg T, Waldenstrom U, Manni L, Aloe L, Gunnarsson S, Janson PO. Effects of electro-acupuncture on nerve growth factor and ovarian morphology in rats with experimentally induced polycystic ovaries. *Biol Reprod.* 2000;63(5):1497-1503.
56. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev.* 1997;18(6):774-800.
57. Caro JF. Clinical review 26: Insulin resistance in obese and nonobese man. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991;73(4):691-695.
58. Dunaif A, Segal KR, Shelley DR, Green G, Dobrjansky A, Licholai T. Evidence for distinctive and intrinsic defects in insulin action in polycystic ovary syndrome. *Diabetes.* 1992;41(10):1257-1266.
59. Dunaif A, Xia J, Book CB, Schenker E, Tang Z. 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.* 1995;96(2):801-810.
60. Ehrmann DA, Sturis J, Byrne MM, Karrison T, Rosenfield RL, Polonsky KS. Insulin secretory defects in polycystic ovary syndrome. Relationship to insulin sensitivity and family history of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1995;96(1):520-527.
61. De Leo V, La Marca A, Orvieto R, Morgante G. Effect of metformin on insulin-like growth factor (IGF) I and IGF-binding protein I in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(4):1598-1600.
62. Robinson S, Kiddy D, Gelding SV, Willis D, Niththyananthan R, Bush A, Johnston DG, Franks S. The relationship of insulin insensitivity to menstrual pattern in women with hyperandrogenism and polycystic ovaries. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1993;39(3):351-355.

63. Kahn CR. Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes*. 1994;43(8):1066-1084.
64. Adashi EY. Intraovarian regulation: the proposed role of insulin-like growth factors. *Ann N Y Acad Sci*. 1993;687:10-12.
65. Giordano G, Barreca A, Minuto F. Growth factors in the ovary. *J Endocrinol Invest*. 1992;15(9):689-707.
66. Erickson GF, Magoffin DA, Cragun JR, Chang RJ. The effects of insulin and insulin-like growth factors-I and -II on estradiol production by granulosa cells of polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990;70(4):894-902.
67. Garzo VG, Dorrington JH. Aromatase activity in human granulosa cells during follicular development and the modulation by follicle-stimulating hormone and insulin. *Am J Obstet Gynecol*. 1984;148(5):657-662.
68. Suikkari AM, Koivisto VA, Rutanen EM, Yki-Jarvinen H, Karonen SL, Seppala M. Insulin regulates the serum levels of low molecular weight insulin-like growth factor-binding protein. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988;66(2):266-272.
69. Suikkari AM, Koivisto VA, Koistinen R, Seppala M, Yki-Jarvinen H. Dose-response characteristics for suppression of low molecular weight plasma insulin-like growth factor-binding protein by insulin. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989;68(1):135-140.
70. Suikkari AM, Jalkanen J, Koistinen R, Butzow R, Ritvos O, Ranta T, Seppala M. Human granulosa cells synthesize low molecular weight insulin-like growth factor-binding protein. *Endocrinology*. 1989;124(2):1088-1090.
71. Koistinen R, Kalkkinen N, Huhtala ML, Seppala M, Bohn H, Rutanen EM. Placental protein 12 is a decidual protein that binds somatomedin and has an identical N-terminal amino acid sequence with somatomedin-binding protein from human amniotic fluid. *Endocrinology*. 1986;118(4):1375-1378.
72. Suikkari AM, Ruutiainen K, Erkkola R, Seppala M. Low levels of low molecular weight insulin-like growth factor-binding protein in patients with polycystic ovarian disease. *Hum Reprod*. 1989;4(2):136-139.
73. Homburg R, Pariente C, Lunenfeld B, Jacobs HS. The role of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF binding protein-1 (IGFBP-1) in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 1992;7(10):1379-1383.
74. Barbieri RL, Ryan KJ. Hyperandrogenism, insulin resistance, and acanthosis nigricans syndrome: a common endocrinopathy with distinct pathophysiologic features. *Am J Obstet Gynecol*. 1983;147(1):90-101.
75. Poretsky L, Kalin MF. The gonadotropic function of insulin. *Endocr Rev*. 1987;8(2):132-141.
76. Willis D, Franks S. Insulin action in human granulosa cells from normal and polycystic ovaries is mediated by the insulin receptor and not the type-I insulin-like growth factor receptor. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80(12):3788-3790.
77. Kirwan JP, Hauguel-De Mouzon S, Lepercq J, Challier JC, Huston-Presley L, Friedman JE, Kalhan SC, Catalano PM. TNF-alpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. *Diabetes*. 2002;51(7):2207-2213.
78. Franks S. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*. 1995;333(13):853-861.
79. Toulis KA, Goulis DG, Kolibianakis EM, Venetis CA, Tarlatzis BC, Papadimas I. Risk of gestational diabetes mellitus in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and a meta-analysis. *Fertil Steril*. 2009;92(2):667-677.

80. Nawaz FH, Khalid R, Naru T, Rizvi J. Does continuous use of metformin throughout pregnancy improve pregnancy outcomes in women with polycystic ovarian syndrome? *J Obstet Gynaecol Res.* 2008;34(5):832-837.
81. Crisosto N, Echiburu B, Maliqueo M, Perez V, Ladron de Guevara A, Preisler J, Sanchez F, Sir-Petermann T. 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.* 2012;97(1):218-224.
82. Sir-Petermann T, Hitchensfeld C, Maliqueo M, Codner E, Echiburu B, Gazitua R, Recabarren S, Cassorla F. Birth weight in offspring of mothers with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod.* 2005;20(8):2122-2126.
83. Sir-Petermann T, Maliqueo M, Angel B, Lara HE, Perez-Bravo F, Recabarren SE. Maternal serum androgens in pregnant women with polycystic ovarian syndrome: possible implications in prenatal androgenization. *Hum Reprod.* 2002;17(10):2573-2579.
84. Maliqueo M, Lara HE, Sanchez F, Echiburu B, Crisosto N, Sir-Petermann T. Placental steroidogenesis in pregnant women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013;166(2):151-155.
85. Rojas J, Chavez-Castillo M, Bermudez V. The Role of Metformin in Metabolic Disturbances during Pregnancy: Polycystic Ovary Syndrome and Gestational Diabetes Mellitus. *Int J Reprod Med.* 2014;2014:797681.
86. Abbott DH, Zhou R, Bird IM, Dumesic DA, Conley AJ. Fetal programming of adrenal androgen excess: lessons from a nonhuman primate model of polycystic ovary syndrome. *Endocr Dev.* 2008;13:145-158.
87. Maliqueo M, Sir-Petermann T, Perez V, Echiburu B, de Guevara AL, Galvez C, Crisosto N, Azziz R. Adrenal function during childhood and puberty in daughters of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(9):3282-3288.
88. Trainer PJ. Corticosteroids and pregnancy. *Semin Reprod Med.* 2002;20(4):375-380.
89. Van den Bergh BR, Van Calster B, Smits T, Van Huffel S, Lagae L. Antenatal maternal anxiety is related to HPA-axis dysregulation and self-reported depressive symptoms in adolescence: a prospective study on the fetal origins of depressed mood. *Neuropsychopharmacology.* 2008;33(3):536-545.
90. Matthews SG. Antenatal glucocorticoids and programming of the developing CNS. *Pediatr Res.* 2000;47(3):291-300.
91. Chrousos GP, Torpy DJ, Gold PW. Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. *Ann Intern Med.* 1998;129(3):229-240.
92. de Weerth C, Buitelaar JK. Physiological stress reactivity in human pregnancy--a review. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005;29(2):295-312.
93. Christian LM. Physiological reactivity to psychological stress in human pregnancy: current knowledge and future directions. *Prog Neurobiol.* 2012;99(2):106-116.
94. McLean M, Smith R. Corticotropin-releasing Hormone in Human Pregnancy and Parturition. *Trends Endocrinol Metab.* 1999;10(5):174-178.
95. Glintborg D, Hermann AP, Brusgaard K, Hangaard J, Hagen C, Andersen M. Significantly higher adrenocorticotropin-stimulated cortisol and 17-hydroxyprogesterone levels in 337 consecutive, premenopausal, caucasian, hirsute

- patients compared with healthy controls. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(3):1347-1353.
96. Vicennati V, Pasquali R. Abnormalities of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in nondepressed women with abdominal obesity and relations with insulin resistance: evidence for a central and a peripheral alteration. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(11):4093-4098.
 97. Nugent BM, Tobet SA, Lara HE, Lucion AB, Wilson ME, Recabarren SE, Paredes AH. Hormonal programming across the lifespan. *Horm Metab Res.* 2012;44(8):577-586.
 98. Recabarren SE, Smith R, Rios R, Maliqueo M, Echiburu B, Codner E, Cassorla F, Rojas P, Sir-Petermann T. Metabolic profile in sons of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(5):1820-1826.
 99. Recabarren SE, Sir-Petermann T, Rios R, Maliqueo M, Echiburu B, Smith R, Rojas-Garcia P, Recabarren M, Rey RA. Pituitary and testicular function in sons of women with polycystic ovary syndrome from infancy to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(9):3318-3324.
 100. Bartness TJ, Bamshad M. Innervation of mammalian white adipose tissue: implications for the regulation of total body fat. *Am J Physiol.* 1998;275(5 Pt 2):R1399-1411.
 101. Delarue J, Magnan C. Free fatty acids and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2007;10(2):142-148.
 102. Ek I, Arner P, Ryden M, Holm C, Thorne A, Hoffstedt J, Wahrenberg H. A unique defect in the regulation of visceral fat cell lipolysis in the polycystic ovary syndrome as an early link to insulin resistance. *Diabetes.* 2002;51(2):484-492.
 103. Symonds ME, Mostyn A, Pearce S, Budge H, Stephenson T. Endocrine and nutritional regulation of fetal adipose tissue development. *J Endocrinol.* 2003;179(3):293-299.
 104. Pagel-Langenickel I, Bao J, Pang L, Sack MN. The role of mitochondria in the pathophysiology of skeletal muscle insulin resistance. *Endocr Rev.* 2010;31(1):25-51.
 105. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Buhring HJ, Evangelista M, Hennerbichler S, Liu B, Magatti M, Mao N, Miki T, Marongiu F, Nakajima H, Nikaido T, Portmann-Lanz CB, Sankar V, Soncini M, Stadler G, Surbek D, Takahashi TA, Redl H, Sakuragawa N, Wolbank S, Zeisberger S, Zisch A, Strom SC. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells.* 2008;26(2):300-311.
 106. Dilworth MR, Sibley CP. Review: Transport across the placenta of mice and women. *Placenta.* 2013;34 Suppl:S34-39.
 107. Desoye G, Hauguel-de Mouzon S. The human placenta in gestational diabetes mellitus. The insulin and cytokine network. *Diabetes Care.* 2007;30 Suppl 2:S120-126.
 108. Sibley CP, Boyd RD. Control of transfer across the mature placenta. *Oxf Rev Reprod Biol.* 1988;10:382-435.
 109. Firth JA, Leach L. Not trophoblast alone: a review of the contribution of the fetal microvasculature to transplacental exchange. *Placenta.* 1996;17(2-3):89-96.

110. Desforges M, Sibley CP. Placental nutrient supply and fetal growth. *Int J Dev Biol.* 2010;54(2-3):377-390.
111. Jansson T, Wennergren M, Illsley NP. Glucose transporter protein expression in human placenta throughout gestation and in intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;77(6):1554-1562.
112. Belkacemi L, Bedard I, Simoneau L, Lafond J. Calcium channels, transporters and exchangers in placenta: a review. *Cell Calcium.* 2005;37(1):1-8.
113. Constancia M, Angiolini E, Sandovici I, Smith P, Smith R, Kelsey G, Dean W, Ferguson-Smith A, Sibley CP, Reik W, Fowden A. Adaptation of nutrient supply to fetal demand in the mouse involves interaction between the *Igf2* gene and placental transporter systems. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(52):19219-19224.
114. Resch BE, Ducza E, Gaspar R, Falkay G. Role of adrenergic receptor subtypes in the control of human placental blood vessels. *Mol Reprod Dev.* 2003;66(2):166-171.
115. Rouget C, Barthez O, Goirand F, Leroy MJ, Breuiller-Fouche M, Rakotoniaina Z, Guerard P, Morcillo EJ, Advenier C, Sagot P, Cabrol D, Dumas M, Bardou M. Stimulation of the ADRB3 adrenergic receptor induces relaxation of human placental arteries: influence of preeclampsia. *Biol Reprod.* 2006;74(1):209-216.
116. Ganapathy V, Prasad PD, Ganapathy ME, Leibach FH. Placental transporters relevant to drug distribution across the maternal-fetal interface. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;294(2):413-420.
117. Bottalico B, Larsson I, Brodzki J, Hernandez-Andrade E, Casslen B, Marsal K, Hansson SR. Norepinephrine transporter (NET), serotonin transporter (SERT), vesicular monoamine transporter (VMAT2) and organic cation transporters (OCT1, 2 and EMT) in human placenta from pre-eclamptic and normotensive pregnancies. *Placenta.* 2004;25(6):518-529.
118. Manyonda IT, Slater DM, Fenske C, Hole D, Choy MY, Wilson C. A role for noradrenaline in pre-eclampsia: towards a unifying hypothesis for the pathophysiology. *Br J Obstet Gynaecol.* 1998;105(6):641-648.
119. Hansson SR, Bottalico B, Noskova V, Casslen B. Monoamine transporters in human endometrium and decidua. *Hum Reprod Update.* 2009;15(2):249-260.
120. Bzoskie L, Yen J, Tseng YT, Blount L, Kashiwai K, Padbury JF. Human placental norepinephrine transporter mRNA: expression and correlation with fetal condition at birth. *Placenta.* 1997;18(2-3):205-210.
121. Bzoskie L, Blount L, Kashiwai K, Tseng YT, Hay WW, Jr., Padbury JF. Placental norepinephrine clearance: in vivo measurement and physiological role. *Am J Physiol.* 1995;269(1 Pt 1):E145-149.
122. Mannangatti P, Arapulisamy O, Shippenberg TS, Ramamoorthy S, Jayanthi LD. Cocaine up-regulation of the norepinephrine transporter requires threonine 30 phosphorylation by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 2011;286(23):20239-20250.
123. Blakely RD, De Felice LJ, Hartzell HC. Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters. *J Exp Biol.* 1994;196:263-281.
124. Jayanthi LD, Samuvel DJ, Ramamoorthy S. Regulated internalization and phosphorylation of the native norepinephrine transporter in response to phorbol esters. Evidence for localization in lipid rafts and lipid raft-mediated internalization. *J Biol Chem.* 2004;279(18):19315-19326.

125. Na KH, Choi JH, Kim CH, Kim KS, Kim GJ. Altered expression of norepinephrine transporter and norepinephrine in human placenta cause pre-eclampsia through regulated trophoblast invasion. *Clin Exp Reprod Med.* 2013;40(1):12-22.
126. Melikian HE, McDonald JK, Gu H, Rudnick G, Moore KR, Blakely RD. Human norepinephrine transporter. Biosynthetic studies using a site-directed polyclonal antibody. *J Biol Chem.* 1994;269(16):12290-12297.
127. Ramamoorthy S, Shippenberg TS, Jayanthi LD. Regulation of monoamine transporters: Role of transporter phosphorylation. *Pharmacol Ther.* 2011;129(2):220-238.
128. Ganapathy V. Drugs of abuse and human placenta. *Life Sci.* 2011;88(21-22):926-930.
129. Robertson SD, Matthies HJ, Owens WA, Sathananthan V, Christianson NS, Kennedy JP, Lindsley CW, Daws LC, Galli A. Insulin reveals Akt signaling as a novel regulator of norepinephrine transporter trafficking and norepinephrine homeostasis. *J Neurosci.* 2010;30(34):11305-11316.
130. Mandela P, Ordway GA. The norepinephrine transporter and its regulation. *J Neurochem.* 2006;97(2):310-333.
131. Hansson SR, Bottalico B, Amer-Wahlin I, Marsal K, Ley D. Increased fetal blood pressure response to maternal norepinephrine after pharmacological inhibition of norepinephrine uptake in pregnant sheep. *Acta Paediatr.* 2007;96(5):650-654.
132. Zhang H, Smith GN, Liu X, Holden JJ. Association of MAOA, 5-HTT, and NET promoter polymorphisms with gene expression and protein activity in human placentas. *Physiol Genomics.* 2010;42(1):85-92.
133. Macko AR, Yates DT, Chen X, Green AS, Kelly AC, Brown LD, Limesand SW. Elevated plasma norepinephrine inhibits insulin secretion, but adrenergic blockade reveals enhanced beta-cell responsiveness in an ovine model of placental insufficiency at 0.7 of gestation. *J Dev Orig Health Dis.* 2013;4(5):402-410.
134. Limesand SW, Rozance PJ, Macko AR, Anderson MJ, Kelly AC, Hay WW, Jr. Reductions in insulin concentrations and beta-cell mass precede growth restriction in sheep fetuses with placental insufficiency. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013;304(5):E516-523.
135. Greenough A, Nicolaides KH, Lagercrantz H. Human fetal sympathoadrenal responsiveness. *Early Hum Dev.* 1990;23(1):9-13.
136. Okamura K, Watanabe T, Tanigawara S, Shintaku Y, Endo H, Iwamoto M, Murotsuki J, Yajima A. Biochemical evaluation of fetus with hypoxia caused by severe preeclampsia using cordocentesis. *J Perinat Med.* 1990;18(6):441-447.
137. Pardi G, Cetin I, Marconi AM, Bozzetti P, Buscaglia M, Makowski EL, Battaglia FC. Venous drainage of the human uterus: respiratory gas studies in normal and fetal growth-retarded pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* 1992;166(2):699-706.
138. Lagercrantz H, Sjoquist B, Bremme K, Lunell NO, Somell C. Catecholamine metabolites in amniotic fluid as indicators of intrauterine stress. *Am J Obstet Gynecol.* 1980;136(8):1067-1070.
139. Sperling MA, Christensen RA, Ganguli S, Anand R. Adrenergic modulation of pancreatic hormone secretion in utero: studies in fetal sheep. *Pediatr Res.* 1980;14(3):203-208.
140. Rychkov GY, Adams MB, McMillen IC, Roberts ML. Oxygen-sensing mechanisms are present in the chromaffin cells of the sheep adrenal medulla before birth. *J Physiol.* 1998;509 (Pt 3):887-893.

141. Yates DT, Macko AR, Chen X, Green AS, Kelly AC, Anderson MJ, Fowden AL, Limesand SW. Hypoxaemia-induced catecholamine secretion from adrenal chromaffin cells inhibits glucose-stimulated hyperinsulinaemia in fetal sheep. *J Physiol*. 2012;590(21):5439-5447.
142. Bassett JM. Metabolic effects of catecholamines in sheep. *Aust J Biol Sci*. 1970;23(4):903-914.
143. Sperling MA, Ganguli S, Leslie N, Landt K. Fetal-perinatal catecholamine secretion: role in perinatal glucose homeostasis. *Am J Physiol*. 1984;247(1 Pt 1):E69-74.
144. Yates DT, Macko AR, Nearing M, Chen X, Rhoads RP, Limesand SW. Developmental programming in response to intrauterine growth restriction impairs myoblast function and skeletal muscle metabolism. *J Pregnancy*. 2012;2012:631038.
145. Kuo CD, Chen GY, Yang MJ, Lo HM, Tsai YS. Biphasic changes in autonomic nervous activity during pregnancy. *Br J Anaesth*. 2000;84(3):323-329.
146. Shepherd PR. Secrets of insulin and IGF-1 regulation of insulin secretion revealed. *Biochem J*. 2004;377(Pt 1):e1-2.
147. Mounier C, Posner BI. Transcriptional regulation by insulin: from the receptor to the gene. *Can J Physiol Pharmacol*. 2006;84(7):713-724.
148. Ryan EA, O'Sullivan MJ, Skyler JS. Insulin action during pregnancy. Studies with the euglycemic clamp technique. *Diabetes*. 1985;34(4):380-389.
149. Catalano PM, Roman-Drago NM, Amini SB, Sims EA. Longitudinal changes in body composition and energy balance in lean women with normal and abnormal glucose tolerance during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1998;179(1):156-165.
150. Catalano PM, Drago NM, Amini SB. Maternal carbohydrate metabolism and its relationship to fetal growth and body composition. *Am J Obstet Gynecol*. 1995;172(5):1464-1470.
151. Ryan EA, Enns L. Role of gestational hormones in the induction of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988;67(2):341-347.
152. Chen HL, Yang YP, Hu XL, Yelavarthi KK, Fishback JL, Hunt JS. Tumor necrosis factor alpha mRNA and protein are present in human placental and uterine cells at early and late stages of gestation. *Am J Pathol*. 1991;139(2):327-335.
153. Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med*. 1997;3(9):1029-1033.
154. Sanchez-Margalet V, Lobon JA, Gonzalez A, Fernandez-Soto ML, Escobar-Jimenez F, Goberna R. Increased plasma pancreastatin-like levels in gestational diabetes: correlation with catecholamine levels. *Diabetes Care*. 1998;21(11):1951-1954.
155. Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K, Edery M, Graf L, Clauser E, Ou JH, Masiarz F, Kan YW, Goldfine ID, et al. The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell*. 1985;40(4):747-758.
156. Sobrevia L, Abarzua F, Nien JK, Salomon C, Westermeier F, Puebla C, Cifuentes F, Guzman-Gutierrez E, Leiva A, Casanello P. Review: Differential placental macrovascular and microvascular endothelial dysfunction in gestational diabetes. *Placenta*. 2011;32 Suppl 2:S159-164.
157. Salomon C, Westermeier F, Puebla C, Arroyo P, Guzman-Gutierrez E, Pardo F, Leiva A, Casanello P, Sobrevia L. Gestational diabetes reduces adenosine transport in

- human placental microvascular endothelium, an effect reversed by insulin. *PLoS One*. 2012;7(7):e40578.
158. Mosthaf L, Vogt B, Haring HU, Ullrich A. Altered expression of insulin receptor types A and B in the skeletal muscle of non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(11):4728-4730.
 159. Frasca F, Pandini G, Scalia P, Sciacca L, Mineo R, Costantino A, Goldfine ID, Belfiore A, Vigneri R. Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol Cell Biol*. 1999;19(5):3278-3288.
 160. Sciacca L, Prisco M, Wu A, Belfiore A, Vigneri R, Baserga R. Signaling differences from the A and B isoforms of the insulin receptor (IR) in 32D cells in the presence or absence of IR substrate-1. *Endocrinology*. 2003;144(6):2650-2658.
 161. Hiden U, Lang I, Ghaffari-Tabrizi N, Gauster M, Lang U, Desoye G. Insulin action on the human placental endothelium in normal and diabetic pregnancy. *Curr Vasc Pharmacol*. 2009;7(4):460-466.
 162. Sobrevia L, Gonzalez M. A role for insulin on L-arginine transport in fetal endothelial dysfunction in hyperglycaemia. *Curr Vasc Pharmacol*. 2009;7(4):467-474.
 163. Norgren S, Li LS, Luthman H. Regulation of human insulin receptor RNA splicing in HepG2 cells: effects of glucocorticoid and low glucose concentration. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;199(1):277-284.
 164. Gonzalez M, Flores C, Pearson JD, Casanello P, Sobrevia L. Cell signalling-mediated insulin increase of mRNA expression for cationic amino acid transporters-1 and -2 and membrane hyperpolarization in human umbilical vein endothelial cells. *Pflugers Arch*. 2004;448(4):383-394.
 165. Guzman-Gutierrez E, Westermeier F, Salomon C, Gonzalez M, Pardo F, Leiva A, Sobrevia L. Insulin-increased L-arginine transport requires A(2A) adenosine receptors activation in human umbilical vein endothelium. *PLoS One*. 2012;7(7):e41705.
 166. Hjendahl P. Catecholamine measurements in plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Methods Enzymol*. 1987;142:521-534.
 167. Dorfman M, Ramirez VD, Stener-Victorin E, Lara HE. Chronic-intermittent cold stress in rats induces selective ovarian insulin resistance. *Biol Reprod*. 2009;80(2):264-271.
 168. Vollenweider P, Tappy L, Randin D, Schneiter P, Jequier E, Nicod P, Scherrer U. Differential effects of hyperinsulinemia and carbohydrate metabolism on sympathetic nerve activity and muscle blood flow in humans. *J Clin Invest*. 1993;92(1):147-154.
 169. Young CN, Deo SH, Chaudhary K, Thyfault JP, Fadel PJ. Insulin enhances the gain of arterial baroreflex control of muscle sympathetic nerve activity in humans. *J Physiol*. 2010;588(Pt 18):3593-3603.
 170. Rotterdam EA-SPCWG. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2004;81(1):19-25.
 171. Adams J, Polson DW, Franks S. Prevalence of polycystic ovaries in women with anovulation and idiopathic hirsutism. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1986;293(6543):355-359.

172. Sir-Petermann T, Devoto L, Maliqueo M, Peirano P, Recabarren SE, Wildt L. Resumption of ovarian function during lactational amenorrhoea in breastfeeding women with polycystic ovarian syndrome: endocrine aspects. *Hum Reprod.* 2001;16(8):1603-1610.
173. Wyatt SM, Kraus FT, Roh CR, Elchalal U, Nelson DM, Sadovsky Y. The correlation between sampling site and gene expression in the term human placenta. *Placenta.* 2005;26(5):372-379.
174. Ramamoorthy S, Prasad PD, Kulanthaivel P, Leibach FH, Blakely RD, Ganapathy V. Expression of a cocaine-sensitive norepinephrine transporter in the human placental syncytiotrophoblast. *Biochemistry.* 1993;32(5):1346-1353.
175. Bernuci MP, Szawka RE, Helena CV, Leite CM, Lara HE, Anselmo-Franci JA. Locus coeruleus mediates cold stress-induced polycystic ovary in rats. *Endocrinology.* 2008;149(6):2907-2916.
176. Michaud GA, Salcius M, Zhou F, Bangham R, Bonin J, Guo H, Snyder M, Predki PF, Schweitzer BI. Analyzing antibody specificity with whole proteome microarrays. *Nat Biotechnol.* 2003;21(12):1509-1512.
177. Schurov IL, Handford EJ, Brandon NJ, Whiting PJ. Expression of disrupted in schizophrenia 1 (DISC1) protein in the adult and developing mouse brain indicates its role in neurodevelopment. *Mol Psychiatry.* 2004;9(12):1100-1110.
178. Bocker-Meffert S, Rosenstiel P, Rohl C, Warneke N, Held-Feindt J, Sievers J, Lucius R. Erythropoietin and VEGF promote neural outgrowth from retinal explants in postnatal rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(6):2021-2026.
179. Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem.* 1978;87(1):206-210.
180. Fabre-Nys C. Steroid control of monoamines in relation to sexual behaviour. *Rev Reprod.* 1998;3(1):31-41.
181. Hobel CJ, Parvez H, Parvez S, Lirette M, Papiernik E. Enzymes for epinephrine synthesis and metabolism in the myometrium, endometrium, red blood cells, and plasma of pregnant human subjects. *Am J Obstet Gynecol.* 1981;141(8):1009-1018.
182. Zhang W, Zhao Y, Yin Y. The relationship between catecholamines levels in mother and fetus, and pathogenesis of pregnancy-induced hypertension. *Chin Med J (Engl).* 2003;116(7):1108-1109.
183. Morrison JL. Sheep models of intrauterine growth restriction: fetal adaptations and consequences. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008;35(7):730-743.
184. Lenders JW. Pheochromocytoma and pregnancy: a deceptive connection. *Eur J Endocrinol.* 2012;166(2):143-150.
185. Reyes FI, Winter JS, Faiman C. Studies on human sexual development. I. Fetal gonadal and adrenal sex steroids. *J Clin Endocrinol Metab.* 1973;37(1):74-78.
186. Stoop H, Honecker F, Cools M, de Krijger R, Bokemeyer C, Looijenga LH. Differentiation and development of human female germ cells during prenatal gonadogenesis: an immunohistochemical study. *Hum Reprod.* 2005;20(6):1466-1476.
187. Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Graem N, Muller J, Cate RL, Skakkebaek NE. Expression of anti-Mullerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(10):3836-3844.

188. Barra R, Cruz G, Mayerhofer A, Paredes A, Lara HE. Maternal sympathetic stress impairs follicular development and puberty of the offspring. *Reproduction*. 2014;148(2):137-145.
189. Piquer B, Fonseca JL, Lara HE. Gestational stress, placental norepinephrine transporter and offspring fertility. *Reproduction*. 2017;153(2):147-155.
190. Tunbridge RD, Donnai P. Plasma noradrenaline in normal pregnancy and in hypertension of late pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*. 1981;88(2):105-108.
191. Giudice LC. Endometrium in PCOS: Implantation and predisposition to endocrine CA. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2006;20(2):235-244.
192. Palomba S, Russo T, Falbo A, Di Cello A, Amendola G, Mazza R, Tolino A, Zullo F, Tucci L, La Sala GB. Decidual endovascular trophoblast invasion in women with polycystic ovary syndrome: an experimental case-control study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(7):2441-2449.
193. Kondoh Y, Uemura T, Ishikawa M, Yokoi N, Hirahara F. Classification of polycystic ovary syndrome into three types according to response to human corticotropin-releasing hormone. *Fertil Steril*. 1999;72(1):15-20.
194. Kelestimur F, Sahin Y. Alternate pathway 17,20-lyase enzyme activity in the adrenals is enhanced in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 1999;71(6):1075-1078.
195. Lobo RA, Granger LR, Paul WL, Goebelsmann U, Mishell DR, Jr. Psychological stress and increases in urinary norepinephrine metabolites, platelet serotonin, and adrenal androgens in women with polycystic ovary syndrome. *Am J Obstet Gynecol*. 1983;145(4):496-503.
196. Kumai T, Tanaka M, Watanabe M, Nakura H, Kobayashi S. Influence of androgen on tyrosine hydroxylase mRNA in adrenal medulla of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1995;26(1):208-212.
197. Petersen JS, DiBona GF. Acute sympathoinhibitory actions of metformin in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1996;27(3 Pt 2):619-625.
198. Manzella D, Grella R, Esposito K, Giugliano D, Barbagallo M, Paolisso G. Blood pressure and cardiac autonomic nervous system in obese type 2 diabetic patients: effect of metformin administration. *Am J Hypertens*. 2004;17(3):223-227.
199. Brownfoot FC, Hastie R, Hannan NJ, Cannon P, Tuohey L, Parry LJ, Senadheera S, Illanes SE, Kaitu'u-Lino TJ, Tong S. Metformin as a prevention and treatment for preeclampsia: effects on soluble fms-like tyrosine kinase 1 and soluble endoglin secretion and endothelial dysfunction. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;214(3):356 e351-356 e315.
200. Salvesen KA, Vanky E, Carlsen SM. Metformin treatment in pregnant women with polycystic ovary syndrome--is reduced complication rate mediated by changes in the uteroplacental circulation? *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2007;29(4):433-437.
201. Bzoskie L, Blount L, Kashiwai K, Humme J, Padbury JF. The contribution of transporter-dependent uptake to fetal catecholamine clearance. *Biol Neonate*. 1997;71(2):102-110.
202. Gregory KD, Korst LM. Age and racial/ethnic differences in maternal, fetal, and placental conditions in laboring patients. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;188(6):1602-1606; discussion 1606-1608.

203. Quinlan RW, Cruz AC, Buhi WC, Martin M. Changes in placental ultrasonic appearance. II. Pathologic significance of Grade III placental changes. *Am J Obstet Gynecol.* 1982;144(4):471-473.
204. Thackeray JT, Radziuk J, Harper ME, Suuronen EJ, Ascah KJ, Beanlands RS, Dasilva JN. Sympathetic nervous dysregulation in the absence of systolic left ventricular dysfunction in a rat model of insulin resistance with hyperglycemia. *Cardiovascular diabetology.* 2011;10:75.
205. Figlewicz DP, Szot P, Israel PA, Payne C, Dorsa DM. Insulin reduces norepinephrine transporter mRNA in vivo in rat locus coeruleus. *Brain Res.* 1993;602(1):161-164.
206. Lorang D, Amara SG, Simerly RB. Cell-type-specific expression of catecholamine transporters in the rat brain. *J Neurosci.* 1994;14(8):4903-4914.
207. Straznicki NE, Guo L, Corcoran SJ, Esler MD, Phillips SE, Sari CI, Grima MT, Karapanagiotidis S, Wong CY, Eikelis N, Mariani JA, Kobayashi D, Dixon JB, Lambert GW, Lambert EA. Norepinephrine transporter expression is inversely associated with glycaemic indices: a pilot study in metabolically diverse persons with overweight and obesity. *Obesity science & practice.* 2016;2(1):13-23.
208. Arslanian SA, Lewy VD, Danadian K. Glucose intolerance in obese adolescents with polycystic ovary syndrome: roles of insulin resistance and beta-cell dysfunction and risk of cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(1):66-71.
209. Anderson EA, Mark AL. The vasodilator action of insulin. Implications for the insulin hypothesis of hypertension. *Hypertension.* 1993;21(2):136-141.
210. Lee CL, Chiu PC, Pang PC, Chu IK, Lee KF, Koistinen R, Koistinen H, Seppala M, Morris HR, Tissot B, Panico M, Dell A, Yeung WS. Glycosylation failure extends to glycoproteins in gestational diabetes mellitus: evidence from reduced alpha2-6 sialylation and impaired immunomodulatory activities of pregnancy-related glycodelin-A. *Diabetes.* 2011;60(3):909-917.
211. Moldovanova I, Schroeder C, Jacob G, Hiemke C, Diedrich A, Luft FC, Jordan J. Hormonal influences on cardiovascular norepinephrine transporter responses in healthy women. *Hypertension.* 2008;51(4):1203-1209.
212. Sun Z, Fan Y, Zha Q, Zhu MY. Corticosterone up-regulates expression and function of norepinephrine transporter in SK-N-BE(2)C cells. *J Neurochem.* 2010;113(1):105-116.
213. Shang Y, Dluzen DE. Castration increases nisoxetine-evoked norepinephrine levels in vivo within the olfactory bulb of male rats. *Neurosci Lett.* 2002;328(2):81-84.
214. Ahn KJ. Insulin Resistance During Pregnancy. *Korean Diabetes J.* 2009;33(2):77-82.
215. Colomiere M, Permezel M, Riley C, Desoye G, Lappas M. Defective insulin signaling in placenta from pregnancies complicated by gestational diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol.* 2009;160(4):567-578.
216. Alonso A, Del Rey CG, Navarro A, Tolivia J, Gonzalez CG. Effects of gestational diabetes mellitus on proteins implicated in insulin signaling in human placenta. *Gynecol Endocrinol.* 2006;22(9):526-535.
217. Boomsma CM, Fauser BC, Macklon NS. Pregnancy complications in women with polycystic ovary syndrome. *Semin Reprod Med.* 2008;26(1):72-84.
218. Scioscia M, Gumaa K, Kunjara S, Paine MA, Selvaggi LE, Rodeck CH, Rademacher TW. Insulin resistance in human preeclamptic placenta is mediated by serine

- phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and -2. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(2):709-717.
219. Jazet IM, Pijl H, Meinders AE. Adipose tissue as an endocrine organ: impact on insulin resistance. *Neth J Med.* 2003;61(6):194-212.
 220. Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res.* 2002;53(4):865-871.
 221. Barbour LA, McCurdy CE, Hernandez TL, Kirwan JP, Catalano PM, Friedman JE. Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes. *Diabetes Care.* 2007;30 Suppl 2:S112-119.
 222. Friedman JE, Ishizuka T, Shao J, Huston L, Highman T, Catalano P. Impaired glucose transport and insulin receptor tyrosine phosphorylation in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes. *Diabetes.* 1999;48(9):1807-1814.
 223. Catalano PM, Nizielski SE, Shao J, Preston L, Qiao L, Friedman JE. Downregulated IRS-1 and PPARgamma in obese women with gestational diabetes: relationship to FFA during pregnancy. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;282(3):E522-533.
 224. Kirwan JP, Varastehpour A, Jing M, Presley L, Shao J, Friedman JE, Catalano PM. Reversal of insulin resistance postpartum is linked to enhanced skeletal muscle insulin signaling. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(9):4678-4684.
 225. Xing AY, Challier JC, Lepercq J, Cauzac M, Charron MJ, Girard J, Hauguel-de Mouzon S. Unexpected expression of glucose transporter 4 in villous stromal cells of human placenta. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(11):4097-4101.
 226. Colomiere M, Permezel M, Lappas M. Diabetes and obesity during pregnancy alter insulin signalling and glucose transporter expression in maternal skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue. *J Mol Endocrinol.* 2010;44(4):213-223.
 227. Sinha MK, Raineri-Maldonado C, Buchanan C, Pories WJ, Carter-Su C, Pilch PF, Caro JF. Adipose tissue glucose transporters in NIDDM. Decreased levels of muscle/fat isoform. *Diabetes.* 1991;40(4):472-477.
 228. Ericsson A, Hamark B, Powell TL, Jansson T. Glucose transporter isoform 4 is expressed in the syncytiotrophoblast of first trimester human placenta. *Hum Reprod.* 2005;20(2):521-530.
 229. Zhai J, Liu CX, Tian ZR, Jiang QH, Sun YP. Effects of metformin on the expression of GLUT4 in endometrium of obese women with polycystic ovary syndrome. *Biol Reprod.* 2012;87(2):29.
 230. Barry JS, Rozance PJ, Anthony RV. An animal model of placental insufficiency-induced intrauterine growth restriction. *Semin Perinatol.* 2008;32(3):225-230.
 231. Zhang S, Regnault TR, Barker PL, Botting KJ, McMillen IC, McMillan CM, Roberts CT, Morrison JL. Placental adaptations in growth restriction. *Nutrients.* 2015;7(1):360-389.
 232. Ali AT, Ferris WF, Naran NH, Crowther NJ. Insulin resistance in the control of body fat distribution: a new hypothesis. *Horm Metab Res.* 2011;43(2):77-80.
 233. Lele RD. Fat and muscle component of body mass index (BMI): relation with hyperinsulinemia. *J Assoc Physicians India.* 2007;55:203-210.
 234. Jaswal JS, Lund CR, Keung W, Beker DL, Rebeyka IM, Lopaschuk GD. Isoproterenol stimulates 5'-AMP-activated protein kinase and fatty acid oxidation in neonatal hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;299(4):H1135-1145.

235. Beauloye C, Bertrand L, Horman S, Hue L. AMPK activation, a preventive therapeutic target in the transition from cardiac injury to heart failure. *Cardiovasc Res.* 2011;90(2):224-233.
236. Shimizu Y, Nikami H, Tsukazaki K, Machado UF, Yano H, Seino Y, Saito M. Increased expression of glucose transporter GLUT-4 in brown adipose tissue of fasted rats after cold exposure. *Am J Physiol.* 1993;264(6 Pt 1):E890-895.
237. Whitsett JA, Johnson CL, Noguchi A, Darovec-Beckerman C, Costello M. Beta-Adrenergic receptors and catecholamine-sensitive adenylate cyclase of the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab.* 1980;50(1):27-32.
238. Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VR, Sanishvili R, Fischetti RF, Schertler GF, Weis WI, Kobilka BK. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature.* 2007;450(7168):383-387.
239. Kishi K, Hayashi H, Wang L, Kamohara S, Tamaoka K, Shimizu T, Ushikubi F, Narumiya S, Ebina Y. Gq-coupled receptors transmit the signal for GLUT4 translocation via an insulin-independent pathway. *J Biol Chem.* 1996;271(43):26561-26568.
240. Mulder AH, Tack CJ, Olthaar AJ, Smits P, Sweep FC, Bosch RR. Adrenergic receptor stimulation attenuates insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes by inhibiting GLUT4 translocation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;289(4):E627-633.
241. Inokuma K, Ogura-Okamatsu Y, Toda C, Kimura K, Yamashita H, Saito M. Uncoupling protein 1 is necessary for norepinephrine-induced glucose utilization in brown adipose tissue. *Diabetes.* 2005;54(5):1385-1391.
242. Dantas WS, Marcondes JA, Shinjo SK, Perandini LA, Zambelli VO, Neves WD, Barcellos CR, Rocha MP, Yance Vdos R, Pereira RT, Murai IH, Pinto AL, Roschel H, Gualano B. GLUT4 translocation is not impaired after acute exercise in skeletal muscle of women with obesity and polycystic ovary syndrome. *Obesity (Silver Spring).* 2015;23(11):2207-2215.
243. Sabban EL, Kvetnansky R. Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events. *Trends Neurosci.* 2001;24(2):91-98.
244. DiGiacomo JE, Hay WW, Jr. Fetal glucose metabolism and oxygen consumption during sustained hypoglycemia. *Metabolism.* 1990;39(2):193-202.
245. Seidler FJ, Slotkin TA. Ontogeny of adrenomedullary responses to hypoxia and hypoglycemia: role of splanchnic innervation. *Brain Res Bull.* 1986;16(1):11-14.
246. Leos RA, Anderson MJ, Chen X, Pugmire J, Anderson KA, Limesand SW. Chronic exposure to elevated norepinephrine suppresses insulin secretion in fetal sheep with placental insufficiency and intrauterine growth restriction. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;298(4):E770-778.
247. Sivalingam VN, Myers J, Nicholas S, Balen AH, Crosbie EJ. Metformin in reproductive health, pregnancy and gynaecological cancer: established and emerging indications. *Hum Reprod Update.* 2014;20(6):853-868.
248. Schlessinger A, Geier E, Fan H, Irwin JJ, Shoichet BK, Giacomini KM, Sali A. Structure-based discovery of prescription drugs that interact with the norepinephrine transporter, NET. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(38):15810-15815.

249. Chen L, Pawlikowski B, Schlessinger A, More SS, Stryke D, Johns SJ, Portman MA, Chen E, Ferrin TE, Sali A, Giacomini KM. Role of organic cation transporter 3 (SLC22A3) and its missense variants in the pharmacologic action of metformin. *Pharmacogenetics and genomics*. 2010;20(11):687-699.
250. Fang H, Yang Y, Li C, Fu S, Yang Z, Jin G, Wang K, Zhang J, Jin Y. Transcriptome analysis of early organogenesis in human embryos. *Dev Cell*. 2010;19(1):174-184.
251. Tosca L, Chabrolle C, Dupont J. [AMPK: a link between metabolism and reproduction?]. *Med Sci (Paris)*. 2008;24(3):297-300.
252. Zou MH, Kirkpatrick SS, Davis BJ, Nelson JS, Wiles WGT, Schlattner U, Neumann D, Brownlee M, Freeman MB, Goldman MH. Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo. Role of mitochondrial reactive nitrogen species. *J Biol Chem*. 2004;279(42):43940-43951.
253. Mao W, Iwai C, Qin F, Liang CS. Norepinephrine induces endoplasmic reticulum stress and downregulation of norepinephrine transporter density in PC12 cells via oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(5):H2381-2389.
254. Carey EA, Albers RE, Doliboa SR, Hughes M, Wyatt CN, Natale DR, Brown TL. AMPK knockdown in placental trophoblast cells results in altered morphology and function. *Stem Cells Dev*. 2014;23(23):2921-2930.
255. Zou MH, Wu Y. AMP-activated protein kinase activation as a strategy for protecting vascular endothelial function. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008;35(5-6):535-545.
256. Laderoute KR, Amin K, Calaoagan JM, Knapp M, Le T, Orduna J, Foretz M, Viollet B. 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is induced by low-oxygen and glucose deprivation conditions found in solid-tumor microenvironments. *Mol Cell Biol*. 2006;26(14):5336-5347.
257. Vingtdeux V, Davies P, Dickson DW, Marambaud P. AMPK is abnormally activated in tangle- and pre-tangle-bearing neurons in Alzheimer's disease and other tauopathies. *Acta Neuropathol*. 2011;121(3):337-349.
258. Giugliano D, De Rosa N, Di Maro G, Marfella R, Acampora R, Buoninconti R, D'Onofrio F. Metformin improves glucose, lipid metabolism, and reduces blood pressure in hypertensive, obese women. *Diabetes Care*. 1993;16(10):1387-1390.
259. Glueck CJ, Goldenberg N, Wang P, Loftspring M, Sherman A. Metformin during pregnancy reduces insulin, insulin resistance, insulin secretion, weight, testosterone and development of gestational diabetes: prospective longitudinal assessment of women with polycystic ovary syndrome from preconception throughout pregnancy. *Hum Reprod*. 2004;19(3):510-521.
260. la Marca A, Morgante G, Paglia T, Ciotta L, Cianci A, De Leo V. Effects of metformin on adrenal steroidogenesis in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 1999;72(6):985-989.
261. Liu Y, Jiang H, He LY, Huang WJ, He XY, Xing FQ. Abnormal expression of uncoupling protein-2 correlates with CYP11A1 expression in polycystic ovary syndrome. *Reprod Fertil Dev*. 2011;23(4):520-526.
262. Xie Z, Zhang J, Wu J, Viollet B, Zou MH. Upregulation of mitochondrial uncoupling protein-2 by the AMP-activated protein kinase in endothelial cells attenuates oxidative stress in diabetes. *Diabetes*. 2008;57(12):3222-3230.
263. Kukidome D, Nishikawa T, Sonoda K, Imoto K, Fujisawa K, Yano M, Motoshima H, Taguchi T, Matsumura T, Araki E. Activation of AMP-activated protein kinase reduces hyperglycemia-induced mitochondrial reactive oxygen species production

and promotes mitochondrial biogenesis in human umbilical vein endothelial cells.
Diabetes. 2006;55(1):120-127.

