

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**ESCUELA DE POSTGRADO**



**“SIGNIFICADO METABÓLICO - FUNCIONAL DEL  
RECEPTOR PPAR- $\gamma$  Y FOXO1 EN CÉLULAS DE  
GRANULOSA DE PACIENTES CON SÍNDROME DE OVARIO  
POLIQUÍSTICO”**

**SOLEDAD ABRIL SALINAS QUERO**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS**

**Director Clínico de Tesis: Prof. Dr. Luigi Devoto C.**

**Director Básico de Tesis: Prof. Dr. Sergio Lavanderos**

**2014**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACION TESIS DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS MEDICAS**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Médicas presentada por el candidato

**SOLEDAD ABRIL SALINAS QUERO**

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctor en Ciencias Médicas** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 20 de Mayo de 2014

**Prof. Dr. Sergio Lavandero**

Advanced Center for Chronic Diseases (ACCDiS)  
y Centro Estudios Moleculares de la Célula  
(CEMC), Facultad Ciencias Químicas y  
Farmacéuticas y Facultad Medicina,  
Universidad de Chile

**Prof. Dr. Luigi Devoto**

Instituto de Investigación Materno  
Infantil y Centro Estudios Moleculares  
de la Célula (CEMC), Facultad  
Medicina Universidad de Chile

**COMISION INFORMANTE DE TESIS**

**Prof. Dr(a). Margarita Vega**

**Prof. Dr(a). Hernan Lara**

**Prof. Dr(a). Cristian Miranda**

**Prof. Dr(a). Teresa Sir-Petermann**

Presidente Comisión de Examen

**“Dedicado a todas aquellas personas que  
me impulsaron y alentaron  
a completar este largo viaje  
Especialmente a Jose y Amelia el  
proyecto mas importante que he  
comenzado y sigo desarrollando...”**

## **AGRADECIMIENTOS:**

A todos los miembros que trabajan y trabajaron en el Laboratorio del Dr Luigi Devoto, por su ayuda, enseñanzas y paciencia en estos años de trabajo.

Al Dr. Luigi Devoto por permitirme formar parte de su laboratorio, por los consejos, orientación y enseñanzas.

Al Dr. Sergio Lavanderos por su orientación y consejos.

A Dra. Carolina Pustovrh por la paciencia de enseñarme la disciplina del laboratorio y reforzar en mí el interés por la investigación.

A Paulina Kohen, Olga Castro y Alex Muñoz por su amistad, buena disposición y apoyo sin el cual este trabajo no hubiese sido posible.

A Soledad Henriquez , Felipe Argandoña y Claudia Arriagada por su apoyo y consejo en técnicas de laboratorio para poder llevar esta tesis adelante.

A Ana Godoy, Felipe Orge biólogos del programa de IVF del IDIMI por la disposición con la entrega de las muestras necesarias para desarrollar mis experimentos

A todos los miembros de la Unidad de Reproducción y programa IVF del IDIMI, Médicos, Becado y Matronas por la buena voluntad de participar en mi formación.

Al Dr. Omar Nazzal jefe del departamento de Ginecología y Obstetricia campus centro, Universidad de Chile, por entender y estar dispuesto a entregarme el tiempo necesario durante mi beca para poder compatibilizar mis actividades de laboratorio con la práctica clínica.

A los miembros de mi comisión de Doctorado Dra. Sir-Petermann, Dra. Vega, Dr. Lara y Dr. Miranda por su disponibilidad, consejos y ayuda en el desarrollo y escrito de tesis.

A mis compañeros de Doctorado, Daniela y Felipe y a mi compañera de Beca María José, por su amistad y cariño durante este largo viaje.

Al personal técnico y administrativo del Laboratorio de Endocrinología de la Reproducción del IDIMI por toda su ayuda.

Finalmente agradezco el apoyo económico recibido por parte de la Universidad de Chile y CONICYT.

## INDICE:

	Páginas
Dedicatoria	3
Agradecimientos	4
Resumen	7
Abstract	8
1. Antecedentes Bibliográficos	
Definición y Epidemiología	9-11
Insulino resistencia en tejidos periféricos y tejidos reproductivos	11-14
Significado de los receptores de <i>PPAR</i> $\gamma$ y <i>FoxO1</i> en la resistencia a insulina	14 - 18
<i>FoxO1</i> y <i>PPAR</i> $\gamma$	18-19
2. Hipótesis	20
3. Objetivos generales	20
4. Objetivos específicos	21 - 22
5. Materiales y Métodos	
5.1 Sujetos	22
5.2 Fenopitificación de los grupos	23
5.3 Tamaño muestral	23
5.4 Materiales	24
5.5 Aislamiento y cultivo de células de la granulosa	24-25
5.6 Inmunocitoquímica de GLUT 4	25-26
5.7 Inmunofluorescencia de <i>PPAR</i> $\gamma$	26
5.8 Inmunocitoquímica de FOXO1	26-27
5.9 PCR en tiempo real	27
5.10 Extracción de proteínas totales	28
5.11 Western blot	28
5.12 Incorporación de deoxiglucosa tritiada (DOG)	29
5.13 Análisis estadístico	29

<b>6. Resultados</b>	
<b>6.1 Transporte de glucosa y expresión del transportador GLUT4 en células de la granulosa luteinizadas de mujeres normales y pacientes SOP</b>	<b>32- 36</b>
<b>6.2 Estudiar la activación de la vía transduccional metabólica del receptor de insulina-IRS1-Akt en células de granulosa de pacientes con SOP y controles</b>	<b>37- 40</b>
<b>6.3 Estudiar la expresión y localización de FoxO1 y PPAR<math>\gamma</math> en células de granulosa de pacientes con SOP</b>	<b>41 - -46</b>
<b>6.4 Efecto del agonista de PPAR<math>\gamma</math> (Rosiglitazona) sobre los parámetros descritos en los objetivos anteriores en células de granulosa de pacientes con SOP</b>	<b>46 – 54</b>
<b>7. Discusión</b>	
<b>7.1 Resistencia a la insulina en células de la granulosa luteinizadas de pacientes con Síndrome de Ovario Poliquístico</b>	<b>56– 57</b>
<b>7.2 PPAR <math>\gamma</math> y FOXO1 en células de la granulosa luteinizadas de mujeres SOP insulino resistentes</b>	<b>57- 58</b>
<b>7.3 Agonistas de PPAR <math>\gamma</math> y su efecto sobre vía de señalización Insulina en células de las granulosa de mujeres SOP Insulino resistentes</b>	<b>58 - 59</b>
<b>8. Conclusiones , Proyecciones y limitaciones</b>	<b>59-60</b>
<b>9. Bibliografía</b>	<b>61 – 66</b>
<b>10. Anexo 1 : Consentimiento Informado</b>	<b>67- 68</b>

**RESUMEN:** El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es una de las alteraciones endocrino metabólicas más comunes en la edad fértil. Un 50-70% de las pacientes presentan hiperinsulinemia y resistencia a la insulina (IR). En adipocitos y células musculares de pacientes SOP y RI se ha encontrado una menor incorporación de glucosa bajo estímulo de insulina, con una disminución en la expresión de los transportadores de glucosa, en particular GLUT 4, se ha planteado que la IR presente en estos tejidos se relaciona con defectos en la fosforilación de IRS-1/2, disminución en la activación de PI3-K/Akt y alteración en los patrones de expresión de IRS-1/2. Además se ha establecido que los factores de transcripción FoxO1 y PPAR $\gamma$  son claves en la regulación del metabolismo de la glucosa y la respuesta a insulina. Rosiglitazona (Rz), es un potente agonista, selectivo de los receptores PPAR $\gamma$ , regulando la expresión de genes participantes en el metabolismo de lípidos y glucosa. Evidencia actual ha mostrado que las glitazonas incrementan la incorporación de glucosa dependiente de insulina en cultivos de miocitos y adipocitos, modulando la expresión de GLUT4. La información en relación al papel que juegan FoxO1 y PPAR $\gamma$  en la vía de señalización de insulina en células de la granulosa (CG) de pacientes con SOP es prácticamente inexistente. Así como el efecto de la administración de agonistas farmacológicos de PPAR $\gamma$  sobre la vía de señalización de insulina y estos factores transcripcionales. El objetivo de esta tesis es estudiar *in vitro* la vía de señalización de insulina, rol de PPAR $\gamma$  y FoxO1, y así como la del agonista de PPAR $\gamma$  Rosiglitazona en la vía metabólica de insulina en CG de pacientes SOP (Tipo NIH). Para este fin se realizaron estudios *in vitro* de CG de mujeres con función ovárica normal y SOP, en presencia o ausencia de insulina 100 ng/ml y preincubadas con Rz. Se determinaron los niveles proteicos y de mRNA de GLUT4 por Western blot (WB) y qRT-PCR, respectivamente. La vía metabólica de señalización de insulina se evaluó a través de la expresión de IRS 1, Akt y sus formas fosforiladas por WB. FoxO1 y PPAR $\gamma$  se estudiaron con WB e inmunofluorescencia. Además se realizó un estudio funcional de incorporación de glucosa tritiada bajo el estímulo de insulina en CG pre incubadas o no con Rz. Nuestros resultados demuestran que las CGSOP expresan menores niveles de Glucotransportadores 1 y 4, con una menor incorporación de glucosa bajo el estímulo de insulina al compararlas con el grupo control. No se encontraron diferencias en los niveles proteicos de IRS- 1 entre los dos grupos de estudio, pero las CGSOP presentan niveles de p IRS1 Ser 312, significativamente mayores que las CG control, con menor expresión de AKT y p AKT al compararlas con CG control. PPAR  $\gamma$  se encuentra disminuido en CGSOP, mientras de FOXO1 esta aumentado, pero con menores niveles de p FOXO1 que las CG control. La pre-incubación con Rosiglitazona 0,1  $\mu$ M aumenta la incorporación de glucosa en las CGSOP, con un aumento en los niveles de GLUT4 y una mejora en la vía de señalización de insulina, disminuyendo p IRS1 Ser 312 y FOXO1, aumentando los niveles de AKT, p AKT , PPAR $\gamma$  y p FOXO1

Estos resultados demuestran que CGs SOP presentan un perfil metabólico y molecular diferente a CGs de mujeres con función ovárica normal, que las alteraciones moleculares de la vía metabólica IRS1/Akt son similares a las descritas en tejidos insulino resistentes clásicos. Esta disfunción metabólica podría contribuir con la alteración en el desarrollo folicular de la paciente SOP. La activación *in vitro* de PPAR  $\gamma$  a través de Rosiglitazona aumenta la expresión de GLUT4 en CG SOP , además modula la vía de señalización del receptor de insulina-IRS1-Akt en células de la granulosa de SOP mejorando la insulino resistencia de estas células

El incremento del transporte de glucosa en las células de la granulosa de las pacientes SOP, podría mejorar la competencia metabólica de los ovocitos en maduración, contribuyendo con esto a una mejor calidad ovocitaria en este grupo de pacientes

**ABSTRACT:** Polycystic ovary syndrome ( PCOS) is one of the most common endocrine metabolic disorders in reproductive age . 50-70% of patients develop hyperinsulinemia and insulin resistance (IR). Adipocytes and muscle cells of PCOS patients and IR shows lower glucose uptake under insulin stimulation , with a decrease in the expression of glucose transporter , particularly GLUT4 , and defects in the phosphorylation of IRS 1/2 , decreased activation of PI3-K/Akt and altered patterns of expression of IRS 1/2 . It has also established that transcription factors as FoxO1 and PPAR $\gamma$  receptors are key factors in the regulation of glucose metabolism and insulin response. Rosiglitazone (Rz), is a potent selective agonist for the PPAR $\gamma$  receptors, regulating the expression of genes involved in lipid and glucose metabolism. Current evidence has shown that glitazones increase the of insulin dependent glucose uptake in cultured myocytes and adipocytes and modulate the expression of GLUT4 . The information relating to the role and PPAR $\gamma$  FoxO1 in insulin signaling pathway in granulosa cells (GC) in patients with PCOS is virtually nonexistent. And the effect of the administration of pharmacological PPAR $\gamma$  agonists on insulin signaling pathway and these transcription factors is unknown . The objective of this thesis was to study in vitro the insulin signaling pathway, the role of PPAR $\gamma$  and FoxO1 and the PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone on insulin pathway in GC from PCOS patients (NIH type). For this purpose, in vitro studies in GCs from normal ovarian function women and PCOS patient, in presence or absence of insulin 100 ng/ml and preincubated with Rz were performed . Protein and GLUT4 mRNA levels were determined by Western blot (WB) and qRT- PCR respectively. The metabolic pathway of insulin signaling was assessed through expression of IRS1, Akt and its phosphorylated forms by WB. FoxO1 and PPAR $\gamma$  were studied with WB and immunofluorescence . A functional study of tritiated glucose uptake under insulin stimulation pre CG Rz incubated or not was performed . Our results show that PCOS GCs express lower levels Glucotransportadores 1 and 4, with less glucose uptake under insulin stimulation when compared with the control group. No differences in the protein levels of IRS-1 between the two study groups were found, but the levels of p IRS1 Ser 312, was significantly higher in PCOS GCs than in the Control GCs with lower expression of AKT and pAKT when compared with control. PPAR  $\gamma$  is decreased PCOS GCs while FOXO1 is increased, but with lower levels of p FOXO1 than in the Control GCS. The pre-incubation with 0.1  $\mu$ M Rosiglitazone increases glucose uptake in the PCOS GCs, with increased levels of GLUT4 and improved insulin signaling via decreasing pIRS1 Ser312,FOXO1 and increasing levels of AKT ,pAKT, pFOXO1 and PPAR $\gamma$ .

This results show that PCOS GCs have a different metabolic and molecular profile compare with GCs of women with normal ovarian function, the molecular alterations in the metabolic pathway IRS1/Akt are similar to those described in classical insulin -resistant tissues. This metabolic dysfunction may contribute to altered follicular development in PCOS patient. The in vitro activation of PPAR  $\gamma$  through Rosiglitazone increases GLUT4 expression and modulates the signaling pathway - IRS1 insulin receptor -Akt in granulosa cells from PCOS, improving insulin resistance of these cells.

Increased glucose transport in granulosa cells of PCOS patients could improve the metabolic competence of maturing oocytes, this contributing to a better egg quality in this group of patients



## 1. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

### Definición y epidemiología

El *síndrome de ovario poliquístico* (SOP) es reconocido en la actualidad como una de las alteraciones endocrino metabólicas más comunes en la edad reproductiva, aumentando altamente el riesgo de complicaciones metabólicas a largo plazo como la diabetes mellitas tipo 2. El 3-10% de la mujeres en la población general están afectadas por este síndrome (1-3). El SOP presenta una variedad de fenotipos clínicos y bioquímicos que se caracterizan entre otros por hipersecreción de LH, hiperandrogenismo clínico y/o bioquímico, producción acíclica de estrógeno, disminución de la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG). Además entre 65-70% de los casos se asocian a resistencia a insulina (IR) e hiperinsulinemia (4-6).

El SOP corresponde a una disfunción reproductiva, ya que impacta negativamente la fertilidad de la mujer, no sólo por su alteración de la ovulación, sino también por el alto índice de abortos espontáneos y recurrentes que presentan estas pacientes (7,8). Estudios que evalúan la calidad de los ovocitos de pacientes SOP, han encontrado una relación directa entre la obesidad, IR y mala calidad ovocitaria (9). Microarreglos en ovocitos de pacientes SOP demostraron una diferencia importante en el patrón de expresión génica al compararlos con ovocitos de mujeres normales, lo que podría explicar la baja fecundidad de estos ovocitos. Algunos de estos genes están involucrados en la alineación y segregación cromosómica durante la meiosis/mitosis, por lo que alteraciones durante la meiosis o desarrollo embrionario temprano podrían contribuir al mal progreso embrionario y posterior aborto observado en estas pacientes (10). Por otro lado, el metabolismo de la glucosa en las células de la granulosa (CG) principalmente, las células del cúmulo, juega un rol importante en el aporte de sustratos energéticos al folículo en maduración, influyendo así sobre la progresión folicular y maduración ovocitaria

Alteraciones metabólicas como la hiperinsulinemia, la IR y la obesidad son características prevalentes en el SOP, a las cuales actualmente se les asigna un papel relevante en la patogenia de este trastorno.

Las pacientes SOP anovulatorias presentan mayor tasa de IR que las mujeres SOP ovulatorias (11,12). Las mujeres obesas con fenotipo bioquímico y ultrasonográfico de SOP que han reducido su peso corporal mediante dieta, reducen sus niveles de insulina basal y/o postcarga; asociándose esta disminución de insulina con el restablecimiento parcial de los ciclos ovulatorios normales (12). Una de las evidencias más convincentes que vinculan la IR con las anomalías del ciclo reproductivo, está dada por el éxito de la administración de fármacos insulino-sensibilizantes en la restitución de la ovulación en mujeres con SOP (13).

Existe amplia evidencia de la resistencia periférica (tejidos muscular y adiposo) a la acción de la insulina en esta patología (11,14), pero a nivel ovárico la información es controversial ya que la esteroidogénesis en las células de la granulosa de pacientes con SOP persiste sensible a la acción de esta hormona, mientras que la utilización de glucosa mediada por insulina estaría desregulada (15,16).

La esteroidogénesis y foliculogénesis son dos procesos regulados en forma estricta por las gonadotropinas LH y FSH. LH regula la biosíntesis de andrógenos en las células de la teca ovárica, acción mediada por la enzima P450 c17 que genera el precursor Androstenediona que finalmente puede ser convertido a testosterona por acción de la 17 $\beta$  hidroxisteroide dehidrogenasa y este aromatizado a estradiol por la P450 aromatasas expresada en las células de la granulosa, acción regulada por FSH. Así tenemos que cuando las concentraciones de LH aumentan en relación a la concentración de FSH, la síntesis de esteroides ováricos es preferentemente hacia los andrógenos. Además se ha observado que insulina potencia la acción de LH, aumentando la síntesis de andrógenos en la teca. En el ovario y específicamente en las células de la teca, insulina potencia la acción de LH, sinergizando la producción de andrógenos. Si bien aún se desconoce el nivel al cual la insulina regula la esteroidogénesis ovárica, se piensa que sería a través de mecanismos de la estabilización de mRNA de enzimas esteroidogénicas, como la P450 c17 (17). Por lo que el aumento en la producción de andrógenos que se observa en estas pacientes sería una combinación de mayor activación intrínseca de la teca potenciada por una mayor estimulación trófica dada por insulina.

La evidencia en células ováricas es muy escasa tanto en células normales como en células provenientes de pacientes con SOP. Es de gran interés conocer qué vías se gatillan al unirse insulina a su receptor.

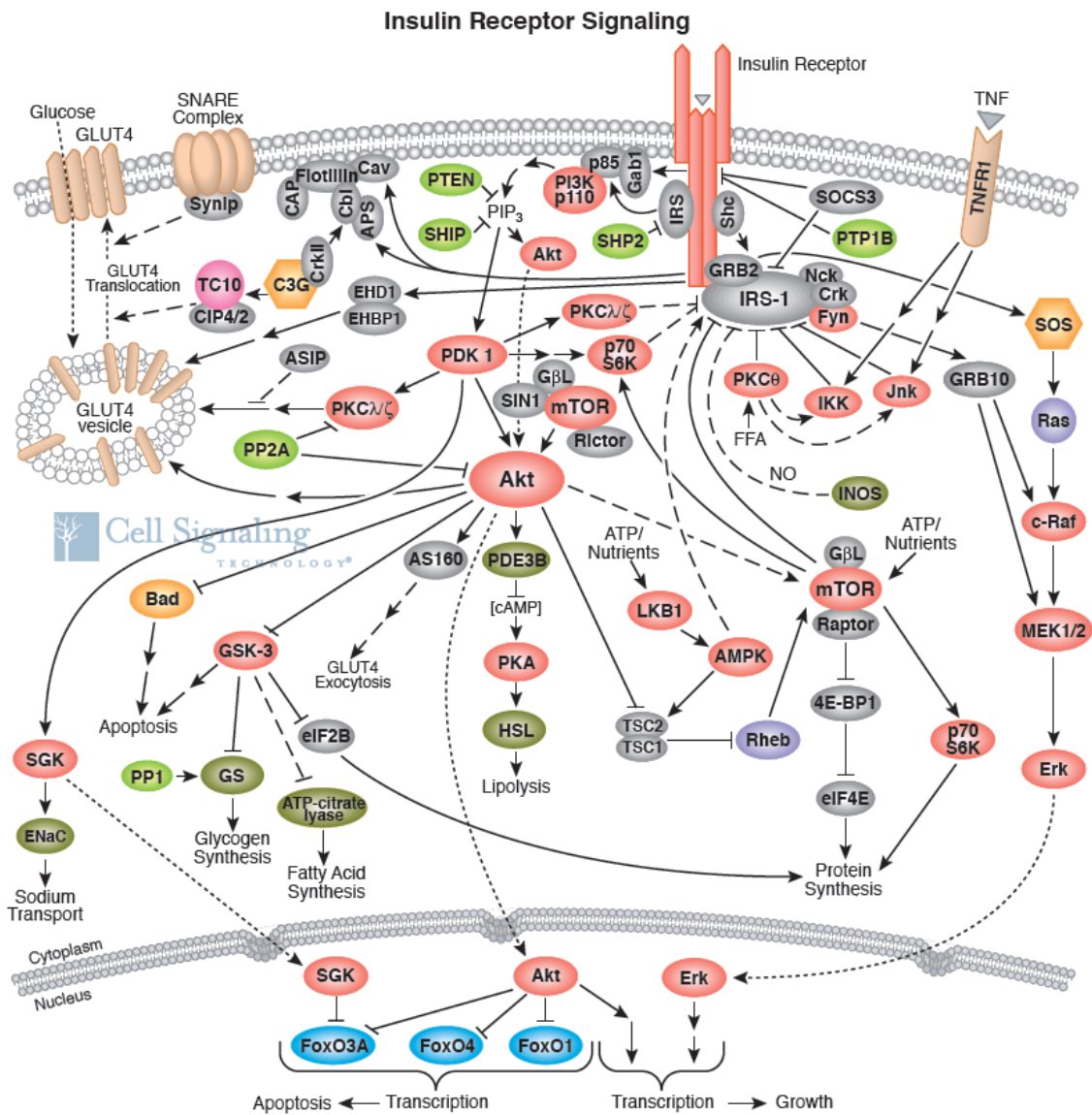
El metabolismo de la glucosa en las células de la granulosa juega un rol importante en el aporte de sustratos energéticos al folículo en maduración (15). Los *transportadores facilitadores de glucosa (GLUTs)* son reguladores claves en la captación de este azúcar desde el compartimiento extracelular al intracelular y permiten mantener un flujo constante de glucosa disponible para el metabolismo energético intermediario (18). Hasta el momento se han descrito 12 isoformas de GLUTs, de los cuales **GLUT1**, **GLUT3** y **GLUT4** se expresan en células de la granulosa y teca de ovinos, bovinos y murinos (19,20). Estos transportadores varían en su grado de afinidad por la glucosa, siendo GLUT1 responsable de la captación y almacenamiento basal de este azúcar en todas las células (21). GLUT3 es un transportador de alta afinidad abundante en aquellos tejidos que presentan un alto requerimiento de glucosa, como son el cerebro, los testículos y la placenta (22-24). GLUT4 regula la captación rápida de glucosa desde el plasma hacia las células del músculo esquelético y cardíaco, los adipocitos, las células placentarias y endometriales (21,25, 26).

### **Insulino resistencia en tejidos periféricos y tejidos reproductivos**

La IR se define clásicamente como la capacidad disminuida de la insulina de mediar la captación de glucosa, producción de glucosa y lipólisis, necesitándose cada vez niveles superiores de la hormona para poder realizar estas funciones metabólicas (15). Estudios en músculo esquelético y tejido adiposo, blancos clásicos de la IR en pacientes con SOP y diabéticos tipo 2, han determinado que existe una menor incorporación de glucosa bajo estímulo de insulina, coincidente con una menor expresión de los transportadores de glucosa, en especial GLUT4 (27,28).

La insulina es una hormona peptídica que actúa a través de su receptor (RI) el que se ubica en la membrana plasmática y pertenece a la familia de receptores de factores de crecimiento con actividad tirosina quinasa intrínseca (29,30). Luego de la unión de insulina, el RI se

autofosforila en múltiples residuos de tirosina, dando lugar a su propia activación y de las proteínas substratos del receptor de insulina 1 y 2 (IRS1/2). Estos substratos usualmente denominados proteínas de andamiaje, reclutan a otras proteínas señalizadoras específicas y activan diversas cascadas de señalización, que controlan los múltiples procesos biológicos dependientes de insulina, entre los que se incluyen la translocación de vesículas que contienen GLUT4 desde el compartimento citoplasmático hasta la membrana plasmática, la activación de glicógeno sintetasa y el inicio de transcripción génica (30) (Figura 1).



**Figura 1: Vías de señalización de insulina en tejidos insulino sensibles**

[www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com) Insulin receptor signaling

En particular la fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K) es una unidad reguladora clave en la vía de señalización del receptor de insulina, la cual es activada por la unión de los IRS a su subunidad reguladora p85. La PI3K cataliza la fosforilación de fosfolípidos, activando las proteínas PDK-1 y PDK-2 encargadas de la fosforilación y activación Akt, también denominada como proteína kinasa B (PKB). La activación de Akt regula la síntesis de glicógeno, modula la lipólisis e interviene en la translocación de las vesículas de GLUT4 a la membrana plasmática (7,8).

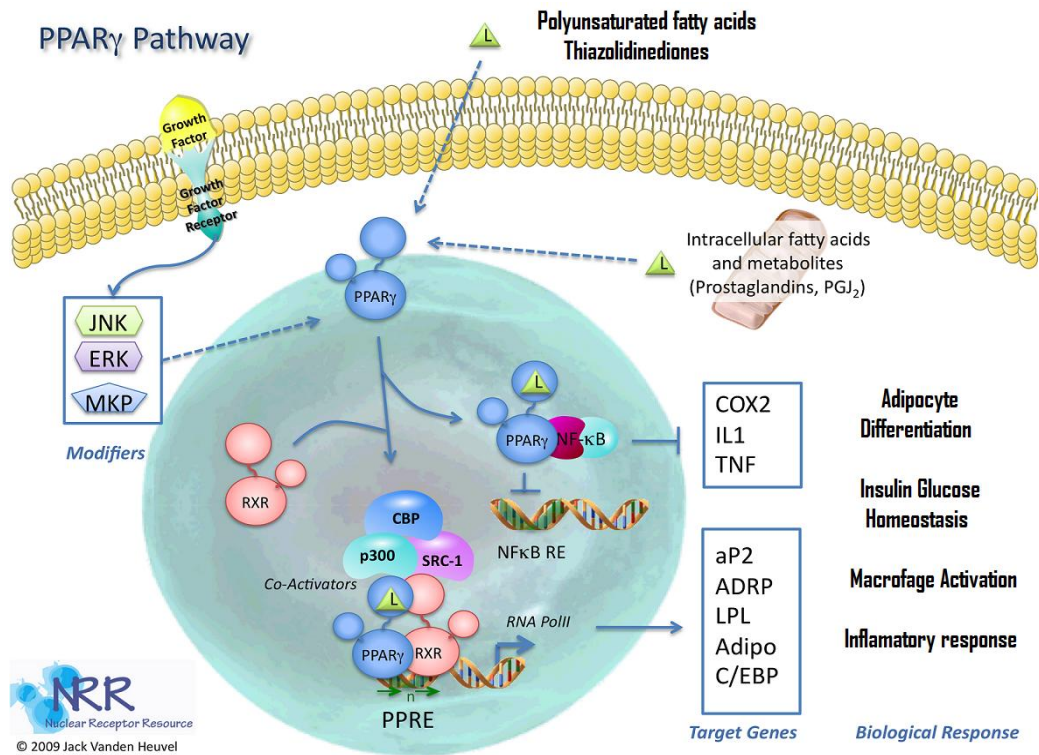
*Rosenbaum et al 1993* y *Ciaraldi et al 1992*, entre otros investigadores, han relacionado la IR en pacientes con SOP a una alteración en el transporte de glucosa dependiente de insulina en adipocitos y células musculares, sin que existan cambios en la expresión del RI o en la unión de la hormona a su receptor en los tejidos estudiados. Sin embargo, se han establecido alteraciones en la autofosforilación del RI en tejidos adiposo, muscular y ovárico de estas pacientes, así como también en el tipo de fosforilación de IRS-1, prevaleciendo las fosforilaciones en serina en lugar de tirosina, siendo este un mecanismo de regulación negativa de la vía traduccional del RI (31). Por otra parte, disminuciones en los niveles de IRS-1 resultan en una disminución de actividad de PI3K/AKT, encontrándose también una reducción en los niveles de GLUTs, principalmente de GLUT4 en diferentes tejidos de mujeres con SOP como: músculo, adipocitos y endometrio (32, 34).

Es muy poco lo que se conoce actualmente sobre la vía de señalización metabólica de insulina en células ováricas de mujeres con SOP. Investigaciones previas han mostrado una menor producción de lactato e incorporación de glucosa a glicógeno bajo el estímulo de insulina en células de la granulosa de pacientes con SOP (15,16, 35). No se han encontrado diferencias en la activación de vías mitogénicas mediada por insulina en comparación con pacientes que poseen una función ovárica normal. Incluso se ha observado un tasa proliferativa mayor en células de la granulosa SOP, lo que podría relacionarse con el mayor riesgo que tienen estas pacientes de presentar síndrome de hiperestimulación ovárica cuando son sometidas a ciclos de IVF.

Además, la producción de progesterona dependiente de insulina tampoco presenta diferencias entre estos grupos de pacientes (15,36), sugiriendo que la resistencia periférica descrita en otros tejidos, como músculo y tejido adiposo, también estaría presente en células de la granulosa, pero restringida solamente a las vías metabólicas estimuladas por insulina (incorporación y metabolización de glucosa) dado que la función proliferativa y esteroidogénica de esta hormona se presentan conservadas en pacientes con SOP (79). Además también se ha postulado que insulina podría actuar a través del receptor de IGF-1 en células de granulosa. Por otro lado luteinizadas de pacientes con SOP han mostrado un aumento en los niveles de los RNAm para el receptor de insulina, isoformas de IR-A e IR-B (36) y un desbalance en la relación IRS1/IRS2 en células de la granulosa SOP (10,11,22,23).

### **Significado de los receptores de *PPAR* $\gamma$ y *FoxO1* en la resistencia a insulina**

*FoxO1* y *PPAR* $\gamma$  son factores de transcripción claves que regulan el metabolismo de la glucosa y la respuesta a insulina en tejidos insulino sensibles. Los *receptores activadores de proliferación peroxisomal (PPAR)*, pertenecen a la familia de receptores nucleares, hasta la fecha se han descrito 3 integrantes: *PPAR*  $\alpha$ , *PPAR*  $\delta/\beta$  y *PPAR*  $\gamma$ , cada uno con diferente expresión tisular y papel funcional. *PPAR* $\gamma$  se expresa principalmente en tejido adiposo y secundariamente en tejido muscular, pero su expresión también se ha documentado en tejido ovárico de ratas y humanos (37). *PPAR* $\gamma$  juega un papel crítico en el metabolismo energético y la homeostasis de la glucosa, contribuyendo a mantener la sensibilidad a la insulina (Figura 2).



**Figura 2: Vías de señalización y principales funciones del receptor PPAR $\gamma$ .** Se observan sus ligandos endógenos como ácidos grasos polinsaturados, prostaglandinas y exógenos como tiazolidinodionas (Rosiglitazona). PPAR $\gamma$  al unir su ligando se dimeriza con su cofactor RXR, migra al núcleo y recluta coactivadores o correpresores dependiendo del ligando unido, activando o reprimiendo la transcripción de genes blanco.

[www.nrresource.org](http://www.nrresource.org) PPAR $\gamma$  Pathway

Como se había mencionado previamente, la administración de fármacos insulino-sensibilizantes, como biguanidas y tiazolidinodionas o glitazonas mejoran la función ovárica de las pacientes con SOP. La metformina es una biguanida que se utiliza en el manejo de pacientes diabéticos tipo 2 y pacientes con insulino resistencia. Este fármaco actúa como insulino sensibilizador reduciendo la gluconeogénesis y glicogenolisis hepática, incrementando la sensibilidad a insulina al aumentar la utilización de glucosa por los tejidos periféricos como lo son el musculo y tejido adiposo, por aumento de la actividad de la PI3K y del receptor de insulina (38). No se ha descrito receptor específico para metformina ni que este fármaco interactúe con PPAR $\gamma$ .

Rosiglitazona pertenece a la familia de la tiazolidinodionas, es un agonista potente y selectivo de los receptores **PPAR $\gamma$** , regulando la expresión de genes participantes en metabolismos de lípidos y glucosa (39). Su función como insulino sensibilizador hizo que se utilizara como parte de la terapia en pacientes diabéticos tipo 2 y pacientes con IR con mala respuesta metabólica a metformina. En la actualidad su uso terapéutico ha disminuido producto del aumento de eventos cardiovasculares entre los usuarios de este fármaco (40), motivo por el cual su utilización en este proyecto de tesis será *in vitro*. En el caso particular de la glitazonas, fármacos que actúan como agonistas de los **receptores PPAR $\gamma$** , su acción podría ser directa a nivel ovárico a través de la activación de sus receptores, o indirecta a través de la disminución de los niveles periféricos de insulina (41, 42). La evidencia actual ha mostrado que las glitazonas incrementan la incorporación de glucosa dependiente de insulina en cultivos de miocitos y adipocitos, modulando la expresión de los GLUTs (43-45). Al unir su ligando, **PPAR** experimenta un cambio conformacional que lo libera de sus corepresores facilita la unión de coactivadores, produce la unión de **PPAR $\gamma$**  al promotor de GLUT4, aumentando su transcripción y mejorando la respuesta a insulina (46).

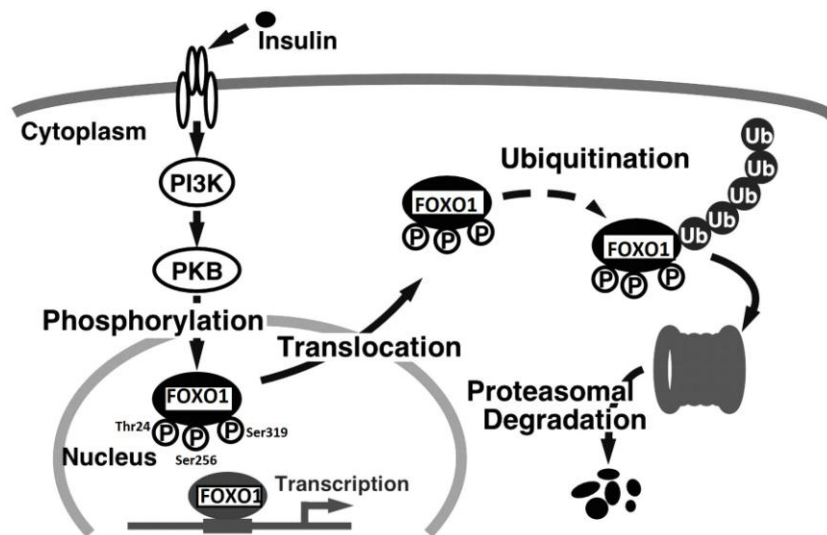
En tejidos musculares de mujeres con SOP, IR y tratadas con tiazolidinodionas, se ha descrito un aumento en la expresión del RNAm de GLUT4 así como un cambio en la fosforilación de proteínas mediadoras de la señalización de insulina (46,47). En relación al efecto de glitazonas en la granulosa humana la evidencia actual es escasa. Rosiglitazona y pioglitazona disminuyen la producción de testosterona mediada por gonadotropina e insulina en células ováricas y de la granulosa de mujeres control, así como aumentan la expresión de algunos de los mediadores de la vía de señalización de insulina (35,48). Estudios en células de la granulosa de mujeres con SOP son escasos y la evidencia en relación al papel de los receptores **PPAR $\gamma$**  en esta patología es nula.

**Forkhead box O (FoxO)** pertenece a la familia de factores de transcripción que regulan la expresión de genes involucrados en la reparación del DNA, apoptosis, regulación del ciclo celular, tolerancia al estrés oxidativo y metabolismo. Estos factores se expresan en forma ubicua en diferentes tejidos y hasta la fecha se han descrito distintas isoformas (FoxO1, FoxO 3, FoxO 4, FoxO6) (49). FoxO está compuesto por 4 dominios, N-terminal que contiene el



sitio de fosforilación para Akt, un dominio de unión al DNA (“forkhead domain”), dominio de localización nuclear, una secuencia de exportación nuclear y un dominio C- terminal de tras-activación. La subfamilia O de los factores de transcripción de tipo Forkhead box, son blancos directos de la acción de insulina, regulando el metabolismo y supervivencia celular frente a cambios nutricionales y estrés ambiental.

*FoxO1* es la isoforma más abundante en órganos con respuesta a insulina, como son los tejidos hepático, adiposo, muscular y las células β del páncreas. Su función es regulada a través de distintos mecanismos, como su fosforilación en residuos de serinas/treoninas mediada por Akt, señal río abajo de la vía transduccional del IR. Esta fosforilación regula negativamente a *FoxO1*, inactivándolo y excluyéndolo del núcleo hacia el citoplasma, facilitando su ubiquitinación y posterior degradación (50) (Figura 3).



**Figura 3: Regulación de FoxO1.** PKB/Akt estimulada por insulina fosforila al factor *FoxO1* en 3 residuos de serina/treonina altamente conservados Thr24, Ser256 y Ser319, lo cual produce la exclusión nuclear de *FoxO1* facilitando su degradación citoplasmática por el proteosoma. Modificado de :PNAS, Sept30, 2003 vol 100, 20: 11284.

*FoxO1* se activa durante el ayuno para estimular gluconeogénesis hepática, mientras que en el período postprandial insulina inhibe a *FoxO1* hepático, promoviendo la expresión de genes que participan en la metabolización de la glucosa, su oxidación y almacenamiento como ácidos grasos. Utilizado como modelo de estudio ratones genéticamente modificados se ha

establecido en parte el papel de *FoxO1* en el metabolismo glucídico y lipídico. Los ratones doble knockout para *IRS1/2* desarrollan IR e intolerancia a la glucosa, encontrándose en ellos a *FoxO1* hiperactivado. La delección hepática de *FoxO1* en estos ratones restablece en forma parcial la respuesta al ayuno y alimentación, alcanzando niveles de insulina y glucosa cercanos a la normalidad (51). Por otro lado, la hiperactivación de *FoxO1* produce disfunción mitocondrial, alterando el metabolismo oxidativo y llevando a la acumulación de lípidos a nivel hepático. Ratones haploinsuficientes para *FoxO1* (*FoxO<sup>+/-</sup>*), sometidos a dieta rica en grasa, presentan menor resistencia a la insulina que los ratones controles. Además luego de un clamp euglicémico, estos ratones mejoran la supresión de la gluconeogénesis hepática basal e inducida por insulina (52). Por lo tanto, la hiperactivación de *FoxO1* en la resistencia a la insulina produce hiperglicemia y dislipidemia, dos alteraciones muy frecuentes en diabetes tipo 2 y síndrome metabólico. La haploinsuficiencia de este factor protegería en cierta medida del desarrollo de IR y diabetes

### **FoxO1 y PPAR $\gamma$**

En adipocitos se ha observado que la expresión de *FoxO1* reprime la actividad transcripcional del promotor de *PPAR $\gamma$*  a través de una unión directa entre los factores transcripcionales, independiente de su unión al DNA, impidiendo que *PPAR $\gamma$*  se una con los elementos de respuesta a su promotor (53,54). La administración de insulina suprime en forma dosis dependiente el efecto represor de *FoxO1* sobre *PPAR $\gamma$* . Ratones haploinsuficientes para *FoxO1* (*FoxO1<sup>+/-</sup>*) presentan mayores niveles del RNAm para *PPAR $\gamma$*  y el tratamiento con tiazolidonas mejora los niveles sistémicos de insulina, glucosa basal y post-carga al compararlos con los controles. (50-53). La evidencia actual en tejidos provenientes de pacientes SOP es escasa. En biopsias de endometrio de mujeres con SOP con hiperinsulinemia se observó una expresión aumentada de *p-FoxO1* así como una mayor localización de *FoxO1* en el citoplasma (54). Esto se correlacionó con niveles elevados de *PPAR $\gamma$* , tanto a nivel de su mensajero como proteína, encontrándose además bajos niveles del RNAm para GLUT 4 (54). Si bien se ha documentado la expresión de *FoxO1*, *FoxO3* y *FoxO4* por RT-PCR en células de la granulosa humana y a través del estudio en ratones knockout se ha logrado establecer su papel en la foliculogénesis y atresia folicular (55-57), la evidencia en relación al

papel que juegan *FoxO1* y *PPAR $\gamma$*  en la vía de señalización de insulina en células de la granulosa de pacientes con SOP es prácticamente inexistente. Así como también la evidencia relativa al efecto de la administración de agonistas farmacológicos de *PPAR $\gamma$*  sobre la vía de señalización de insulina y estos factores transcripcionales.

Teniendo estos antecedentes en consideración nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo.

## **2. HIPÓTESIS**

*La actividad de la vía transduccional del receptor de insulina que modula el transporte de glucosa a través de GLUT4 está alterada negativamente en células de granulosa de mujeres con síndrome de ovario poliquístico. La activación de PPAR- $\gamma$  mejora la insulino resistencia de estas células, aumentando la expresión de GLUT4 y modulando la vía de señalización de Insulina.*

## **3. OBJETIVOS GENERALES**

- Determinar y comparar la actividad de la vía de señalización del receptor de insulina-IRS1-Akt en células de la granulosa de mujeres con función ovárica normal y con SOP
- Determinar *in vitro* el efecto de la administración de agonistas de PPAR sobre la vía de señalización metabólica de Insulina y el metabolismo de la glucosa en células de la granulosa de pacientes con SOP.

#### **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL**

Nota: El grupo control está constituido por mujeres con función ovárica normal, que participan en el programa FIV por causa masculina de infertilidad. Sus criterios de exclusión son: Duración del ciclo menstrual <25 ó >35 días. Resistencia a la insulina, diabetes o hijas de madres con insulino resistencia, presencia de signos de hiperandrogenismo clínico-bioquímico, endometriosis.

***Objetivo específico 1. Determinar el transporte de glucosa y expresión del transportador GLUT4 en células de la granulosa luteinizadas de mujeres normales y con SOP.*** A fin de responder a este objetivo, células de la granulosa de mujeres normales y con SOP se expusieron a diferentes tiempos y 100 ng/ml de insulina, para determinar la captación de glucosa mediante el uso de 2-deoxiglucosa marcada y los niveles de GLUT4 por Western blot e inmunocitoquímica

***Objetivo específico 2. Estudiar la activación de la vía transduccional metabólica del receptor de insulina-IRS1-Akt en células de granulosa de mujeres normales y con SOP.*** Para este objetivo células de la granulosa luteinizadas de mujeres normales y con SOP se expusieron a 100 ng/ml de insulina y se evaluaron los niveles de las formas totales y fosforiladas de IRS1, y Akt por Western blot.

***Objetivo específico 3. Estudiar la expresión y localización de FoxO1 y PPAR $\gamma$  en células de granulosa de mujeres normales y pacientes con SOP.*** Con este fin, células de la granulosa luteinizadas de mujeres normales y con SOP se expusieron a 100 ng/ml insulina y se evaluaron los niveles y distribución subcelular de PPAR $\gamma$  y FoxO1 por Western blot, inmunofluorescencia e Inmunocitoquímica ,respectivamente.

***Objetivo específico 4. Determinar el efecto del agonista de PPAR $\gamma$  (Rosiglitazona) sobre los parámetros descritos en los objetivos anteriores en células de granulosa de pacientes con SOP.*** Para este objetivo células de la granulosa luteinizadas de mujeres normales y SOP se preincubaron con Rosiglitazona 0,01 – 1  $\mu$ M por 12 horas y luego se destinaron a cada uno de los experimentos de incorporación de glucosa post estímulo con insulina 100 ng/ml. Del

resultado de este experimento se estableció la concentración de Rosiglitazona a utilizar para la pre incubación de los experimentos posteriores que fue de 0,1  $\mu$  M. Células de la granulosa luteinizadas de mujeres normales y SOP se pre-incubaron con Rosiglitazona 0,1  $\mu$  M por 12 horas y luego se destinaron a los experimentos respectivos según lo descrito en los Objetivos 1, 2 y 3.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

**5.1. Sujetos:** Mujeres participantes del programa de Fertilización in vitro (FIV) del Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI) Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, Servicio de Ginecología y Obstetricia del Complejo de Salud San Borja Arriarán. Cada paciente firmó un consentimiento informado, aprobado por el Comité de Ética institucional y de la Facultad de Medicina, el cual se incluye.

- **Grupo de estudio:** Mujeres participantes en el programa de FIV con diagnóstico de SOP y resistencia a la Insulina según los criterios NIH (hiperandrogenismo clínico o bioquímico y oligoanovulación), HOMA IR e ISI composite, respectivamente.
- Criterios de exclusión: Mujeres con hiperprolactinemia (prolactina  $>35$  ng/mL), hipotiroidismo (TSH  $>5$  UI/L), tumores secretores de andrógenos (testosterona total  $>2$  ng/mL; DHEAS  $> 3.600$   $\mu$ g/mL), síndrome de Cushing (cortisol urinario  $<150$   $\mu$ g/24 h y concentración plasmática en ayunas  $5-25$   $\mu$ g/dL), hiperplasia suprarrenal congénita (17-OH progesterona  $>2,5$  ng/mL) y mujeres con diabetes mellitus
- **Grupo control:** Mujeres con función ovárica normal del programa FIV por causa masculina absoluta de infertilidad. Criterios de exclusión: Duración del ciclo menstrual  $<25$  ó  $>35$  días. Resistencia a la insulina, diabetes o hijas de madres con insulino resistencia, presencia de signos de hiperandrogenismo clínico-bioquímico, endometriosis

## 5.2. Fenotipificación de los grupos:

- Antropometría: IMC, circunferencia abdominal y de cadera
- Hormonal: testosterona total, SHBG, DHEAS, 17 OHP, PRL, TSH, índice de andrógenos libres IAL  $((\text{testosterona total} \times 3.467)/\text{SHBG}) \times 100$  IAL  $\geq 4,5$  hiperandrogenismo
- Metabólico: glicemia en ayunas, insulina basal y post carga, PTGO, índice de HOMA IR:  $(\text{Insulina} \times \text{glucosa})/22.5$  Resistencia a insulina HOMAIR  $\geq 2,5$ , Índice de sensibilidad insulina (ISI) composite: ISI-composite:  $10,000 / \text{raíz cuadrada de } [(\text{media insulina en plasma} \times \text{media glucosa en plasma durante PTGO}) \times (\text{glucosa plasmática ayuna} \times \text{insulina plasmática en ayunas})]$ . (58,59),
- Ecografía transvaginal, para establecer volumen ovárico y conteo de folículos antrales

## 5.3. Tamaño muestral:

El número de participantes necesarios para este estudio se calculó a un nivel  $\alpha$  del 5% y  $\beta$  de 20% y considerando un error estándar de 0,20 unidades relativas de la expresión de GLUT4, valor obtenido de los resultados preliminares de este estudio. Estando interesados en detectar, al menos, una diferencia en las medias del 50 %, resulta en un mínimo de 8 sujetos necesarios por cada grupo de estudio. Se estima que la cantidad de células obtenida de cada paciente será destinada para 1 o 2 ensayos, resultando un número total de 32 sujetos incorporados al estudio.

#### **5.4. Materiales**

2-Deoxi-D-(1-<sup>3</sup>H) glucosa (DOG) 250 µCi (GE Healthcare), 2-Deoxi-D-glucosa grado III (Sigma), Insulina de páncreas bovino (Sigma).

Medios de cultivo: Medio M199 (Sigma), 200 mM L-glutamina, 50 mg/ml, seroalbúmina bovina (BSA) 0,1 % v/v. + Suero fetal bovino 10%, Medio privación: M 199 (Sigma), 200 mM L-glutamina, 50 mg/ml, seroalbúmina bovina (BSA) 0,1 % v/v. Buffer transporte (KRH): 50 mM HEPES, 136 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.25 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.25 mM CaCl<sub>2</sub> a pH 7.4. Buffer lisis: Tris HCl + 0.2% SDS, pH: 8.0.

Anticuerpos: IRS1 anticuerpo policlonal de conejo, pIRS1 (Ser312) anticuerpo policlonal de conejo, Akt anticuerpo monoclonal de conejo (Cell Signaling), pAkt (Ser473) anticuerpo monoclonal de conejo (Cell Signaling), FoxO1 anticuerpo monoclonal de conejo (Cell Signaling), pFoxO1 (ser319) anticuerpo policlonal de conejo (Cell Signaling), Glut 4 anticuerpo policlonal de conejo (Chemicon) PPAR $\gamma$  (H-100) anticuerpo policlonal de conejo (Santa Cruz), Alexa Fluor 488 goat anti-conejo (Invitrogen)

Otros reactivos: RNeasy Mini kit (Qiagen), IMPROM II reverse transcription system (Promega). Platinum® Sybr® Green qPCR super mix UDG (Invitrogen). Histostain® SP Broad Spectrum (AEC) (Invitrogen)

#### **5.5. Aislamiento y cultivo de células de la granulosa**

Las células de la granulosa se obtuvieron por medio de aspiración folicular durante el procedimiento de FIV de pacientes bajo inducción controlada de la ovulación. Previo a la inducción ovulatoria las pacientes recibieron 1 ciclo de anticonceptivos orales combinados levonorgestrel 0,150 mg /Ethinilestradiol 0,03 mg. La ovulación se indujo administrando a las pacientes hormona folículo estimulante recombinante (FSHr), antagonistas de GnRh y gonadotropina menopáusica humana (hMG) para producir el reclutamiento y desarrollo folicular, seguido de una dosis única de gonadotropina coriónica humana (hCG) 36 h antes de



la aspiración de los ovocitos. Las células de la granulosa se aislaron desde el aspirado folicular después de la recolección de los ovocitos. El fluido folicular de la primer aspiración libre de células fue centrifugado a 400 g por 5 min y almacenado a -20 °C para la posterior medición de glucosa e insulina. La obtención de células de la granulosa y su posterior cultivo es una técnica utilizada largamente en nuestro laboratorio según protocolo (60-62).  $3 - 5 \times 10^5$  células/pocillos se sembraron para los experimentos: Western blot, incorporación de deoxiglucosa tritiada, PCR en tiempo real y PCR convencional. Entre  $15 - 25 \times 10^4$  células/pocillos se sembraron para los experimentos de inmunocitoquímica e inmunofluorescencia. Las células se cultivaron a 37°C en una incubadora con control de humidificación y 5% de CO<sub>2</sub> en medio de crecimiento por 4 días con cambio de medio cada 48 h. Luego de este período, las células se privaron con medio M199 + 0.1 % BSA libre de SFB por 24 h, para ser sometidas posteriormente a los diferentes estímulos.

#### **5.6. Inmunocitoquímica de GLUT 4**

Aproximadamente  $3 \times 10^4$  células/pocillo se cultivaron sobre portaobjetos. Luego de 48 h se fijaron con metanol puro por 20 min, se lavaron con PBS 1x, luego se hidrataron a porcentajes decrecientes de alcohol, se trataron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1.5% en metanol durante 30 min (para desactivar peroxidasa endógenas) y se lavaron 3 veces con PBS 1X. Posteriormente se utilizó el kit Histostain-SP Kits (Invitrogen, USA) que utiliza el sistema de detección conocido como amplificación estreptavidina-biotina utilizando HRP y su sustrato cromogénico aminoetilcarbazol (AEC) para el bloqueo y revelado de la presencia del antígeno de interés. Para este propósito cada portaobjetos se bloqueó por 30 min. El inmunomarcaje se realizó con anticuerpo primario monoclonal de conejo anti- GLUT4 a una dilución de 1:500 incubando las láminas toda la noche a 4°C. A continuación, se realizaron tres lavados con PBS 1X y se incubó con anticuerpo secundario biotinilado de amplio espectro por 1 h en cámara húmeda, se lavó con PBS 1X, se aplicó la enzima conjugada por 20 min. Posteriormente, se agregó el cromógeno AEC en oscuridad durante 5 a 10 min y se lavó con agua destilada. Se realizó contrateñimiento con hematoxilina de Harris, para visualizar los núcleos, se lavó con agua destilada y se puso los portaobjetos en PBS 1X hasta que estos se tornaron azules. Se midió el Expression Level Score (ELS), que corresponde al producto del

porcentaje de área marcada y el promedio de la densidad de la marca, el cual determina la expresión total de la tinción para GLUT4 en células de la granulosa grupo control y SOP. El cálculo del ELS se realizó mediante el programa Image Pro Plus 6.2 (Media Cybernetics. MD, USA).

### **5.7. Inmunofluorescencia de PPAR $\gamma$**

Aproximadamente  $3 \times 10^4$  células/pocillo se cultivaron sobre portaobjetos. Luego de 48 h, un grupo de células se incubó con Rosiglitazona ( $0,1 \mu\text{M}$ ) por 12 h. Además otro grupo se estimuló con insulina 100 ng/ml por 1 h. Luego las células se fijaron con metanol puro, se permeabilizaron con Triton X- 100 al 0,2% por 30 min. Se bloqueó la unión inespecífica del anticuerpo con la solución 1A del kit Histostain<sup>®</sup> SP Broad Spectrum (AEC) (Invitrogen). Se agregó el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-PPAR $\gamma$  en dilución 1: 200 primario y se incubó toda la noche a 4°C. La unión del anticuerpo se evaluó utilizando Alexa Fluor 488 cabra anti-conejo a concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$  como anticuerpo secundario. Se utilizó DAPI 1: 1000 para marcación nuclear goat. La inmunomarcación de las proteínas se evaluó en microscopio Olympus bx, utilizando programa Image pro 6.2 (Media Cybernetics. MD, USA) con una magnificación de 40 x.

### **5.8. Inmunocitoquímica de FOXO1**

Aproximadamente  $3 \times 10^4$  células/pocillo se cultivaron sobre portaobjetos. Luego de 48 h, un grupo de células se incubó con rosiglitazona ( $0,1 \mu\text{M}$ ) por 12 h. Además otro grupo se estimuló con Insulina 100 ng/ml por 1 h. Luego se fijaron con metanol puro por 20 min., se lavaron con PBS 1x y se hidrataron a porcentajes decrecientes de alcohol, se permeabilizaron con Triton X- 100 al 0,2% por 30 min y se trataron con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 1.5% en metanol durante 30 min (para desactivar peroxidasas endógenas) y se lavaron 3 veces con PBS 1x. Posteriormente se utilizó el kit Histostain-SP Kits (Invitrogen, USA) que utiliza el sistema de detección conocido como amplificación estreptavidina-biotina utilizando HRP y su sustrato cromogénico aminoetilcarbazol (AEC) para el bloqueo y revelado de la presencia del antígeno de interés. Para esto se bloqueó cada portaobjetos por 30 min. El inmunomarcaje se realizó el

con anticuerpo primario monoclonal de conejo anti- FOXO1 a una dilución de 1:200 incubando las láminas toda la noche a 4°C. A continuación, se realizaron tres lavados con PBS 1X y se incubó con anticuerpo secundario biotinilado de amplio espectro por 1 h en cámara húmeda, se lavó con PBS 1x, se aplicó la enzima conjugada por 20 min. Posteriormente, se agregó el cromógeno AEC en oscuridad durante 5 a 10 min y se lavó con agua destilada. Se realizó contratinción con hematoxilina de Harris, para visualizar los núcleos, se lavó con agua destilada y se puso los portaobjetos en PBS 1x hasta que estos se tornaron azules. Se evaluó la inmunomarcación de las proteínas se evaluó en microscopio Olympus bx, utilizando programa Image pro 6.2 (Media Cybernetics. MD, USA) con una magnificación de 40 x.

### 5.9. PCR en tiempo real

La expresión de los *PPAR $\gamma$*  y *GLUT4* en células de la granulosa luteinizadas se determinó por PCR en tiempo real.  $5 \times 10^5$  células/pocillos se lisaron con 350  $\mu$ l de buffer RTL (Buffer de tiocianato de guanidina) adicionado con 2- $\beta$  mercaptoetanol y se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$  para posterior análisis. El RNA total se extrajo mediante el empleo del Kit RNeasy Mini de Qiagen (según protocolo del fabricante). La concentración de RNA se evaluó usando espectrofotómetro NanoDropND-100 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE). 1  $\mu$ g de RNA se trató con RQ1-ribonuclease-free deoxyribonuclease (Promega Corp., Madison, WI) luego se realizó la transcripción reversa de RNA a cDNA siguiendo el protocolo IMPROM II reverse transcription system (Promega corp.) 200 ng de cDNA se utilizaron para la reacción PCR en tiempo real, con Platinum SYBR Green qPCR SuperMIX-UDG (Invitrogen) y los oligonucleótidos para *PPAR $\gamma$*  5' AGG CGA GGG CGA TCT TGA CCA 3'/5' ACC AGG AAT GCT TTT GGC ATA CTC T 3' fragmento de 221 pb y *GLUT 4* 5' TGC AGT TTG GGT ACA ACA TTG 3'/5' ATG AGG AAG GAG GAA ATC ATG 3' fragmento de 190 pb. La gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) se utilizó como gen de referencia. La PCR en tiempo real se realizó con el termociclador MJ Research PTC-200 (Chromo 4 Continuos fluorescence detector) y el programa Opticon Monitor 3.1.32 (MJ Geneworks USA Biorad). Para el cálculo de la expresión relativa de cada gen se utilizó el método de  $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ , el cual se calculó  $\Delta\text{Ct}$ : Ct de gen – Ct gen normalizador.

$\Delta\Delta\text{Ct}$ :  $\Delta\text{Ct}$  muestra -  $\Delta\text{Ct}$  calibrador.

## 5.10. Extracción de proteínas totales

$3 \times 10^5$  células/pocillo se sembraron y cultivaron por 48 h, luego se privaron de suero fetal bovino por 24 h, posteriormente un grupo de células se pre-incubo por 12 h con Rosiglitazona ( $0.1 \mu\text{M}$ ). Luego de esto un grupo se estimularon con insulina  $100 \text{ ng/ml}$ . Para determinar el tiempo al cual se evaluar los cambios en fosforilación se realizó una curva temporal a tiempo 0-5-15-30-60 min, a partir de la cual se estableció el período de estimulación a utilizar en los experimentos posteriores sería de 60 min. Las células tratadas se lavaron con PBS, se cosecharon con  $500 \mu\text{l}$  de PBS + PMSF 1x, luego de centrifugar y eliminar sobrenadante, el pellet de células se homogenizo con  $30 \mu\text{l}$  de buffer de lisis:  $10 \text{ mM}$  Tris-HCl,  $10 \text{ mM}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaHPO}_4$ ,  $130 \text{ mM}$  NaCl, 1% Triton X-100,  $10 \text{ mM}$  PPI (pH 7.5) (BD Pharmingen, BD Bioscience), al cual se le adicionará un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma Aldrich) y de fosfatasa (Fluoruro de sodio  $1\text{M}$  y ortovanadato de sodio  $1\text{M}$ ). Los extractos de proteínas se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$ . La concentración de las proteínas se determinó por el método de Bradford (BIO-RAD).

## 5.11. Western blot

La expresión de IRS1, p-IRS1, Akt, p-Akt, FoxO1, p-FoxO1, PPAR  $\gamma$  y GLUT4 se cuantificó por Western blot a partir de proteínas totales de células de la granulosa humana luteinizadas del grupo control y pacientes con SOP. Los extractos proteicos fueron resueltos en geles de poliacrilamida en condición denaturante (SDS-PAGE). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Advantec MFS), las cuales se bloquearon posteriormente con BSA 3% en TBS 1x-tween 20 (T-TBS) por 1 h. Luego, las membranas se incubaron con anticuerpos contra la proteína de interés, IRS1, p-IRS1 (Ser312), Akt, p-Akt (Ser473), FoxO1, p-FoxO1 (ser319), GLUT 4 y PPAR $\gamma$ . A continuación de los lavados, se adicionó el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a peroxidasa y, finalmente, la detección se llevó a cabo a través del reactivo quimioluminiscente Western Lightning® (Perkin-Elmer), utilizando un equipo de captura de imágenes Discovery Ultralum. Posterior al revelado, se hizo un stripping de membrana con el reactivo Restore™ (Pierce) y se procedió a incubar con anticuerpo anti- $\beta$ -actina (clon AC-15; Sigma) como control interno de carga de proteínas.

### **5.12. Incorporación de deoxiglucosa tritiada (DOG)**

Aproximadamente  $3 \times 10^5$  células/pocillos se privaron de suero y se cultivaron por 24 h. A cada pocillo se agregaron 500  $\mu$ l de KRH. Las células se sometieron a diferentes condiciones de estímulo, basal (sin ningún estímulo), insulina a 100 ng/ml y citocalasina 10  $\mu$ M. (Inhibidor del transporte de glucosa mediado por GLUT) Luego de 10 min de incubación en presencia del estímulo, se agregó 0.01 M 2-deoxiglucosa (DOG, Sigma-Aldrich) y 0,5  $\mu$ Ci/ml 2-DOG en KRH y se incubó por 1 h a 37 °C. Previamente un grupo de las células se pre- incubó con dosis crecientes de Rosiglitazona (0,01- 1  $\mu$ M) por 12 h. La incorporación de glucosa se detuvo adicionando PBS frío a las placas de cultivo y se lisaron las células con 350  $\mu$ l de buffer de lisis. El lisado celular se almacena a - 20°C. Cantidades iguales de lisado celular se mezclaron con líquido de centelleo y la actividad específica se midió en contador de centelleo líquido por duplicado. La captación de glucosa se expresa ( $\text{pmol}/10^5 \text{ cel} \times \text{min}$ ). Previamente se realizó una curva temporal de incorporación de glucosa a diferentes tiempos en condiciones basales (0, 15, 30, 45 y 60 min).

### **5.13. Análisis estadístico**

Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM, en cada experimento se indica el número de pacientes utilizados. La Comparación entre grupos se realizará usando análisis de varianza (ANOVA) en conjunto con test Turkey o t-test de Student. Se consideró resultado con diferencia estadística significativa cuando los valores presenten un  $p \leq 0,05$ . Para el análisis estadístico se utilizó el programa Graphpad prism 5.03 (GraphPad Software Inc)

## 6. RESULTADOS

En el Instituto de Investigaciones Materno-Infantil (IDIMI) se realizan en promedio 350 ciclos de aspiración folicular al año, con una edad promedio de las pacientes de 34,4 años (21-44 años). Las causas de infertilidad se dividen en: 41% factor masculino (147 pacientes), 23% factor anatómico (82 pacientes), 13% endometriosis (46 pacientes), 7% factor anovulatorio SOP (25 pacientes) y 16% otras causas. Las características clínicas y endocrinológicas de ambos grupos (Control y SOP) se resumen en la **Tabla 1**. Los grupos no presentan diferencia significativa en edad, con un promedio de edad para el grupo control 31,4 años (22-40 años) y del grupo SOP 30,5 años (22-38 años), estradiol y glicemia basal. Ambos grupos presentan IMC promedio sobre 25, grupo control: 25,3 (19,8-29), grupo SOP: 27,8 (23,5-31,2) clasifican como sobrepeso. A pesar que no hay diferencias en la relación cintura/cadera entre los 2 grupos, el grupo de pacientes SOP tiene una proporción mayor de mujeres con relación mayor a 0,8, marcador de síndrome metabólico. Si bien no existen diferencias significativas en los niveles de glicemia basal entre los grupos, en las pacientes con SOP los niveles de insulina basal son significativamente elevados ( $p < 0.01$ ), presentando IR con un ISI composite  $< 3$  y un HOMA IR promedio  $\geq 2.5$  comparadas con el grupo control ( $p < 0.05$ ) además presentan hiperandrogenemia con testosterona total elevada, bajos niveles de SHBG e IAL mayor a 4,5, comparados con el grupo control ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 1: Características clínicas, metabólicas y hormonales de mujeres Control (n:30) y SOP (n:20) .**

	<b>Control</b>	<b>SOP</b>	<b>P</b>
<b>Edad (años)</b>	31.5 ± 0.8	30.6 ± 0.9	NS
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	25.0 ± 0.7	27.8 ± 1.2	NS
<b>Relación Cintura- Cadera</b>	0,81 ± 0,02	0,90 ± 0,03	NS
<b>Estradiol (pg/mL)</b>	84 ± 12	111 ± 20	NS
<b>Testosterona (ng/mL)</b>	0.32 ± 0.04	0.63 ± 0.05	<0.05
<b>Androstenediona (ng/mL)</b>	± 0.5	3.9 ± 0.4	NS
<b>SHBG (nmol/L)</b>	53 ± 7	32 ± 2	< 0.05
<b>IAL</b>	2,0 ± 0,1	6,6 ± 0,4	< 0.05
<b>Glucosa basal (mg/dL)</b>	80 ± 4	86 ± 2	NS
<b>Insulina basal (µU/L)</b>	15 ± 2	32 ± 6	< 0.05
<b>HOMA IR</b>	± 0.1	2.8 ± 0.7	< 0.05
<b>ISI composite*</b>	6,0 ± 0,3	2,4 ± 0,4	< 0.05
<b>PACIENTES (N)</b>	30	20	

ISI composite:  $10000/\sqrt{(G0 \times I0 \times G120 \times I120)}$  G0: glicemia a basal, G120: glicemia a los 120 min post carga, I0: Insulina basal, I120 : Insulina a los 120 min post carga. HOMA IR: (insulina x glucosa)/405; Insulina µU/L glucosa mg/dl; IMC: Índice de masa corporal, SHBG: proteína transportadora de hormonas sexuales. \*Datos calculados con 10 pacientes SOP y 12 pacientes control

## **6.1. Transporte de glucosa y expresión del transportador GLUT4 en células de la granulosa luteinizadas de mujeres normales y pacientes SOP.**

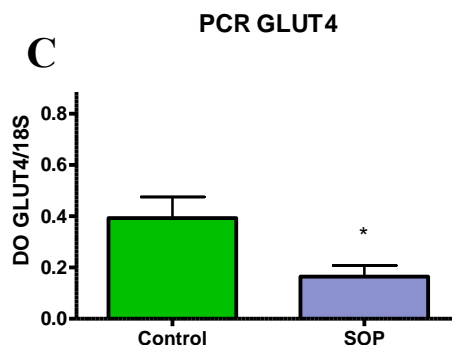
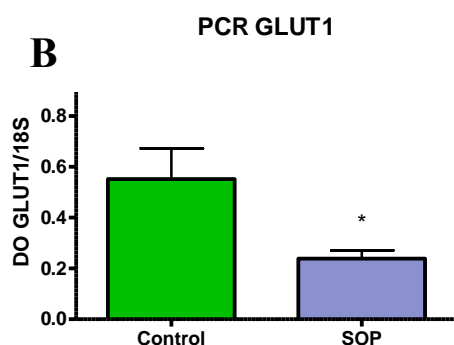
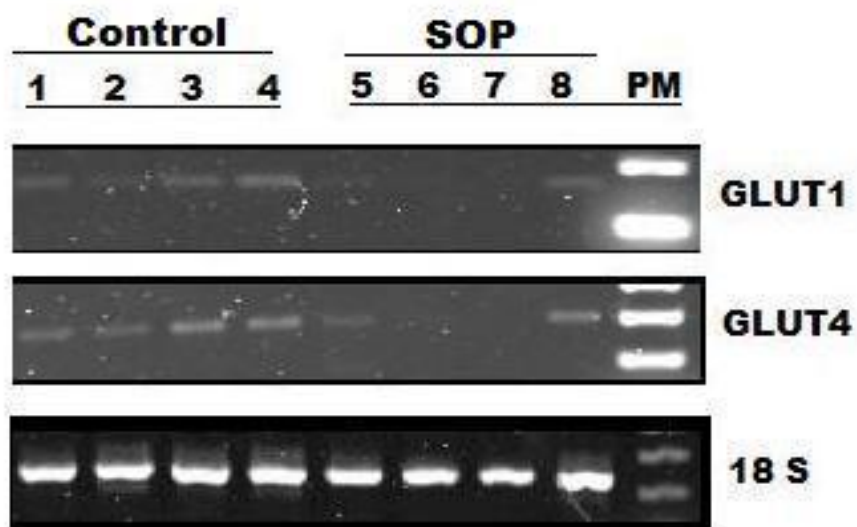
### **a). Expresión GLUT4 en células de la granulosa luteinizadas de mujeres SOP y control.**

La expresión basal de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4 se evaluó por RT-PCR, inmunocitoquímica (ICQ), expresion level score (ELS) y Western blot. Como se observa en la Figura 1, las células de la granulosa de pacientes SOP (CGSOP) presentan una marcada disminución en la expresión de los mensajeros de ambos transportadores de glucosa en comparación al grupo de pacientes control ( $P < 0.05$ ). La misma disminución se observó a nivel de la expresión proteica de GLUT1 y GLUT4 en las CGSOP por ICQ evaluado a través de ELS y por Western blot para GLUT4 ( $P < 0,05$ ). (Figuras 2 y 3).



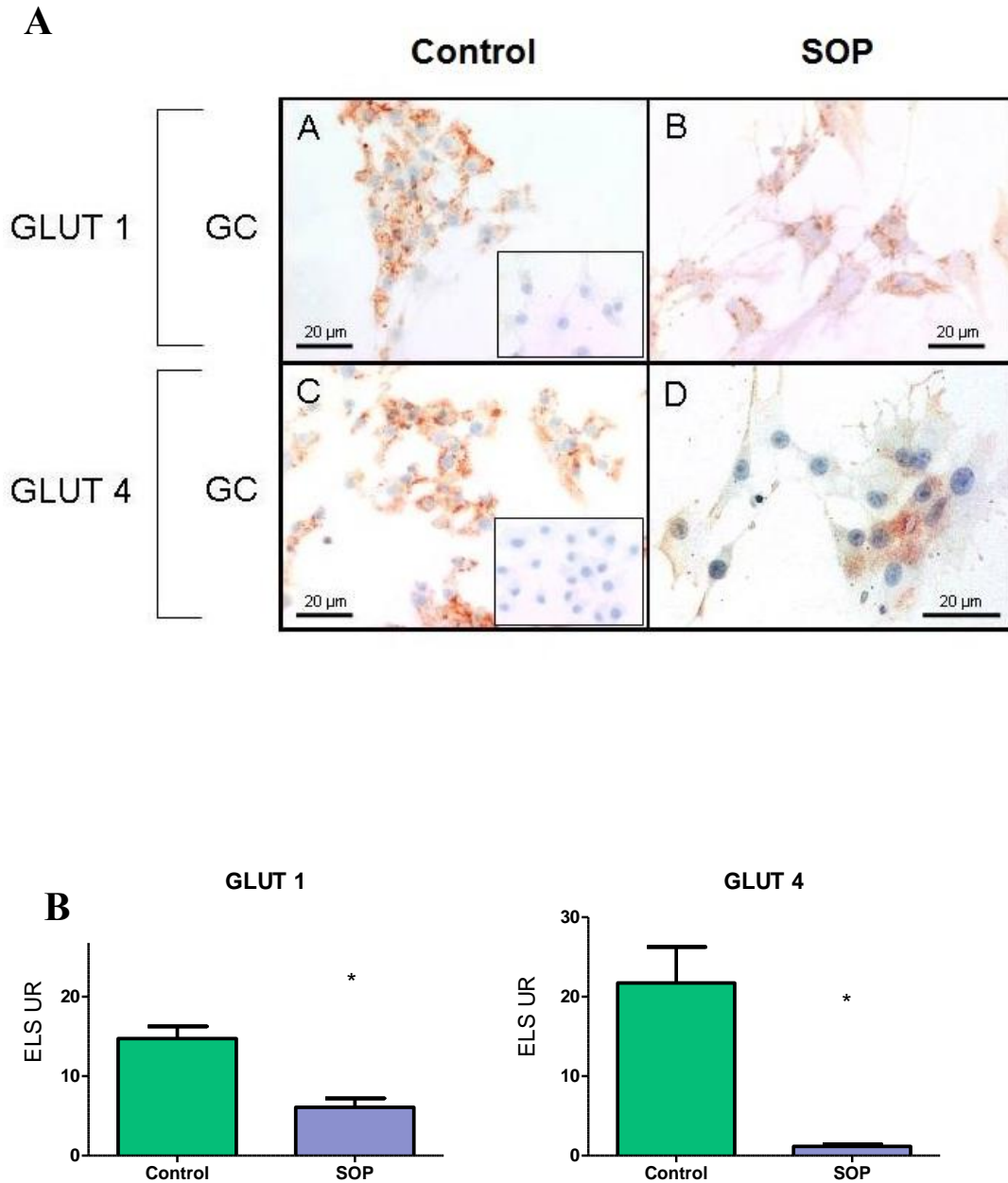
Figura 1

A



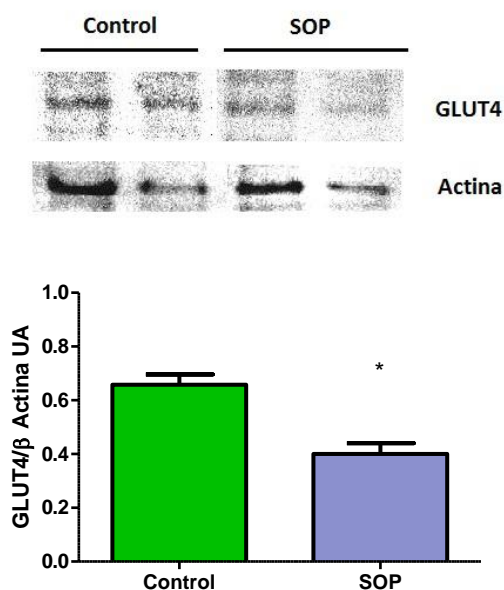
**Figura 1: Niveles de mRNAs de GLUT1 y GLUT4 en células de la granulosa humana de pacientes control y SOP.** A). RT-PCR de transportadores GLUT1 y GLUT4 en células de la granulosa humana de pacientes control y SOP. Los productos de RT-PCR fueron resueltos en gel de agarosa al 2% conteniendo 1  $\mu$ l/ml de bromuro de etidio. Carriles: 1-4 pacientes Control, 5-8 pacientes SOP. PM: Estándar de tamaño molecular 100 bp. B y C. Análisis densitométrico de las bandas GLUT1 y GLUT4, respectivamente. \* $P < 0,05$  vs control. Barras corresponden al promedio  $\pm$  D.E.  $5 \times 10^5$  cel /pocillo se utilizaron por experimento.

**Figura 2**



**Figura 2: A: Inmunocitoquímica de GLUT1 y GLUT4 en células de la granulosa de mujeres control y SOP.** Anticuerpos específicos anti-GLUT1 y GLUT4 en una dilución 1: 100 y 1:500, respectivamente. **B: Expression Level Score (ELS) GLUT1 y GLUT4** CGSOP presentan niveles significativamente menores de GLUT1 y GLUT4  $*P < 0,05$  vs control. Barras corresponden al promedio  $\pm$  D.E.  $3 \times 10^4$  células pocillo se utilizaron en cada experimento.

**Figura 3**

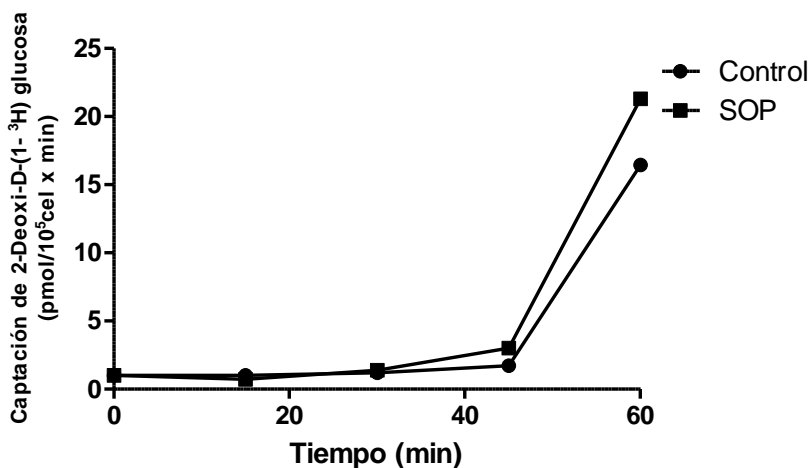


**Figura 3: Niveles basales de GLUT4 en células de la granulosa control y SOP determinados por Western blot.** CGSOP presentan niveles de GLUT4 significativamente menores a CG control ( $*P < 0.05$  vs control). Western blot representativo Barras corresponden al promedio  $\pm$  Desviación Estándar.  $3 \times 10^5$  cel/pocillo por experimento.

**b) Incorporación de glucosa en células de la granulosa luteinizadas de mujeres con SOP y controles.** Se realizó una curva temporal de incorporación de glucosa tritiada en células de la granulosa luteinizadas de pacientes control y SOP para evaluar la captación basal de glucosa. El máximo de incorporación del azúcar se observó a los 60 min. En base a estos datos se utilizó el tiempo de máxima incorporación de glucosa para los experimentos posteriores (Figura 4). La Figura 5 muestra la captación de 2-deoxi-D- $[^3\text{H}]$  glucosa por células de la granulosa en los grupos control y SOP, luego de 1h de incubación con insulina 100 ng/ml (equivalente a 18 nM). La captación de glucosa se expresó en pmol/ $10^5$  cel/min. Los resultados para cada grupo y condición experimental se presentan como el nivel de cambio de la captación de glucosa en comparación a la condición basal. Se observó que la captación basal de glucosa se encuentra disminuida en las CGSOP comparado con el grupo control ( $p < 0.05$ ). La adición de insulina (100 ng/ml) al medio de cultivo aumentó la captación de glucosa en las CG control ( $p < 0.05$ ), sin modificación de la captación del azúcar en la CGSOP. La preincubación con el bloqueador de glucotransportadores citocalasina (10  $\mu\text{M}$ ) inhibe la

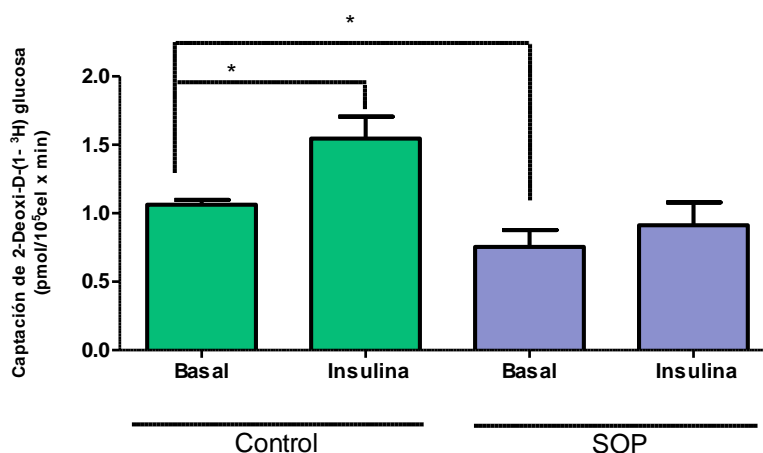
incorporación de glucosa dependiente de insulina en CG Control ( $p < 0.05$ ). Sugiriendo que las CGSOP presentan una respuesta alterada a insulina.

**Figura 4**



**Figura 4:** Curva temporal de incorporación de 2-Deoxi-D-(1-<sup>3</sup>H) glucosa por células de la granulosa en condiciones basales Control y SOP

**Figura 5**



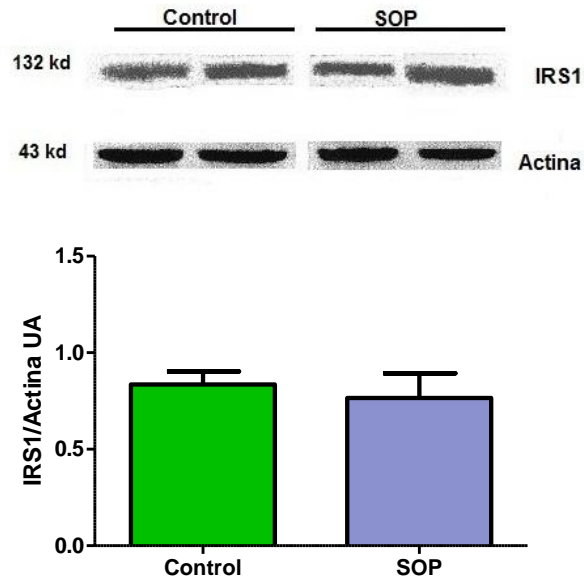
**Figura 5:** Captación de [<sup>3</sup>H] 2-DOG en células de la granulosa Control y SOP, en condiciones basales y post incubación 1 h bajo el estímulo de insulina 100 ng/ml. \* $P < 0.05$  Basal control vs Basal SOP, Basal Control vs Insulina Control N: 9 Barras corresponden al promedio  $\pm$  D.E.  $3 \times 10^5$  cel/ pocillo por experimento.

## **6.2. Estudiar la activación de la vía transduccional metabólica del receptor de insulina-IRS1-Akt en células de granulosa de pacientes con SOP y controles**

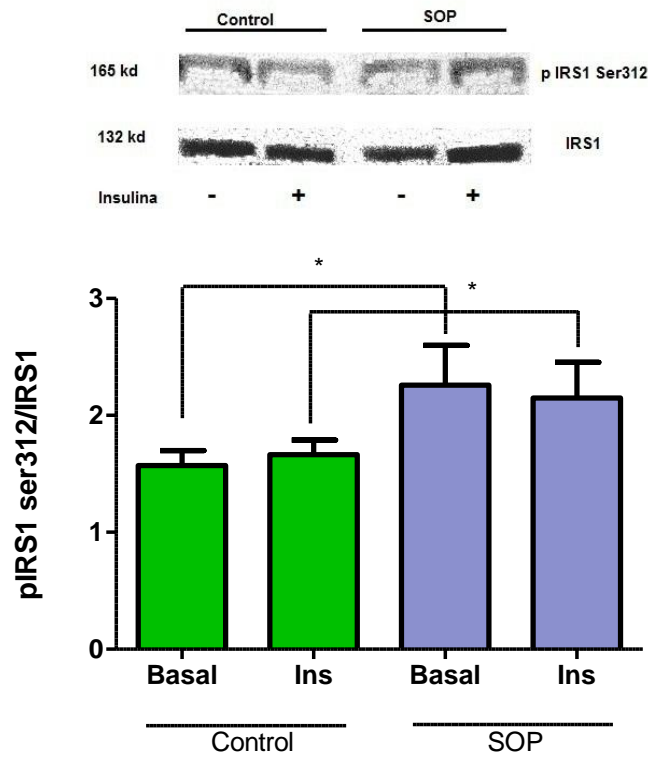
**a) Expresión de IRS1 y pIRS1 Ser 312 en células de la granulosa luteinizadas de mujeres normales y pacientes SOP.** Los niveles de IRS total y fosfo-IRS1 (p-IRS1) ser312 se evaluaron por Western blot. La fosforilación en residuos de serina en IRS1 se ha descrito dentro de las regulaciones negativas de la vía de señalización de Insulina. No se observaron diferencias en los niveles de IRS1 total en condiciones basales entre CG control y CG SOP (Figura 6A). Interesantemente las CG SOP presentan niveles significativamente mayores de pIRS1 Ser312 en condiciones basales y pos- estímulo con insulina al compararlas con CG control ( $p < 0,05$ ) (Figura 6B).

Figura 6

A



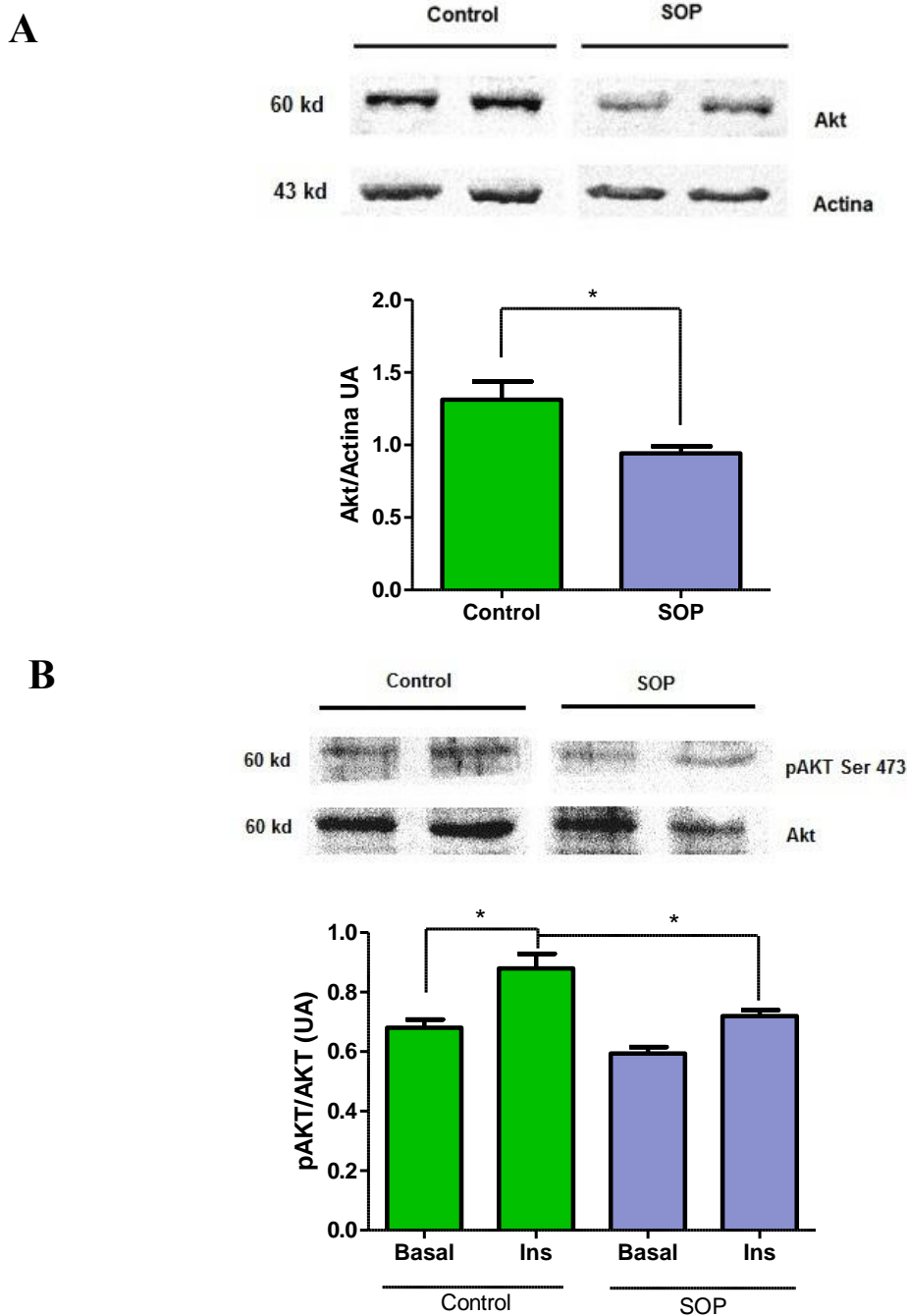
B



**Figura 6: A) Niveles basales de IRS1 en células de la granulosa control y SOP determinados por Western blot,** No se observa diferencia en los niveles basales de IRS1 entre los grupos. **B) Niveles basales y post estímulo Insulina 100 ng/ml de p-IRS1 Ser312 en células de la granulosa control y SOP determinados por Western blot,** Los niveles de p IRS1 Ser312 son significativamente más altos en CGSOP tanto en condiciones niveles basales, como post estímulo con insulina al compararlos con CG control ( $*P < 0.05$  vs control). *N: 5 Western blot representativo.* Barras corresponden al promedio  $\pm$  D.E.  $3 \times 10^5$  cel/pocillo por experimento

**b) Niveles de Akt total y fosfo-Akt (p-Akt) en células de la granulosa luteinizadas de mujeres normales y pacientes SOP.** Los niveles de Akt total y p-Akt se determinaron por Western blot. Las células de la granulosa SOP presentan basalmente menores niveles de Akt total al compararlas con CG control ( $p < 0,05$ ). Luego de la estimulación con Insulina 100 ng/ml CG SOP presentan menor fosforilación de Akt al compararlas con CG control. (Figura 7A-B, respectivamente).

Figura 7



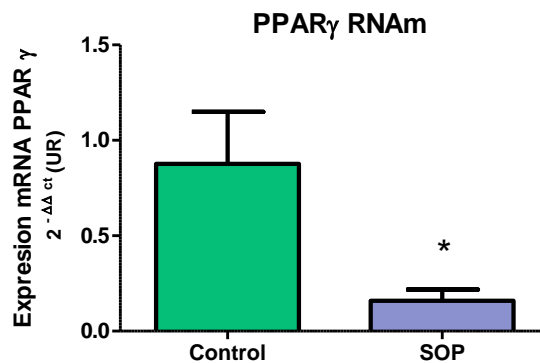
**Figura 7:** A) Niveles basales de Akt en CG control y SOP determinados por Western blot, En condiciones basales se encontró que CG SOP presentan niveles menores de Akt ( $*P < 0.05$  vs control). B) Niveles basales y post estímulo Insulina 100 ng/ml de p Akt Ser 473 en CG control y SOP determinados por Western blot, Los niveles de pAkt Ser 473 son significativamente menores en CGSOP post estímulo con insulina al compararlos con CG control ( $*P < 0.05$  control basal vs Insulina, Ins vs Ins). N: 5 Western blot representativo. Barras corresponden a Desviación Estándar.  $3 \times 10^5$  cel/pocillo por experimento.



### 6.3. Estudiar la expresión y localización de FoxO1 y PPAR $\gamma$ en células de granulosa de pacientes con SOP

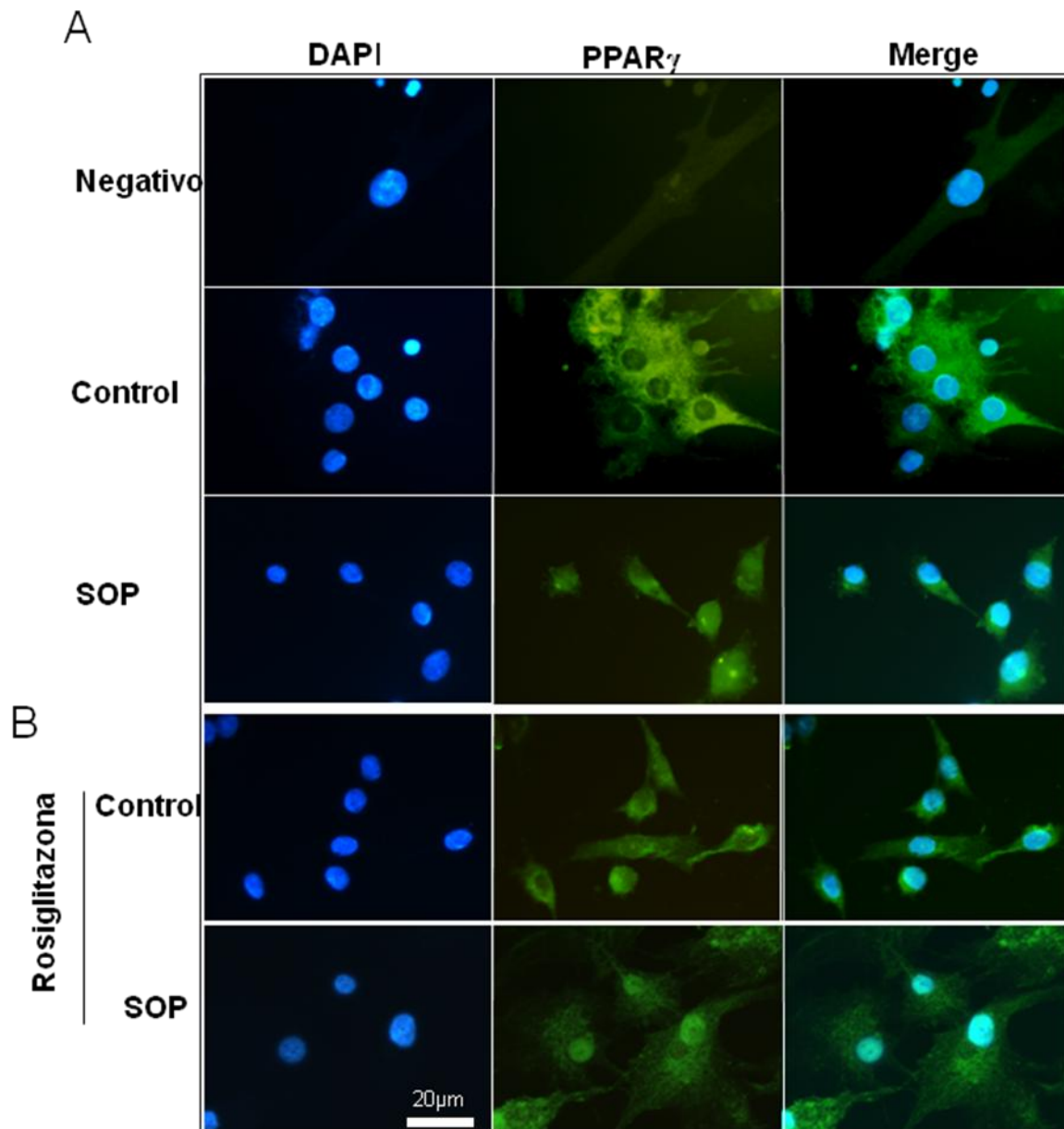
a) **Expresión e inmunolocalización de PPAR $\gamma$  en células de la granulosa humana.** Se utilizó PCR en tiempo real para cuantificar los niveles de los mRNAs de PPAR $\gamma$  en células de la granulosa de pacientes SOP y mujeres con función ovárica normal. CGSOP presentan en condiciones basales niveles significativamente menores del mRNA del PPAR $\gamma$  al compararlos con células de la granulosa de mujeres controles ( $P < 0.05$ ) (Figura 8). La localización subcelular de PPAR $\gamma$  se estudió por inmunofluorescencia. La inmunomarcación para la proteína fue positiva tanto para CGSOP como para el grupo control. Al analizar la inmunolocalización de la proteína se observó que ambos grupos presentan marca citoplasmática. Destacando además que las células de la granulosa de pacientes SOP presentan un inmunolocalización significativamente mayor a nivel nuclear al compararlas con el grupo control, 62% vs 25% ( $P < 0.05$ ) (Figura 9 y Tabla 2, respectivamente).

**Figura 8:**



**Figura 8: Expresión de mRNA PPAR $\gamma$  en células de la granulosa humana:** Evaluación de la expresión de mRNA PPAR $\gamma$  por PCR en tiempo real, células de la granulosa de mujeres con función ovárica normal (control n: 6) y pacientes SOP (n: 6). \* $p < 0.05$  vs control. Se utilizó como gen normalizador GADPH. Barras corresponden al promedio  $\pm$  D.E..  $5 \times 10^5$  cel/pocillo por experimento

**Figura 9**



**Figura 9: Inmunofluorecencia para  $PPAR\gamma$  en células de la granulosa humana.**  $PPAR\gamma$  se marcó con Alexa Fluor 488 (verde), núcleo se marcó con 4',6-diamidino-2-fenylindole (DAPI, azul) A: Grupo control y SOP. Se observa una mayor inmunolocalización de  $PPAR\gamma$  a nivel nuclear en células de la granulosa SOP

B: Células de la granulosa Control y SOP preincubadas con Rosiglitazona 0,1  $\mu$  M.

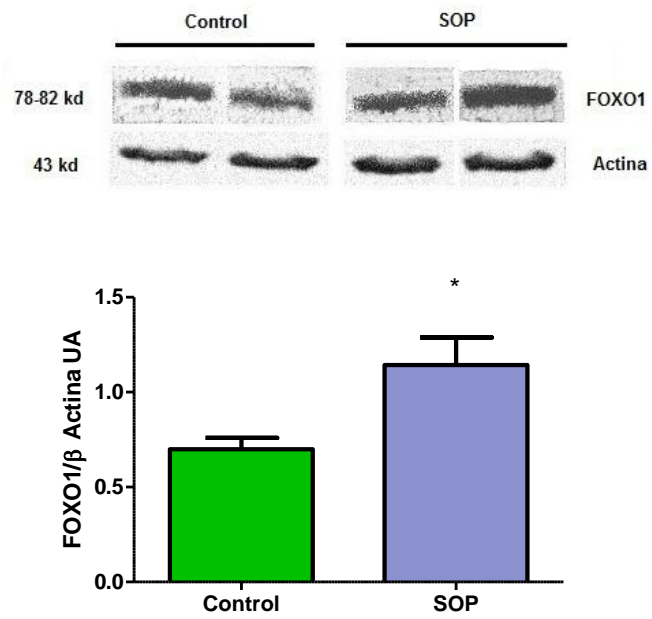
**Tabla 2: Cuantificación de la localización nuclear de *PPAR*  $\gamma$  en células de la granulosa humana.** Porcentaje de núcleos con comarcación de *PPAR* $\gamma$ /DAPI. Se tomaron 5 campos por placa y se realizó la cuantificación de los núcleos con marcación positiva *PPAR* $\gamma$ /DAPI Control n: 3 SOP: N: 3

	Control	SOP	
<b>PPAR <math>\gamma</math> Nuclear</b>	<b>25%</b>	<b>62%</b>	<i>P</i> < 0,05

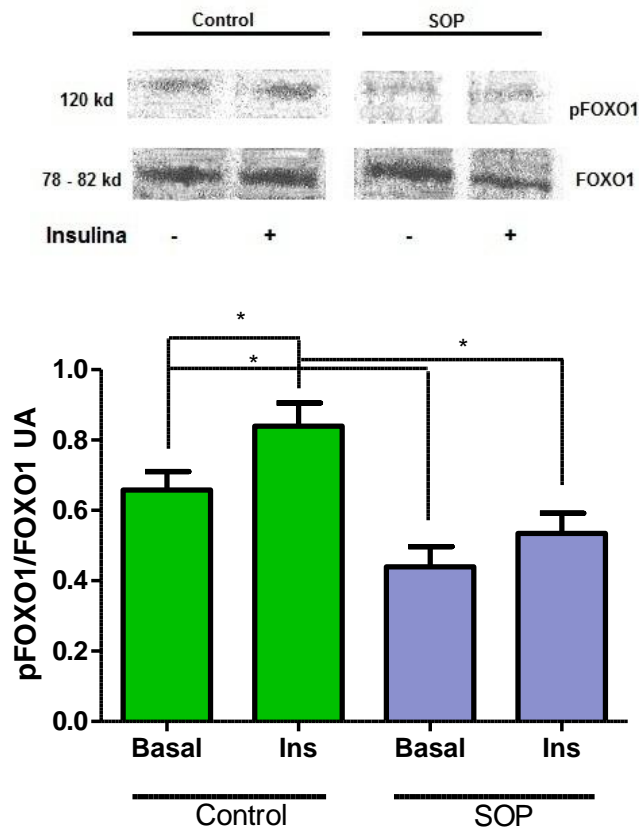
**b). Expresión e inmunolocalización de *FoxO1* en células de la granulosa humana.** Los niveles de *FOXO1* total y pFOXO1 se determinaron por Western blot. En CG SOP se encontraron niveles basales de *FOXO1* significativamente superiores a las CG control ( $p < 0,05$ ). Por otro lado, la forma fosforilada de FOXO1 se encuentra disminuida en CG SOP al compararlas con CG control y el tratamiento con insulina no aumenta en forma significativa los niveles de p-FOXO1 en CG SOP, efecto que si se observa en CG control. (Figura 10 A-B, respectivamente). La inmunolocalización de FOXO1 se hizo a través de ICQ (Figura 11)

**Figura 10**

**A**

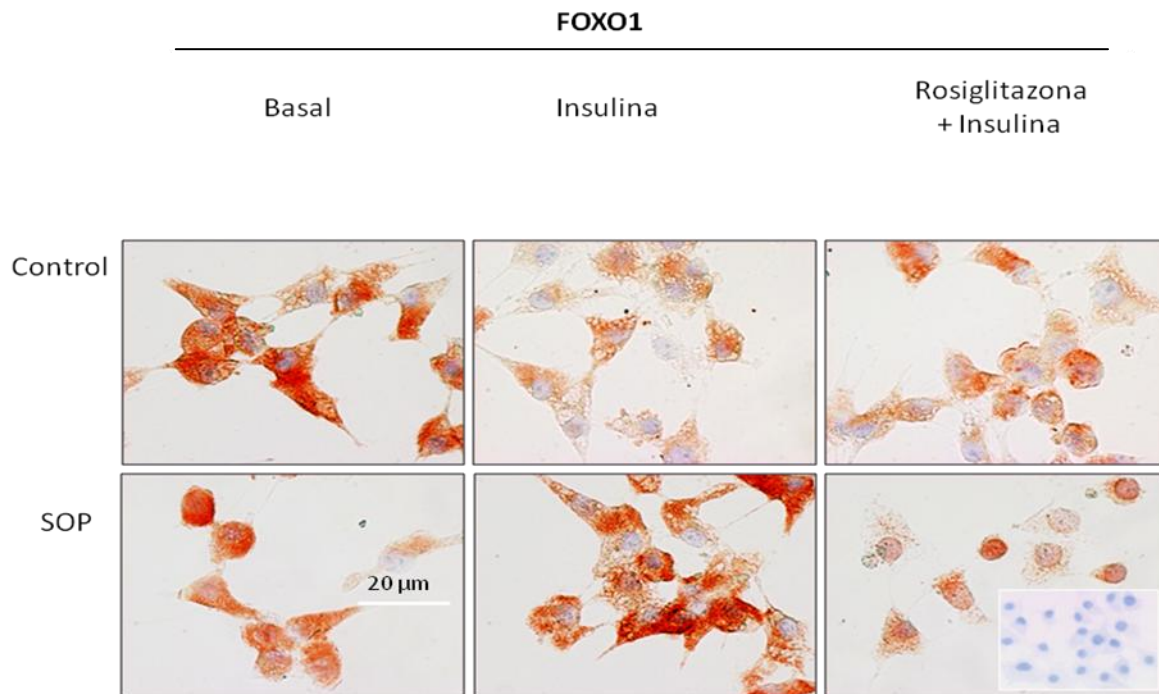


**B**



**Figura 10: A) Niveles basales de FOXO1 en células de la granulosa control y SOP determinados por Western blot,** En condiciones basales se encontró que CG SOP presentan niveles más altos de FOXO1 que las CG Control ( $*P < 0.05$  vs control). **B) Niveles basales y post estímulo Insulina 100 ng/ml de p-FOXO1 Ser 319 en células de la granulosa control y SOP determinados por Western blot,** Los niveles basales y post estímulo con insulina de p FOXO1 Ser 319 son significativamente menores en CGSOP al compararlos con CG control ( $*P < 0.05$  control basal vs Insulina, Basal vs Basal, Ins vs Ins) N: 5. Western blot representativo. Barras corresponden al promedio  $\pm$  D.E.  $3 \times 10^5$  cel/pocillo por experimento

**Figura 11**



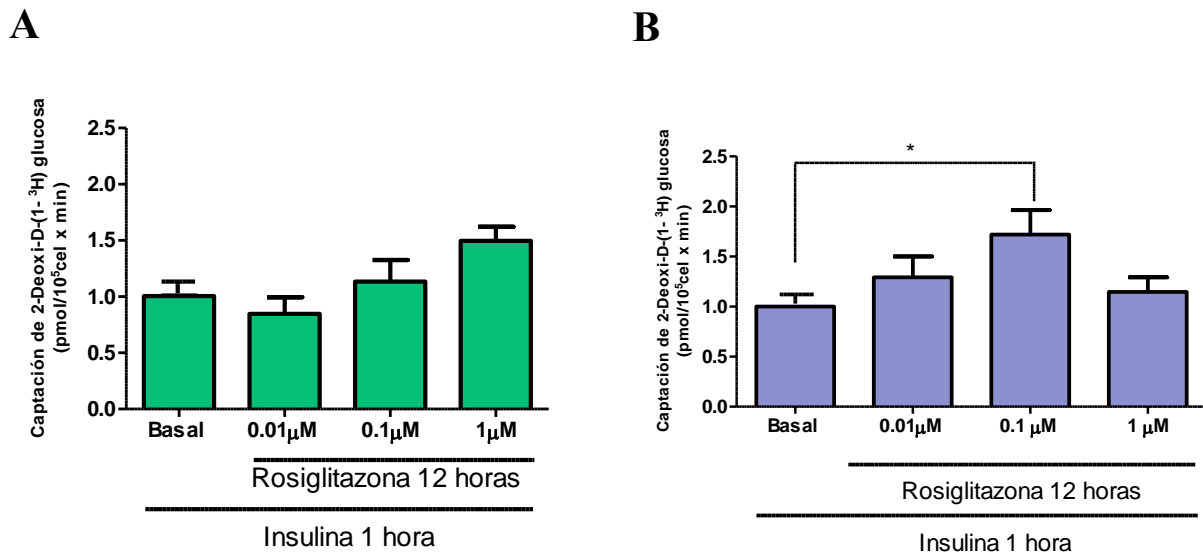
**Figura 11: Inmunocitoquímica para FOXO1 en células de la granulosa humana,** condiciones basales, post insulina 100 mg/dl y post incubación con Rosiglitazona 0,1  $\mu$ M FOXO1 se inmunodetectó con un anticuerpo específico anti- FOXO1 dilución 1:200, núcleo se marcó con hematoxilina eosina. En condiciones basales se observa tanto en grupo control como SOP inmunomarcación citoplasmática. Post estímulo con insulina se observa menor inmunomarcación citoplasmática solo en el grupo control. Post incubación con Rosiglitazona se observa una disminución en la inmunomarcación para FOXO1 en CGSOP.  $3 \times 10^4$  cel/pocillo por experimento

La relación PPAR $\gamma$ /FOXO1 es significativamente menor en CG SOP al compararlas con CG control. La estimulación con Rosiglitazona aumenta la relación PPAR $\gamma$ /FOXO1, ya que hay un aumento de PPAR $\gamma$  y una disminución de FOXO1, mientras que en CG control la relación se mantiene.

#### 6.4. Efecto del agonista de PPAR $\gamma$ (Rosiglitazona) sobre los parámetros descritos en los objetivos anteriores en células de granulosa de pacientes con SOP

a). **Incorporación de glucosa en células de la granulosa luteinizadas de mujeres con SOP y controles.** Se midió la incorporación de 2-deoxi-D-[ $^3$ H] glucosa bajo estimulación con insulina 100 ng/ml en CG pre-incubadas por 12 h con Rosiglitazona (Rz) entre 0.01-1  $\mu$ M. La preincubación con Rz 0.1  $\mu$ M aumentó en forma significativa la incorporación de glucosa en CGSOP estimuladas con insulina ( $P < 0.05$ ). Por otro lado, Rz no modificó en forma significativa la captación de glucosa en CGC (Figura 12).

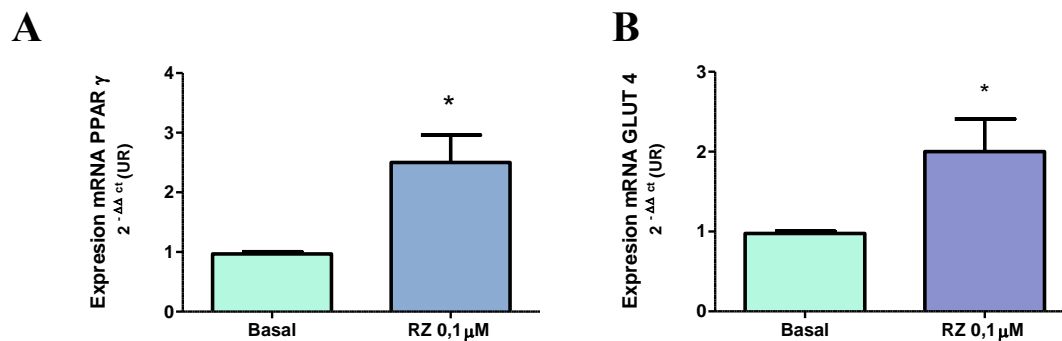
**Figura 12**



**Figura 12: Captación de [ $^3$ H] 2-DOG en células de la granulosa Control (A) y SOP (B), preincubadas con Rosiglitazona (Rz) 0.01-1  $\mu$ M por 12 h. Rz 0.1  $\mu$ M aumenta en forma significativa la Incorporación de glucosa en CGSOP \* $P < 0.05$  Basal vs Rz 0.1  $\mu$ M, Rz 0.1  $\mu$ M vs citocalasina (citoc), Barras corresponden al promedio  $\pm$  D.E 3 x10 $^5$  cel/pocillo por experimento**

b). Efecto de Rosiglitazona sobre expresión de IRS1, p IRS1, Akt, pAkt, *PPAR* $\gamma$ , FOXO1 y GLUT4 en células de la granulosa luteinizadas de mujeres con SOP y controles. El efecto de la administración *in vitro* de Rosiglitazona (Rz) en células de la granulosa se evaluó mediante la determinación de los niveles del mRNA de *PPAR* $\gamma$  y GLUT4 por PCR en tiempo real y cuantificación de los niveles proteicos de IRS1, p-IRS1, Akt, p-Akt, *PPAR* $\gamma$ , FOXO1 y GLUT4 por Western blot. En CGSOP incubadas por 12 h con Rz de 0,1  $\mu$ M se observó un aumento significativo de los niveles de los mRNAs de *PPAR* $\gamma$  y GLUT4 (Figura 13).

**Figura 13**

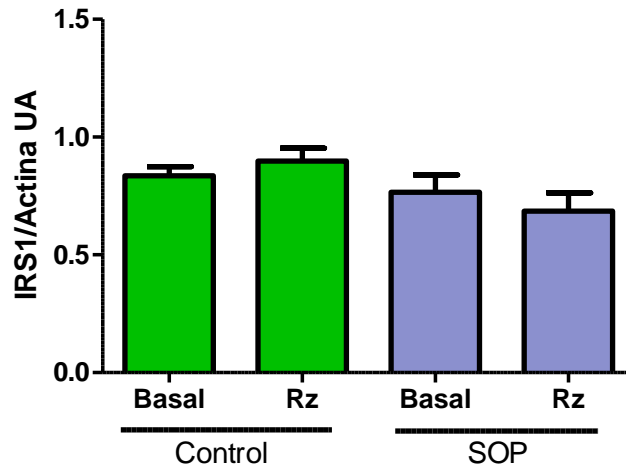
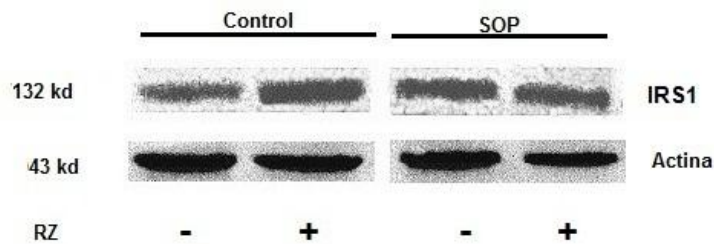


**Figura 13: Expresión de los mRNAs de *PPAR* $\gamma$  y GLUT4 en células de la granulosa luteinizada de pacientes SOP post-incubación con Rosiglitazona 0.1  $\mu$ M por 12 h.** Evaluación de la expresión de los mRNAs de *PPAR* $\gamma$  y GLUT4 por PCR en tiempo real, células de la granulosa de pacientes SOP (n: 4), post-incubación 12 h con Rosiglitazona 0.1  $\mu$ M. Se utilizó como gen normalizador GADPH. A): cambios en los niveles de expresión del mRNA de *PPAR* $\gamma$ . Condición basal vs post incubación con Rz. Se observa un aumento significativo de los niveles del mRNA de *PPAR* $\gamma$  post incubación con Rz. B): cambios en los niveles de expresión de RNAm GLUT4. Condición basal vs post incubación con RZ. Se observa un aumento significativo de los niveles del mensajero de GLUT4 post incubación con RZ (\* $P < 0.05$  Basal vs Rz 0.1  $\mu$ M). N:6. Las barras corresponden al promedio  $\pm$  D.E.  $5 \times 10^5$  cel/pocillo por experimento.

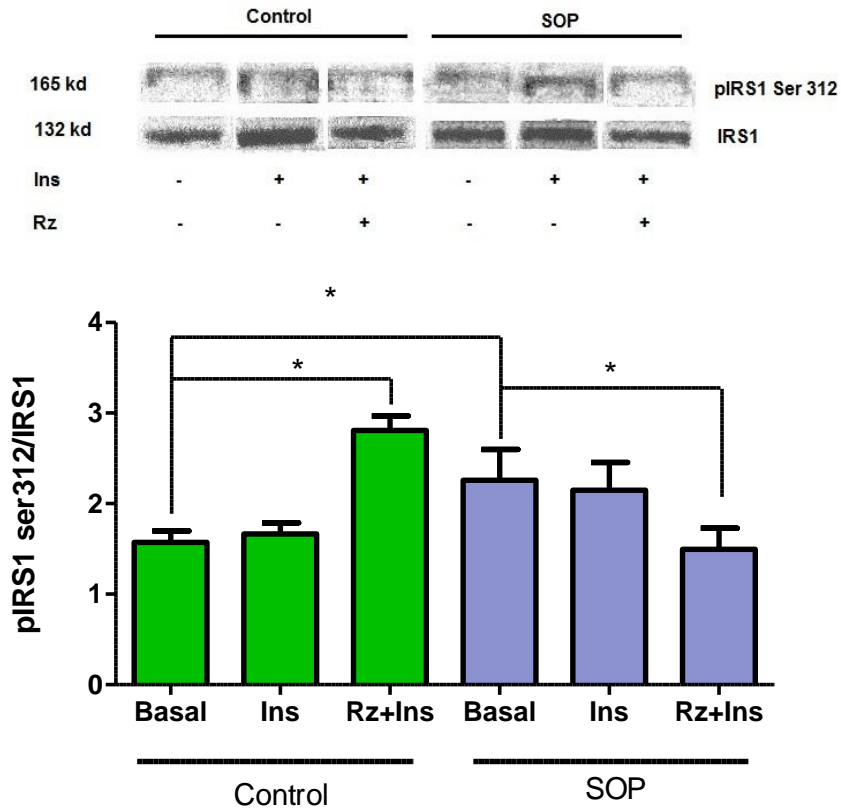
El tratamiento con Rosiglitazona 0,1  $\mu$  M por 12 h disminuyó en forma significativa los niveles de p-IRS1 Ser312 en CG SOP. En las CGs controles se observa un aumento significativo de los niveles de la proteína fosforilada ( $p < 0,05$ ) (Figura 14). No hubo cambios en los niveles totales de IRS1. Rosiglitazona aumentó en forma significativa los niveles totales de Akt en CG SOP, aumentando también en forma significativa los niveles de p-Akt dependientes de insulina (Figura 15 A-B), efecto que no se observa en CG control ( $p < 0,05$ ).

**Figura 14**

**A**



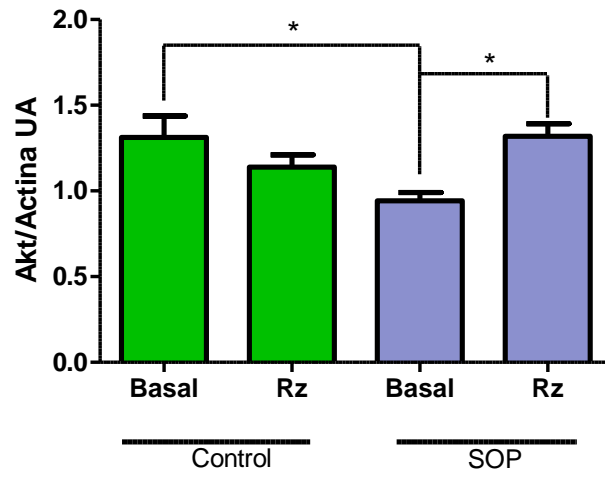
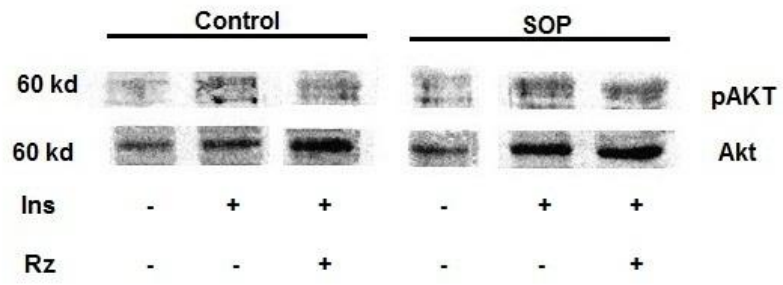


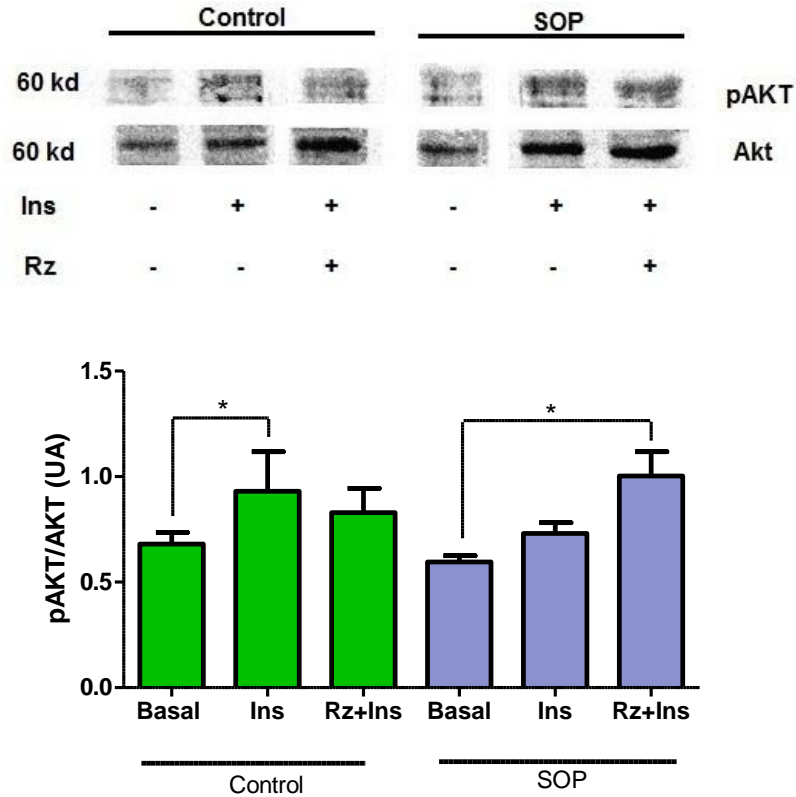
**B**

**Figura 14: A) Niveles de IRS1 en células de la granulosa control y SOP post-incubación con Rosiglitazona 0.1  $\mu$ M por 12 h determinados por Western blot, No se observa diferencia en los niveles basales de IRS1 entre los grupos. B) Niveles de p-IRS1 Ser312 en células de la granulosa luteinizada de pacientes control y SOP post-incubación con Rosiglitazona 0.1  $\mu$ M por 12 h Se observa una disminución significativo de los niveles del p IRS1 Ser312 en CG SOP post incubación con RZ (\* $P < 0.05$  Basal vs Rz 0.1  $\mu$ M+ Ins 100 ng/ml). En CG control se observó un aumento de los niveles de IRS1 fosforilado en serina post tratamiento con Rosiglitazona (\* $P < 0.05$  Basal vs Rz 0.1  $\mu$ M+ Ins 100 ng/ml).N:5. Western blot representativo. Barras corresponden al promedio  $\pm$  D.E.  $3 \times 10^5$  cel/pocillo por experimento**

Figura 15

A



**B**

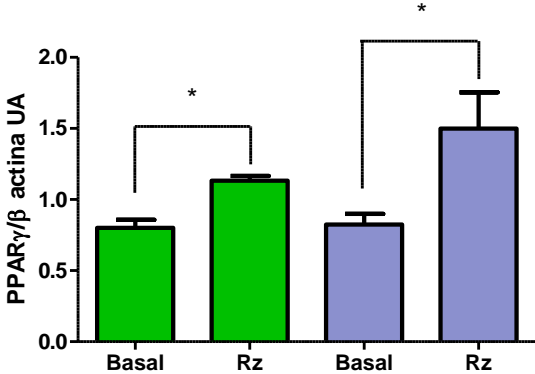
**Figura 15: Niveles de Akt y p-Akt en células de la granulosa luteinizada de pacientes control y SOP post-incubación con Rosiglitazona 0.1  $\mu$ M por 12 h.** A) Niveles totales de Akt. La incubación con Rosiglitazona aumenta en forma significativa los niveles de Akt en CG SOP, (\* $P < 0.05$  Basal vs Rz 0.1  $\mu$ M). No se observan cambios en CG control. B) Niveles de p-Akt. La preincubación con Rosiglitazona aumenta en forma significativa los niveles de p-Akt en CG SOP estimuladas con insulina 100 ng/ml. No se observan cambios en CG control (\* $P < 0.05$  Basal vs Rz 0.1  $\mu$ M+ Ins 100 ng/ml)  $N:5$  Western blot representativo. Barras corresponden al promedio  $\pm$  D.E.  $3 \times 10^5$  cel/pocillo por experimento

Al evaluar los niveles de proteína para  $PPAR\gamma$  y FOXO1 luego del tratamiento con Rz se encontró que tanto en CG control como CGSOP aumentaban en forma significativa los niveles de  $PPAR\gamma$  ( $P < 0.05$ ). Mientras que los niveles de FOXO1 disminuyen en forma significativa en CGSOP ( $p < 0,05$ ), sin observarse cambios en CG control. (Figura 16 A-B). Rosiglitazona aumentó los niveles de p-FOXO1 en CG SOP post-estimulo con insulina ( $p < 0,05$ ), efecto que no se observó en CG control (Figura 16C). GLUT4 solo aumentó significativamente en CGSOP ( $P < 0.05$ ) (Figura 17)

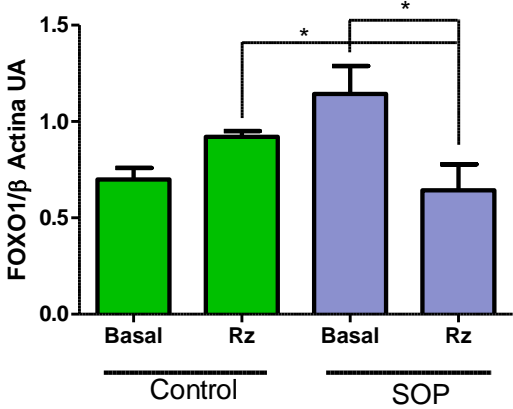
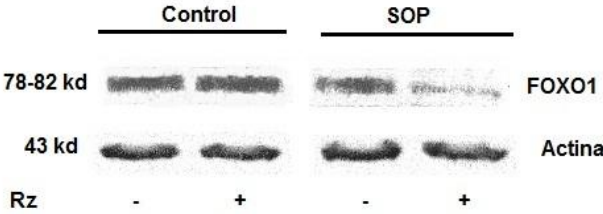
En la Figura 18 se resumen los principales hallazgos de este estudio.

Figura 16

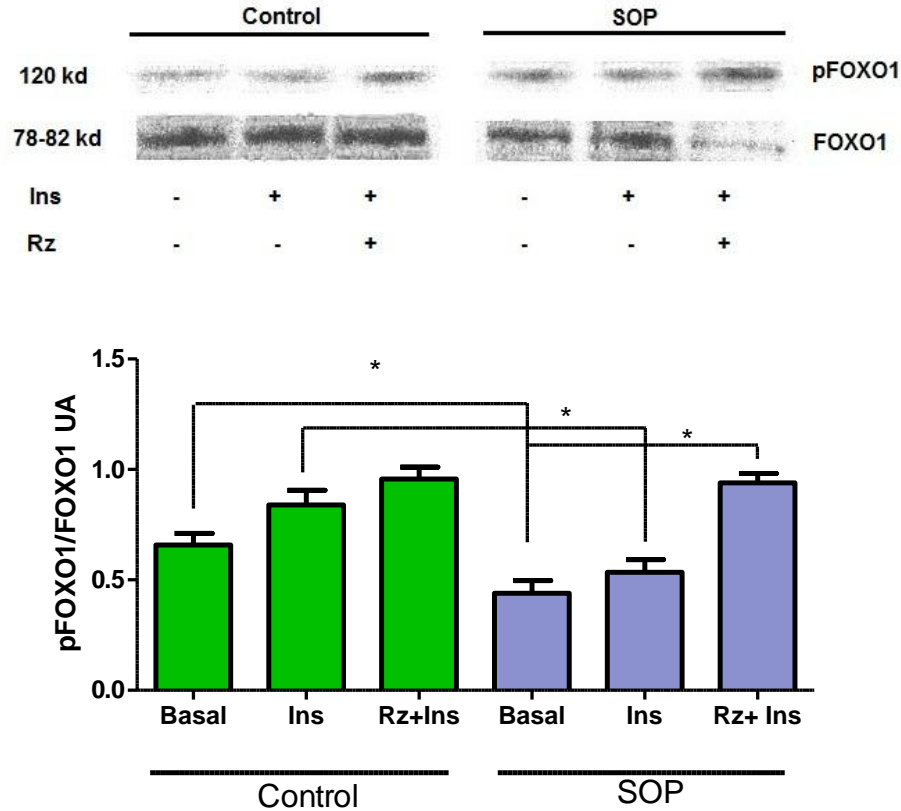
A



B

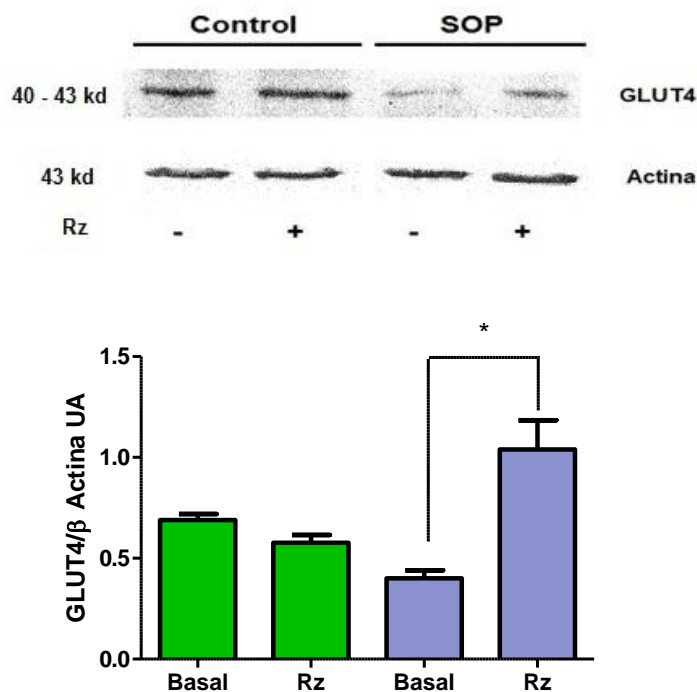


C



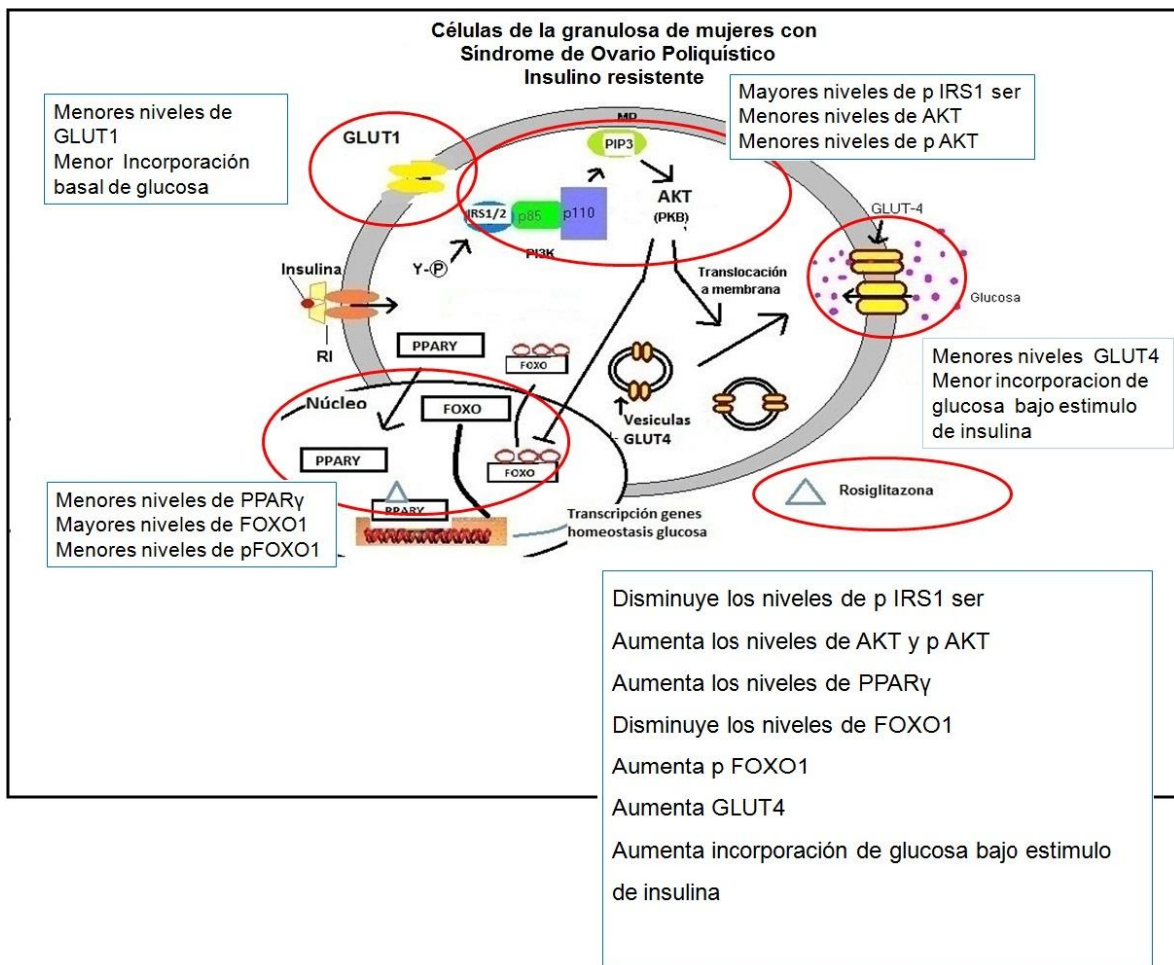
**Figura 16: Niveles proteicos de *PPAR* $\gamma$ , FOXO1 y p-FOXO1 en células de la granulosa control y SOP tratadas con Rz 0.1  $\mu$ M. A) Western blot representativo. El tratamiento con Rz aumenta en forma significativa los niveles de *PPAR* $\gamma$  en células de la granulosa control y SOP B) Western blot representativo, el tratamiento con Rz disminuye en forma significativa los niveles de FOXO1 en células de la granulosa SOP, sin cambios en CG control (\*  $P < 0.05$  Basal vs Rz 0.1  $\mu$ M.) C) Rz aumenta en forma significativa pFOXO1 en CGSOP luego del estímulo con Insulina. (\*  $P < 0.05$  Basal vs Rz 0.1  $\mu$ M + Ins 100 ng/ml) N:5. Western blot representativo. Barras corresponden al promedio  $\pm$  D.E.  $3 \times 10^5$  cel/pocillo por experimento**

**Figura 17**



**Figura 17: Niveles de GLUT4 en células de la granulosa control y SOP tratadas con Rz 0.1  $\mu$ M.** Western blot representativo, el tratamiento con Rz aumenta en forma significativa los niveles de GLUT4 en células de la granulosa SOP, sin cambios en CG control (\* $P < 0.05$  Basal vs Rz 0.1  $\mu$ M.)  $N:5$  Western blot representativo. Barras corresponden al promedio  $\pm$  D.E.  $3 \times 10^5$  ce/pocillo por experimento

**Figura 18**



**Figura 18:** Esquema resumen de las principales alteraciones de la vía de señalización de Insulina y efecto de Rosiglitazona en células de la granulosa luteinizadas de mujeres con Síndrome de Ovario Poliquístico Insulino resistentes.

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 Resistencia a la insulina en células de la granulosa luteinizadas de pacientes con Síndrome de Ovario Poliquístico

Una de las principales características del síndrome de ovario poliquístico es la resistencia periférica a la insulina, cuyo mecanismo(s) celular(es) aún no han sido del todo aclarados.

Hasta el momento existe escasa información en la literatura sobre el efecto de insulina en los tejidos reproductivos involucrados en esta patología como por ejemplo el ovario. Este trabajo evidencia una resistencia a la acción metabólica de esta hormona en células de la granulosa luteinizadas de pacientes SOP. La falta de incremento en la captación de glucosa bajo el estímulo de insulina, en comparación al grupo control estaría dando cuenta de una respuesta alterada de estas células a la acción de la insulina, fenómeno que también se observa en otros tejidos de estas pacientes, como músculo y tejido adiposo (36, 37). Estos hallazgos se correlacionan con investigaciones previas que han mostrado una menor producción de lactato e incorporación de glucosa a glicógeno bajo el estímulo de insulina en CGSOP (10,11). La menor incorporación de glucosa en CGSOP podría explicarse en parte por bajos niveles de transportadores de glucosa, por un lado una baja incorporación basal de glucosa se relacionaría con la menor expresión de GLUT1 y la menor incorporación de glucosa post estímulo de insulina con bajos niveles de GLUT4.

El ovocito, células del cumulo y células de la granulosa, tiene comunicación, endocrina, para crina y metabólica esencial durante la foliculogénesis, para un buen desarrollo folicular y ovocitario. El ovocito carece de la maquinaria necesaria para mantenerse metabólicamente por lo cual el soporte de las células de la granulosa debe compensar esta insuficiencia metabólica, para lo cual los glucotransportadores jugarían un rol fundamental (82). *Lee et al* evaluaron el patrón de expresión de 13 isoformas de GLUTS en CGs de pacientes SOP insulino resistentes, encontrando una disminución en el RNAm de GLUT4 y GLUT9 con una diferencia en los índices de maduración *in vitro* y tasa de fecundación entre los ovocitos de estas pacientes IR y aquellas sin insulino resistencia, atribuyendo esta diferencia en parte al patrón diferencial de expresión de los distintos GLUTS.(83)

Por otro lado se encontró que en forma similar a lo descrito en músculo y tejido adiposo de estas pacientes, las CGSOP también presentan una disfunción en la señalización metabólica de



Insulina, si bien no se encontraron menores niveles de IRS1, si se encontró una mayor inhibición basal de la vía dada por mayores niveles de fosforilación en residuos de serina (Ser312) tanto en condiciones basales como post estímulo de insulina. La fosforilación en este tipo de serina se ha descrito dentro de los reguladores negativos de la señalización de Insulina, lo que se correlaciona con la menor activación de la vía dada por la menor fosforilación de Akt dependiente de insulina en las CGSOP. Sin embargo otros autores no encuentran diferencias en la activación de vías mitogénicas mediada por insulina en células de la granulosa de pacientes SOP y pacientes con función ovárica normal (10). Además la producción de progesterona bajo estímulo de insulina a dosis farmacológica tampoco presentó diferencias entre estos grupos de pacientes. Estos datos sugieren que la resistencia periférica descrita en otros tejidos, como músculo y tejido adiposo, estaría también presente en células de la granulosa y pero esta resistencia estaría restringida solamente a las vías metabólicas estimuladas por insulina (incorporación y metabolización de glucosa), ya que la función proliferativa y esteroidogénica se encontrarían conservadas en pacientes SOP. Por lo cual a nivel ovárico en esta patología se encuentra una dicotomía en la acción de Insulina. Tenemos a las células de la teca, que son las productoras de los andrógenos que se encuentran elevados en estas pacientes y que ven potenciada su función bajo efecto de insulina, que a su vez sinergia la acción de LH sobre estas células y por otro lado las células de la granulosa mural tendrían su función esteroidogénica conservada (10, 79). Sin embargo los hallazgos de nuestro laboratorio indican que presentarían una importante disfunción metabólica, con alteración en la señalización de insulina, con la consecuente mala utilización de glucosa.

## **7.2 PPAR $\gamma$ y FOXO1 en células de la granulosa luteinizadas de mujeres SOP insulino resistentes**

Los receptores *PPAR $\gamma$*  y el factor transcripcional FOXO1 están relacionados con la regulación del metabolismo energético y homeostasis de la glucosa en tejidos insulino sensibles. Los resultados mostraron que los niveles del mRNA de *PPAR $\gamma$*  son significativamente menores en células de la granulosa luteinizadas de pacientes con SOP al compararlo con células del grupo control. Al analizar la inmunolocalización del receptor a través de inmunofluorescencia se observó que CGSOP presentan una inmunomarcación para *PPAR $\gamma$*  a nivel nuclear significativamente mayor que las células control. Estos hallazgos se relacionan directamente con el antecedente del efecto represor de *PPAR $\gamma$*  sobre el promotor de GLUT4 cuando el

receptor se encuentra en su estado libre de ligando y unido a proteínas correpressoras. Nuestros datos muestran que los niveles del mRNA de GLUT4 se encuentran disminuidos en CGSOP bajo estas condiciones. Por otra parte, los niveles de *FOXO1* se encontraron significativamente elevados en CGSOP, al igual que en otros estados hiperinsulinémicos como la DM2, lo que refuerza aun más la disfunción metabólica de estas células. Este factor es regulado vía fosforilación en serinas por Akt que media la acción de insulina. Las CGSOP presentaron menor activación de Akt, lo que se relacionaría con los menores niveles de pFOXO1 detectados en estas células.

### **7.3 Agonistas de PPAR $\gamma$ y su efecto sobre vía de señalización Insulina en células de las granulosa de mujeres SOP Insulino resistentes**

Rosiglitazona agonista farmacológico del receptor *PPAR $\gamma$*  se ha utilizado ampliamente en el manejo de la IR de pacientes diabéticos tipo2 y pacientes con SOP. Estos fármacos mejoran los parámetros clínico metabólicos, de hiperandrogenismo, tasa ovulatoria y de embarazo en pacientes SOP (38,39). Observamos que el tratamiento in vitro de CGSOP con Rz 0.1  $\mu$ M aumentó en forma significativa la incorporación de glucosa en estas células. La mejora en la insulino sensibilidad en las CGSOP estaría dada por el aumento en los niveles de GLUT4, que se observó en las células tratadas. Similares resultados se han encontrado en tejido adiposo de pacientes SOP tratadas por 6 meses con Rosiglitazona, donde luego del tratamiento se observó un aumento en los niveles del mRNA para GLUT4 (40). Postulamos que rosiglitazona modula la transcripción de GLUT4 a través de la regulación de *PPAR $\gamma$* , encontrándose además que los niveles de *PPAR $\gamma$*  también aumentan con el tratamiento con Rz. Además se observó que la preincubación con Rosiglitazona produce cambios significativos en la vía de señalización de Insulina en CGSOP, disminuyendo las fosforilación en serinas de IRS1, aumentando los niveles de Akt, generando una vía de señalización de insulina más activa, que se observa con mayor fosforilación de Akt, mayor niveles de pFOXO1 y finalmente mayor incorporación de glucosa en CGSOP. Estudios en musculo esquelético de pacientes con diabetes tipo 2 han demostrado que el tratamiento por al menos 16 semanas con Rosiglitazona o Troglitazona mejora la vía de señalización de insulina aumentando los niveles de PKB fosforilado( 80,81), pero para ellos no fue posible demostrar si esto fue por un efecto directo sobre *PPAR $\gamma$*  o un efecto indirecto por la mejoría sistémica en el perfil metabólico con disminución de la

Glicemia basal, Insulina y ácidos grasos libres (FFA), nosotros podemos establecer que el efecto *in vitro* de Rosiglitazona que observamos sería atribuible a la modulación de PPAR $\gamma$  ya que nuestro modelo es aislado y no hay influencia de parámetros metabólicos.

Por otro lado la relación que se establece entre el receptor PPAR $\gamma$  y FOXO1 en CGSOP muestra una relación inversa a favor de FOXO1 en condiciones basales con menores niveles de PPAR $\gamma$  y altos niveles de FOXO1 al compararlos con CG de mujeres control. Estos hallazgos se contraponen en cierta medida con los otros tejidos reproductivos de mujeres SOP como el endometrio donde ambas proteínas estaban elevadas en condiciones basales, aunque la técnica utilizada para evaluar la proteína son distintas. El tratamiento con Rosiglitazona revierte esta situación solo en las CGSOP sin cambios en las CG control.

## **8. Conclusiones, proyecciones y limitaciones**

Los resultados de este estudio sientan una base interesante para la comprensión de la patología del síndrome del ovario poliquístico, abriendo una nueva línea de investigación relacionada con la acción diferencial de la insulina sobre la regulación hormonal y metabólica de las células de la granulosa bajo esta patología. Estos cambios que afectan el metabolismo de la glucosa en las células de la granulosa podrían comprometer de manera directa la calidad ovocitaria. La administración de insulino sensibilizantes, agonistas de los receptores PPAR $\gamma$ , tomaría relevancia como herramienta terapéutica para mejorar el transporte de glucosa en las células ováricas de las pacientes SOP. Las CGs SOP presentan un perfil metabólico y molecular diferente a CGs de mujeres con función ovárica normal, con una menor expresión de los glucotransportadores y una respuesta anormal a insulina. Esta disfunción metabólica podría contribuir con la alteración en el desarrollo folicular de la paciente SOP e influir en la calidad ovocitaria de estas pacientes. La activación *in vitro* de PPAR $\gamma$  por Rosiglitazona, aumenta los niveles de GLUT4, incrementando así la incorporación de glucosa en CG de pacientes SOP. El incremento del transporte de glucosa en las células de la granulosa de las pacientes SOP, podría mejorar la competencia metabólica de los ovocitos en maduración, contribuyendo a una mejor calidad ovocitaria en este grupo de pacientes. Cabe destacar que es necesario confirmar si estos hallazgos en las células de la granulosa mural se encuentran

también las células del cumulo, que son aquellas células de la granulosa especializada que rodean al ovocito y acompañan en sus primeros estadios de desarrollo.

Limitaciones en este proyecto, son principalmente en relación al número de pacientes y que si bien los resultados son en relación al grupo más representativo de esta pacientes, SOP insulino resistentes, aun queda por dilucidar si estos hallazgos son transversales a los otros fenotipos de SOP.

El síndrome de ovario poliquístico es una enfermedad de alta prevalencia entre las mujeres en edad reproductiva, presentando un alto impacto en salud. Conocer los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de la insulino resistencia de estas pacientes, permitirá comprender aspectos fisiopatológicos de esta enfermedad, desarrollar estrategias más específicas para su manejo y tratamiento. Quizás implementar el uso de agonistas de PPAR gamma previo al ciclo de inducción de ovulación o IVF para mejorar la competencia metabólica de la granulosa y ovocito para lograr mejores tasas de éxito en nuestros programas de Terapias de reproducción asistida.

## 9. Bibliografía

1. Goodarzi M, Dumesic D., Chazenbalk G, Azziz R. Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis; *Nat Rev Endocrinol.*(2011);7:219-231
2. Solomon CG. The epidemiology of polycystic ovary syndrome. Prevalence and associated disease risks. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1999;28(2):247-263.
3. Knochenhauer ES, Key TJ, Kahsar-Miller M, Waggoner W, Boots LR, Azziz R. Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(9):3078-3082.
4. Burghen GA, Givens JR, Kitabchi AE. Correlation of hyperandrogenism with hyperinsulinism in polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;50(1):113-116.
5. Franks S. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1995;333(13):853-861.
6. Dunaif A, Graf M, Mandeli J, Laumas V, Dobrjansky A. Characterization of groups of hyperandrogenic women with acanthosis nigricans, impaired glucose tolerance, and/or hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;65(3):499-507.
7. Essah PA, Cheang KI, Nestler JE. The pathophysiology of miscarriage in women with polycystic ovary syndrome. Review and proposed hypothesis of mechanisms involved. *Hormones (Athens)* 2004;3(4):221-227.
8. Stirrat GM. Recurrent miscarriage. II: Clinical associations, causes, and management. *Lancet* 1990;336(8717):728-733.
9. Cardozo E, Pavone M, Hirshfeld-Cytron J; Metabolic syndrome and oocyte quality; *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2011, 22( 3): 103-109
10. Wood J, Dumesic D, Abbott D, Strauss JS III, Molecular Abnormalities in Oocytes from Women with Polycystic Ovary Syndrome Revealed by Microarray Analysis; *Journal Clin Endocrin & Metabolism* 2007 92(2):705–713
11. Teede HJ, Hutchison SK, Zoungas S. The management of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 2007;18(7):273-279.
12. Venkatesan AM, Dunaif A, Corbould A. Insulin resistance in polycystic ovary syndrome: progress and paradoxes. *Recent Prog Horm Res* 2001;56:295-308.
13. Ma F, Qiao L, Yue H et al. Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance (HOMA-IR), a Key Role for Assessing the Ovulation Function in Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) Patients with Insulin Resistance. *Endocr J* 2008; 55(5):943-945
14. Kashyap SR, Defronzo RA. The insulin resistance syndrome: physiological considerations. *Diab Vasc Dis Res* 2007;4(1):13-19.
15. Rice S, Christoforidis N, Gadd C et al. Impaired insulin-dependent glucose metabolism in granulosa-lutein cells from anovulatory women with polycystic ovaries. *Hum Reprod* 2005;20(2):373-381.
16. Fedorcsak P, Storeng R, Dale PO, Tanbo T, Abyholm T. Impaired insulin action on granulosa-lutein cells in women with polycystic ovary syndrome and insulin resistance. *Gynecol Endocrinol* 2000;14(5):327-336.
17. Strauss JS III, Dunaif A, Molecular Mysteries of Polycystic Ovary Syndrome, *Mol Endo* · 1999; 13 ( 6) : 800-805
18. Joost HG, Thorens B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol* 2001;18(4):247-256.

19. Williams SA, Blache D, Martin GB, Foot R, Blackberry MA, Scaramuzzi RJ. Effect of nutritional supplementation on quantities of glucose transporters 1 and 4 in sheep granulosa and theca cells. *Reproduction* 2001;122(6):947-956.
20. Nishimoto H, Matsutani R, Yamamoto S et al. Gene expression of glucose transporter (GLUT) 1, 3 and 4 in bovine follicle and corpus luteum. *J Endocrinol* 2006;188(1):111-119.
21. Mueckler M. Family of glucose-transporter genes. Implications for glucose homeostasis and diabetes. *Diabetes* 1990;39(1):6-11.
22. Maher F, Vannucci S, Takeda J, Simpson IA. Expression of mouse-GLUT3 and human-GLUT3 glucose transporter proteins in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;182(2):703-711.
23. Burant CF, Davidson NO. GLUT3 glucose transporter isoform in rat testis: localization, effect of diabetes mellitus, and comparison to human testis. *Am J Physiol* 1994;267(6 Pt 2):R1488-1495.
24. Hauguel-de Mouzon S, Challier JC, Kacemi A, Cauzac M, Malek A, Girard J. The GLUT3 glucose transporter isoform is differentially expressed within human placental cell types. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82(8):2689-2694.
25. Xing AY, Challier JC, Lepercq J et al. Unexpected expression of glucose transporter 4 in villous stromal cells of human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(11):4097-4101.
26. Bell GI, Kayano T, Buse JB et al. Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* 1990;13(3):198-208.
27. Gaster M, Staehr P, Beck-Nielsen H, Schroder HD, Handberg A. GLUT4 is reduced in slow muscle fibers of type 2 diabetic patients: is insulin resistance in type 2 diabetes a slow, type 1 fiber disease? *Diabetes* 2001;50(6):1324-1329.
28. Rosenbaum D, Haber RS, Dunaif A. Insulin resistance in polycystic ovary syndrome: decreased expression of GLUT-4 glucose transporters in adipocytes. *Am J Physiol* 1993;264(2 Pt 1):E197-202.
29. Adamo M, Roberts CT, Jr., LeRoith D. How distinct are the insulin and insulin-like growth factor I signalling systems? *Biofactors* 1992;3(3):151-157.
30. Cullen M, Taniguchi\*, Brice Emanuelli\* and C. Ronald Kahn Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action; *Nature Reviews* 2006, 7 : 85-96
31. Andrew A. Bremer, M.D., Ph.D.,<sup>a</sup> and Walter L. Miller, M.D.<sup>b</sup> The serine phosphorylation hypothesis of polycystic ovary syndrome: a unifying mechanism for hyperandrogenemia and insulin resistance;; *Fertility and Sterility\_ Vol. 89, No. 5, May 2008* 1039 – 1048
32. Goodarzi M, Williams H, Magoffin D, Pall M, Chang W, Azziz R; Adipocytes from women with polycystic ovary syndrome demonstrate altered phosphorylation and activity of glycogen synthase kinase 3; ; *Fertility and Sterility* 2008, 90: 2291- 2297
33. Mioni R, Chiarelli S, Xamin N, Zuliani L, Granzotto M, Mozzanega B, Maffei P, Martini C, Blandamura S, Siculo N, Vettor R; Evidence for the Presence of Glucose Transporter 4 in the Endometrium and Its Regulation in Polycystic Ovary Syndrome Patients; *J Clinical Endocrin & Metabol* 2004, 89:4089–4096
34. Fornes R, Ormazabal P, Rosas C, Gabler F, Vantman D, Romero C, Vega M; Changes in the Expression of Insulin Signaling Pathway Molecules in Endometria from Polycystic Ovary Syndrome Women with or without Hyperinsulinemia; *Mol m e d* 2 0 1 0, 1 6: 1 2 9 - 1 3 6
35. Wu XK, Zhou SY, Liu JX et al. Selective ovary resistance to insulin signaling in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2003;80(4):954-965.

36. Phy JL, Conover CA, Abbott DH et al. Insulin and messenger ribonucleic acid expression of insulin receptor isoforms in ovarian follicles from nonhirsute ovulatory women and polycystic ovary syndrome patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(7):3561-3566.
37. Tontonoz P, Spiegelman B, Fat and Beyond: The Diverse Biology of PPAR $\gamma$ ; *Annu. Rev. Biochem.* 2008. 77:289–312
38. Hundal R, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V, Inzucchi S, Schumann W, Petersen K, Landau B, Shulman B, Mechanism by Which Metformin Reduces Glucose Production in Type 2 Diabetes; *Diabetes* 49:2063–2069, 2000
39. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, et al. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ). *J Biol Chem* 1995; 270(22): 12953-56
40. Rosen C, Revisiting the Rosiglitazone Story — Lessons Learned; *N Engl J Med* 2010; 363:803-806
41. Pelzer T, Jazbutyte V, Arias-Loza PA et al. Pioglitazone reverses down-regulation of cardiac PPAR $\gamma$  expression in Zucker diabetic fatty rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;329(2):726-732.
42. Komar C, Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and ovarian function – implications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue remodeling; *Reproductive Biology and Endocrinology* 2005, 3:41 doi:10.1186/1477-7827-3-41
43. Jensterle M, Janez S, Mlinar B, Marc J, Prezelj J, Pfeifer M, Impact of metformin and rosiglitazone treatment on glucose transporter 4 mRNA expression in women with polycystic ovary syndrome; *European Journal of Endocrinology* (2008) 158 :793–801
44. Yonemitsu S, Nishimura H, Shintani M, Inoue R, Yamamoto Y, Masuzaki Y, Ogawa Y, Hosoda K, Inoue G, Hayashi T, Nakao K, Troglitazone Induces GLUT4 Translocation in L6 Myotubes; *Diabetes* 2001, 50:1093–1101
45. Shintani M, Nishimura H, Yonemitsu S, Ogawa Y, Hayashi T, Hosoda K, Inoue G, Nakao K, Troglitazone Not Only Increases GLUT4 but Also Induces Its Translocation in Rat Adipocytes; *Diabetes*, 2001, 50:2296–2300
46. Armoni M, Harel C, Karnieli E, Transcriptional regulation of the GLUT4 gene: from PPAR- $\gamma$  and FOXO1 to FFA and inflammation; *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 2007, 18 : 100-107
47. Armoni M, Kritiz N, Harel C, Bar-Yoseph F, Chen H, Quon M, Karnieli E Peroxisome Proliferator-activated Receptor- $\gamma$  Represses *GLUT4* Promoter Activity in Primary Adipocytes, and Rosiglitazone Alleviates This Effect; *J Biol Chem* 2003, 278: 30614–30623,
48. Chen Q, Sun X, Chen J, Cheng L, Wang J, Wang Y, Sun Z, Direct rosiglitazone action on steroidogenesis and proinflammatory factor production in human granulosa-lutein cells; *Reproductive Biology and Endocrinology* 2009, 7:147- 155
49. Cheng Z, White M, Targeting Forkhead Box O1 from the Concept to Metabolic Diseases: Lessons from Mouse Models; *Antioxidants & Redox Signaling* 2011, 14: 649-661
50. Barthel A, Schmoll D, Unterman T, FoxO proteins in insulin action and metabolism; *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 2005, 16 :183- 189
51. Fan W, Imamura T, Sonoda N, Sears D, Patsouris D, Kim J, Olefsky J, FOXO1 Transrepresses Peroxisome Proliferator-activated Receptor Transactivation, Coordinating an Insulin-induced Feed-forward Response in Adipocytes; *J Biol Chem* 2009, 284: 12188–12197

52. Pingping J, Huntley J, Chang J, Arden K, Olefsky J, FoxO1 Haploinsufficiency Protects Against High-Fat Diet–Induced Insulin Resistance With Enhanced Peroxisome Proliferator  $\gamma$  Activated Receptor Activation in Adipose Tissue; *Diabetes* 2009, 58:1275–1282
53. Armoni M, Harel C, Karni S, Chen H, Bar-Yoseph F, Ver M, Quon M, Karnieli E, FOXO1 Represses Peroxisome Proliferator activated Receptor  $\gamma$ 1 and  $-\gamma$  2 Gene Promoters in Primary Adipocytes; *J Biol Chem* 2006, 281:19881–19891
54. Kohan K, Carvajal R, Gabler F, Vantman D, Romero C, Vega M, Role of the transcriptional factors FOXO1 and PPARG on gene expression of SLC2A4 in endometrial tissue from women with polycystic ovary syndrome; *Reproduction* 2010, 140 123–131
55. Pisarska m, Kuo F, Tang D, Zarrinib P, Khan S, Ketefian A, Expression of forkhead transcription factors in human granulosa cells;. *Fertility and Sterility* 2009, 91,1392- 1394,
56. Matsuda F, Inoue N, Maeda N, Cheng Y, Sai T, Gonda H, Goto Y, Sakamaki K, Manabe N, Expression And Function Of Apoptosis Initiator Foxo3 In Granulosa Cells During Follicular Atresia In Pig Ovaries; *J. Reprod. Dev* 2011, 57: 151–158
57. Castrillon D, Miao L, Kollipara R, Horner J, DePinho R, Suppression of Ovarian Follicle Activation in Mice by the Transcription Factor Foxo3a; *Science* 2003, 301 215 – 217
58. Acosta A, Escalona M, Maiz A, Pollak F, Leighton F, Determinación del índice de Resistencia insulínica mediante HOMA en una población de la Región Metropolitana de Chile; *Rev Méd Chile* 2002; 130: 1227-1231
59. Matsuda M, de Fronzo R, Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing; *Diabetes Care* 22:1462–1470, 1999
60. Devoto L, Christenson LK, McAllister JM, Makrigiannakis A, Strauss JF 3rd, Insulin and insulin-like growth factor-I and -II modulate human granulosa-lutein cell steroidogenesis: enhancement of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) expression, *Mol Hum Reprod.* 1999 5(11):1003-10.
61. Olivero P, Leiva-Salcedo L, Devoto L, Stutzin A; Activation of Cl Channels by Human Chorionic Gonadotropin in Luteinized Granulosa Cells of the Human Ovary Modulates Progesterone Biosynthesis, *Endocrinology* 2008, 149: 4680– 4687
62. Gonzalez-Navarrete F, Eisner V, Morales P, Castro O, Pommer R, Quiroga C, Lavandero S, Devoto L, Tumor necrosis factor-alpha activates nuclear factor-kappaB but does not regulate progesterone production in cultured human granulosa luteal cells; *Gynecological Endocrinology* 2007, 23(7) : 377-384
63. Book C, Dunaif A, Selective Insulin Resistance in the Polycystic Ovary Syndrome, *J Clin Endocrinol Metab* 1999 84: 3110–3116,
64. Willis D, Mason H, Gilling-Smith C, Franks S, Modulation by Insulin of Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone Actions in Human Granulosa Cells of Normal and Polycystic Ovaries, *J Clin Endocrinol Metab* 1996, 81: 302-309
65. Dunaif A, Xia J, Book C, 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, 96,801–810
66. Ciaraldi T, El-Roeiy A, Madar Z, Reichart D, Olefsky J, Yen S. Cellular Mechanisms Of Insulin Resistance In Polycystic Ovarian Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1992, 75, 577-583
67. Ciaraldi T, Aroda V, Mudaliar S, Chang J, Henry R; Polycystic Ovary Syndrome Is Associated with Tissue-Specific Differences in Insulin Resistance, *J Clin Endocrinol Metab* 2009, 94: 157–163,



68. Azziz R, Ehrmann D, Legro R, Fereshetian A, O'Keefe M, Ghazzi M,; Troglitazone decreases adrenal androgen levels in women with polycystic ovary Syndrome, *Fertil and Steril* 2003 79( 4), 932-937
69. Lin L, Yong-jie T, Jia-jun Z, Ying X, Hai-yang X, Jian-jun D; Metformin versus metformin plus rosiglitazone in women with polycystic ovary syndrome, *Chin Med J* 2011;124(5):714-718
70. Donna Seto-Young, Maria Paliou, Jonathan Schlosser, Dimiter Avtanski, Alice Park, Parini Patel, Kevin Holcomb, Peter Chang, and Leonid Poretsky; Direct Thiazolidinedione Action in the Human Ovary: Insulin-Independent and Insulin-Sensitizing Effects on Steroidogenesis and Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-1 Production; *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90(11):6099–6105
71. Wang<sup>1</sup>, Yongwei Wang<sup>2</sup> and Zhaogui Sun Qiuju Chen<sup>†1</sup>, Xiaoxi Sun<sup>†2</sup>, Junling Chen<sup>3</sup>, Linan Cheng<sup>1</sup>, Jian; Direct rosiglitazone action on steroidogenesis and proinflammatory factor production in human granulosa-lutein cells; *Reproductive Biology and Endocrinology* 2009, 7:147- 154
72. Roy K, Baruah J, Sharma A, Sharma J, Kumar S, Kachava G , Karmakar D, A prospective randomized trial comparing the clinical and endocrinological outcome with rosiglitazone versus laparoscopic ovarian drilling in patients with polycystic ovarian disease resistant to ovulation induction with clomiphene citrate; *Arch Gynecol Obstet* 2009 DOI 10.1007/s00404-009-1305-8
73. Meyer M, Levin K, Grimmsmann K, Perwitz N, Eirich A, Beck-Nielsen H, Klein H; Troglitazone Treatment Increases Protein Kinase B Phosphorylation in Skeletal Muscle of Normoglycemic Subjects at Risk for the Development of Type 2 Diabetes; *Diabetes* 2002, 51:2691–2697,
74. Miyazaki Y, He H, Mandarino L, DeFronzo R; Rosiglitazone Improves Downstream Insulin Receptor Signaling in Type 2 Diabetic Patients; *Diabetes* ,2003, 52:1943–1950
75. K Yim, Ciaraldi T , Kong A, Kim D, ChPharis N, Mudaliar S, Henry R, Kahn B ; Troglitazone but not Metformin Restores Insulin-Stimulated Phosphoinositide 3-Kinase Activity and Increases p110 Protein Levels in Skeletal Muscle of Type 2 Diabetic Subjects; *Diabetes* 2002, 51:443–448
76. Højlund K, Glinborg D, Andersen N, Birk J, Treebak J, Frøsig C, Beck-Nielsen H, Wojtaszewsk J; Impaired Insulin-Stimulated Phosphorylation of Akt and AS160 in Skeletal Muscle of Women With Polycystic Ovary Syndrome Is Reversed by Pioglitazone Treatment; *Diabetes* 2008, 57:357–366
77. Jensterle M, Janez A, Mlinar B, Marc J, Prezelj J, Pfeifer M, Impact of metformin and rosiglitazone treatment on glucose transporter 4 mRNA expression in women with polycystic ovary syndrome; *European Journal of Endocrinology* 2008, 158 :793–801 Baptiste CG, Battista MC, Trottier A, Baillargeon JP. Insulin and hyperandrogenism in women with polycystic ovary syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2010);122:42-52.
78. Cardozo E, Pavone M, Hirshfeld-Cytron J. Metabolic syndrome and oocyte quality; *Trends Endocrinol Metab* 2011, 22: 103-109
79. Book C, Dunaif A, Selective Insulin Resistance in the Polycystic Ovary Syndrome, (*J Clin Endocrinol Metab* 1999, **84**: 3110–3116
80. Miyazaki Y, He H, Mandarino L, DeFronzo R, Rosiglitazone Improves Downstream Insulin Receptor Signaling in Type 2 Diabetic Patients, *Diabetes* 2003, 52:1943–1950
81. Meyer M, Levin K, Grimmsmann T, Perwitz N, Eirich A, Beck-Nielsen H, Klein H, Troglitazone Treatment Increases Protein Kinase B Phosphorylation in Skeletal Muscle of Normoglycemic Subjects at Risk for the Development of Type 2 Diabetes, *Diabetes* 2002, 51:2691–2697

82. Su YQ, Sugiura K, Eppig JJ. Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism. *Semin Reprod Med* 2009; 27:32-42
83. Kim E, Seok H, Lee S, Lee SU, Moon J, Yoon T, Lee W, Lee K, Correlation between Expression of Glucose Transporters in Granulosa Cells and Oocyte Quality in Women with Polycystic Ovary Syndrome; *Endocrinol Metab* 2014;29:40-47

## 10. Anexo 1: Consentimiento Informado.



MINISTERIO DE SALUD DE CHILE  
COMPLEJO SALUD SAN BORJA ARRIARÁN CSSBA  
PROGRAMA FERTILIZACIÓN ASISTIDA  
I.D.I.M.I

COMPLEJO SALUD SAN BORJA ARRIARÁN CSSBA  
CONSENTIMIENTO INFORMADO 2011

### **SIGNIFICADO METABOLICO FUNCIONAL DEL RECEPTOR PPAR- $\gamma$ EN DE CELULAS DE LA GRANULOSA DE PACIENTES CON SINDROME DE OVARIO POLIQUISTICO**

**Propósito de la Investigación:** El *síndrome de ovario poliquístico* (SOP) es una de las alteraciones endocrino metabólicas más comunes en la edad fértil. . Un 50-70% de las pacientes presentan hiperinsulinemia y resistencia a la insulina. **PPAR $\gamma$**  es un factor de transcripción clave que regula el metabolismo de la glucosa y la respuesta a insulina. Este estudio evaluará la vía de acción de Insulina en células de la granulosa de pacientes SOP, el efecto en laboratorio de Rosiglitazona, fármaco insulinosensibilizador, sobre esta vía de acción y su efecto sobre el receptor **PPAR- $\gamma$** . La información generada de este proyecto puede ayudar a un mayor entendimiento del síndrome de ovario poliquístico.

**Procedimiento:** La aspiración folicular se realiza rutinariamente como parte del procedimiento del programa de fertilización *in vitro* para la obtención de los ovocitos al interior del folículo. En este procedimiento células de la granulosa son obtenidas junto con el aspirado y lavado folicular y su obtención no implica un procedimiento más prolongado. Estas células no participan en proceso posterior de fertilización y son desechadas. Estas células serán cultivadas para evaluar su respuesta a insulina y Rosiglitazona, en pacientes con infertilidad asociada a factor masculino y pacientes con síndrome de ovario poliquístico. Estas células no se utilizarán para estudios de genotipificación.

**Beneficios:** El único beneficio que se obtendrá de la participación en este estudio es la satisfacción de contribuir al entendimiento de las alteraciones metabólicas implicadas en SOP, con perspectivas a la introducción de terapias tendientes a regularlas

**Efectos colaterales:** No presenta efectos colaterales

**Confidencialidad :** La información proveniente de esta investigación es confidencial y solo los investigadores tendrán acceso a dicha información, manteniendo la confidencialidad en publicaciones que surjan producto de la investigación.

**Voluntariedad:** Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria sin que ello signifique modificaciones en el estudio y tratamiento habituales de su enfermedad

**Compensación:** No existe compensación monetaria por la participación en este proyecto





SANTIAGO, 21 de septiembre de 2011.


Señor (a)  
Dr.(a) SOLEDAD SALINAS Q.  
Instituto de Investigación Materno Infantil (IDIMI)  
Campus Centro  
Facultad de Medicina  
Universidad de Chile  
**Presente**

Estimado (a) Dr.(a) Salinas:

El Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina, en la sesión de fecha 13 de septiembre de 2011, revisó su proyecto: **SIGNIFICADO METABOLICO FUNCIONAL DEL RECEPTOR PPAR- $\gamma$  EN CÉLULAS DE LA GRANULOSA DE PACIENTES CON SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO**, al cual el comité hace las siguientes observaciones:

1. Se debe corregir Consentimiento Informado, lenguaje muy técnico en las 2 primeros párrafos (redactar de nuevo).
2. Se solicita la donación de células para procedimiento en laboratorio.
3. Decir asimismo que se medirá IMC y hormonas.
4. Agregar que se puede retirar cuando quiera.

Agradeciendo de antemano vuestra atención, saluda atentamente,

  
**Sra. Marianne Gaudlitz H.**  
**Vicepresidenta**

MGM/mva.  
Proy. Nº 091-2011