

UCH-FC  
MAG-B -  
E 186  
C.1

**PERFIL DE EXPRESIÓN DE GENES PRO-  
INFLAMATORIOS (TNF- $\alpha$ , IL-6 Y MCP-1) EN EL  
TEJIDO ADIPOSO DE MUJERES CON SÍNDROME DE  
OVARIO POLIQUÍSTICO**

**Tesis**

**Entregada A La  
Universidad De Chile  
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos  
Para Optar Al Grado De**

**Magíster en Ciencias Biológicas**



**Facultad De Ciencias**

**Por**

**Bárbara Susana Echiburú López**

**Julio, 2015**

**Director de Tesis: Dr. Francisco Pérez-Bravo  
Co-Director de Tesis: Dra. Teresa Sir-Petermann**

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

Bárbara Susana Echiburú López

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 18 de Junio de 2015.

Director de Tesis:  
Dr. Francisco Pérez Bravo

.....



Co-Director de Tesis  
Dra. Teresa Sir-Petermann

.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. María Rosa Bono (Presidenta)

.....

Dra. Verónica Palma

.....

## DEDICATORIA

*....A mi familia, mi mayor tesoro.*

## RESUMEN BIOGRÁFICO TESISISTA



Bárbara Echiburú López. Licenciada en Ingeniería en Biotecnología Molecular 2002, Ingeniero en Biotecnología Molecular 2003. Académico de la Universidad de Chile, Facultad de Medicina, 2005 a la fecha. Estudios en diversos aspectos del síndrome de ovario poliquístico, específicamente en expresión génica y polimorfismos. A la fecha 26 publicaciones en revistas ISI, 23 de ellas en revistas internacionales.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a tod@s los que hicieron posible el desarrollo de esta tesis:

A mis directores de tesis, Dr. Francisco Pérez Bravo y Dra. Teresa Sir por confiar en mí y por su motivación y paciencia en este proceso.

A Manuel y Nico, por brindarme su apoyo y por las instancias de discusión y recreación.

A todas las personas que contribuyeron en la caracterización de las pacientes y en la toma de las muestra, especialmente a los médicos del policlínico del laboratorio y a las integrantes técnicas de nuestro grupo.

A Fondecyt, Proyecto 1110864, por financiar el estudio.

A mi familia y al familión, que han sabido compartir conmigo todas las etapas de mi vida, tanto profesionales como personales.

## ÍNDICE DE MATERIAS

Resumen en español .....	x
Resumen en inglés .....	xii
Introducción .....	1
Materiales y Métodos .....	21
Resultados .....	45
Discusión .....	59
Conclusión .....	77
Bibliografía .....	80

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Sondas Taqman (Applied Biosystems) .....	40
Tabla 2. Características clínicas de mujeres controles y con síndrome de ovario poliquístico (SOP) .....	46
Tabla 3. Parámetros hormonales de mujeres controles y con síndrome de ovario poliquístico (SOP) .....	47
Tabla 4. Parámetros metabólicos en mujeres controles y con síndrome de ovario poliquístico (SOP) .....	48
Tabla 5. Contenido de grasa total, abdominal y visceral en mujeres controles y con síndrome de ovario poliquístico (SOP), evaluado mediante diferentes métodos .....	50
Tabla 6. Prevalencia de alteraciones antropométricas y antropométrica-bioquímica en mujeres controles y con síndrome de ovario poliquístico (SOP).....	51
Tabla 7. Prevalencia de resistencia a la insulina, evaluada por distintos indicadores en mujeres controles y con síndrome de ovario poliquístico (SOP) .....	51
Tabla 8. Concentración de citoquinas séricas (MILLIPLEX MAP) en mujeres controles y con síndrome de ovario poliquístico (SOP) .....	52
Tabla 9. Cuantificación de macrófagos en tejido adiposo de mujeres controles y con síndrome de ovario poliquístico (SOP) .....	56
Tabla 10. Correlaciones bivariadas para distintos parámetros en mujeres controles y con síndrome de ovario poliquístico (SOP) .....	58

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Síndrome de ovario poliquístico: Un estado de obesidad e hiperandrogenismo .....	5
Figura 2. Modelo de interacción para el aumento de peso y exceso de andrógenos en el síndrome de ovario poliquístico .....	18
Figura 3. Escala de cuantificación y distribución de vello corporal de Ferriman-Gallwey modificada .....	24
Figura 4. Cuantificación de la grasa visceral y subcutánea evaluada por resonancia magnética nuclear .....	30
Figura 5. Gel de integridad para evaluar la calidad del ARN extraído de las biopsias de grasa subcutánea .....	38
Figura 6. Inmunodetección de macrófagos en tejido adiposo subcutáneo de mujeres controles y con SOP.....	42
Figura 7. Perfil de expresión génica en tejido adiposo subcutáneo de mujeres controles y con SOP .....	53
Figura 8. Relación leptina/adiponectina para la concentración sérica (A) y expresión génica (B) en mujeres controles y con SOP.....	54
Figura 9.- Área de los adipocitos del tejido adiposo subcutáneo en mujeres controles y con SOP .....	55
Figura 10.- Modelo integrativo propuesto: Características del tejido adiposo subcutáneo, secreción y expresión génica de adipocitoquinas y respuesta del tejido adiposo visceral en mujeres controles (MC) y con SOP (MSOP) de peso normal, con sobrepeso y obesas. ....	79



## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico  
ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario  
AMPK: Quinasa activada por monofosfato de adenina  
ARN: Ácido ribonucleico  
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero  
CCL2: Gen de MCP-1  
CCR2: Receptor de quimioquinas tipo 2  
cm: Centímetros  
Ct: Ciclo umbral  
DNAsa: desoxirribonucleasa  
DXA: Absorciometría dual de rayos X  
GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno  
HDL: Lipoproteína de alta densidad  
HOMA-IR: Modelo de valoración homeostática de resistencia a la insulina  
hrs: Horas  
IAL: Índice de andrógenos libres  
IAV: Índice de adiposidad visceral  
ICC: Índice cintura-cadera  
IL-6: Interleuquina 6  
IMC: Índice de masa corporal  
IRMA: ensayo inmunoradiométrico  
IRS-1: Sustrato del receptor de insulina 1  
ISI: Índice de sensibilidad a la insulina  
kDa: Kilo Dalton  
Kg: Kilogramos  
LDL: Lipoproteína de baja densidad  
LEPR: Receptor de leptina  
m: Metro  
MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos 1  
mg: Miligramos

min: Minutos  
ml: Mililitros  
mm: Milímetros  
ng: Nanogramos  
NIH: National Institute of Health (Instituto Nacional de Salud)  
NMR: Resonancia magnética nuclear  
OMS: Organización mundial de la Salud  
PAL: Producto de acumulación lipídica  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
PPAR- $\gamma$ : Receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma  
PTGO: Prueba de tolerancia a la glucosa oral  
qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real  
RA: Receptor de andrógenos  
RI: Resistencia a la insulina  
RIA: Radioinmunoensayo  
SHBG: Globulina transportadora de esteroides sexuales  
SOP: Síndrome de ovario poliquístico  
TA: Tejido adiposo  
TAS: Tejido adiposo subcutáneo  
TAV: Tejido adiposo visceral  
TG: Triglicéridos  
TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa  
°C: Grados Celsius  
 $\mu$ l: Micro litro  
 $\mu$ UI: Micro unidades internacionales  
17-OHP: 17-hidroxiprogesterona

## RESUMEN

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es un desorden endocrino-metabólico complejo, frecuente en mujeres en edad reproductiva, caracterizado por la presencia de disfunción ovulatoria y exceso de andrógenos. El SOP está asociado a una alta prevalencia de resistencia a la insulina, adiposidad central y dislipidemia, probablemente debido a alteraciones funcionales del tejido adiposo. Los adipocitos expuestos a un exceso de andrógenos tienden a ser de mayor tamaño y a presentar una alterada secreción de adipoquinas y citoquinas, lo que se ha denominado estado de bajo grado de inflamación crónica. El objetivo de este estudio fue evaluar la expresión génica en tejido adiposo subcutáneo abdominal y la concentración sérica de IL-6, TNF- $\alpha$  y MCP-1, adiponectina y leptina, y su relación con características antropométricas y hormonales del síndrome de ovario poliquístico. Adicionalmente, se evaluó la expresión del receptor de andrógenos en tejido. Incluimos 10 mujeres con SOP y 7 mujeres no hiperandrogénicas como grupo control, entre

18 y 42 años y con un índice de masa corporal comparable. Los resultados muestran que en suero la concentración de leptina y la relación leptina/adiponectina fue mayor en las mujeres con SOP, en comparación a las controles; sin diferencias en la expresión de sus genes. La concentración sérica de las citoquinas fue comparable entre ambos grupos. A su vez, la expresión génica de ellas y del receptor de andrógenos no mostró diferencias entre mujeres controles y con SOP. Al corregir por edad, el contenido de grasa visceral medido por NMR fue mayor en las mujeres con SOP en comparación al grupo control, mientras que el contenido de grasa subcutánea fue similar entre los grupos. En conjunto, los datos indican que el SOP estaría asociado a una mayor concentración sérica de leptina, sin un efecto mayor en la expresión génica de las adipocitoquinas en el tejido adiposo subcutáneo. Por otra parte, la presencia de mayor contenido de tejido adiposo visceral en mujeres con SOP podría ser consecuencia de una mayor sensibilidad androgénica de este compartimiento, tal como ha sido previamente postulado. La comprensión y correcta interpretación del papel que cumplen los factores pro-inflamatorios en el SOP, podría ayudar a identificar nuevas estrategias terapéuticas para prevenir y tratar las complicaciones asociadas, con énfasis en el sobrepeso y obesidad como agravante en diferentes patologías.

## SUMMARY

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a complex endocrine-metabolic disorder common in women of reproductive age, characterized by the presence of ovulatory dysfunction and androgen excess. PCOS is associated with a high prevalence of insulin resistance, dyslipidemia and central adiposity, probably due to functional alterations of adipose tissue. In this sense, adipocytes exposed to androgen excess are more likely to have a larger size and an altered secretion of adipokines and cytokines, which has been termed chronic low-grade inflammation. The aim of this study was to evaluate gene expression in abdominal subcutaneous adipose tissue and serum IL-6, TNF- $\alpha$  and MCP-1, adiponectin and leptin, and its relationship with anthropometric and hormonal characteristics of polycystic ovary syndrome. In addition, androgen receptor expression was evaluated in adipose tissue. We included 10 women with PCOS and 7 non-hyperandrogenic women as control group between 18 and 42 years and a comparable body mass index. The results show that

serum leptin and leptin/adiponectin ratio were higher in women with PCOS compared to controls, without variation in their gene expression. Serum concentrations of the other cytokines were comparable between both groups. In turn, mRNA gene expression of cytokines and androgen receptor showed no differences between controls and PCOS women. By correcting for age, the amount of visceral fat measured by MRI was higher in women with PCOS compared to the control group, while the content of subcutaneous fat was similar between groups. Overall, the data indicate that the PCOS condition could be associated with increased serum leptin, without a major effect on gene expression of adipokines in subcutaneous adipose tissue. Moreover, the presence of a higher content of visceral adipose tissue in women with PCOS may be the result of a greater sensitivity to androgens in this compartment, as has been previously postulated. The understanding and correct interpretation of the role of pro-inflammatory factors in PCOS may help identify new therapeutic strategies to prevent and treat the associated complications, with emphasis on overweight and obesity as aggravating factor in different pathologies.

## **INTRODUCCIÓN**

### **Síndrome de ovario poliquístico**

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es uno de los desórdenes endocrino-metabólicos más frecuentes, afectando a cerca del 10% de las mujeres premenopáusicas y caracterizado principalmente por la presencia de anovulación crónica e hiperandrogenismo. Además, la mayoría de estas mujeres presentan hiperinsulinemia, dislipidemia y obesidad de tipo abdominal (Legro, 2001).

El SOP es una enfermedad compleja en términos de herencia, en la cual variantes genómicas protectoras y predisponentes contribuyen con factores ambientales, como la dieta y el estilo de vida, llevando a la expresión fenotípica del síndrome (Escobar-Morreale y col., 2005).

La obesidad juega un rol preponderante en el desarrollo y severidad del SOP. Las mujeres con SOP frecuentemente son obesas

(Fernández-Real & Ricart, 2003), más aún, cerca del 28% de las mujeres con sobrepeso y obesidad tienen SOP (Ferrante, 2007).

El hiperandrogenismo presente en el SOP también podría influir en la fisiopatología de la obesidad. Probablemente las mujeres con SOP presentan un círculo vicioso que comienza con el hiperandrogenismo favoreciendo la acumulación de grasa visceral que induce la RI y la hiperinsulinemia resultante facilita la secreción de andrógenos en esas pacientes (Siiteri, 1987).

Entre el 60-70% de las mujeres con SOP acumulan grasa en la zona abdominal, lo que se denomina "obesidad central o abdominal" (Carmina y col., 2007), este tipo de obesidad ha sido asociada con anomalías metabólicas y disfunción del tejido adiposo (TA) (Group, 2004).

Se ha reportado que el TA de mujeres con SOP presenta adipocitos de gran tamaño denominados hipertróficos y alteraciones en el metabolismo de los lípidos. Además, se ha señalado que en este tejido existe una alteración en la expresión y secreción de adipocitoquinas (Carmina y col., 2008; Escobar-Morreale y col., 2011; Lee & Pratley, 2005; Wild y col., 2011).

A pesar de que el sobrepeso y la obesidad por sí solos no



causan SOP, la ganancia de peso en una mujer que está genéticamente predispuesta a desarrollar esta patología, podría ser suficiente para amplificar y agravar algunas manifestaciones de esta condición (Barber y col., 2006; Villa & Pratley, 2011).

Si bien algunos estudios han descrito un aumento en las concentraciones circulantes de moléculas pro-inflamatorias en el SOP, aún no son del todo concluyentes y no ha sido posible establecer si esos hallazgos son función de la obesidad, de la adiposidad central o del hiperandrogenismo con el que cursa esta patología (Munir y col., 2005).

Uno de los datos más consistentes se refieren a la leptina. Se ha sugerido que las mujeres con SOP tienen altas concentraciones circulantes de esta molécula y que ella podría estar envuelta en la patogénesis del hiperandrogenismo y alteraciones en la fertilidad de esta patología (Cervero y col., 2006).

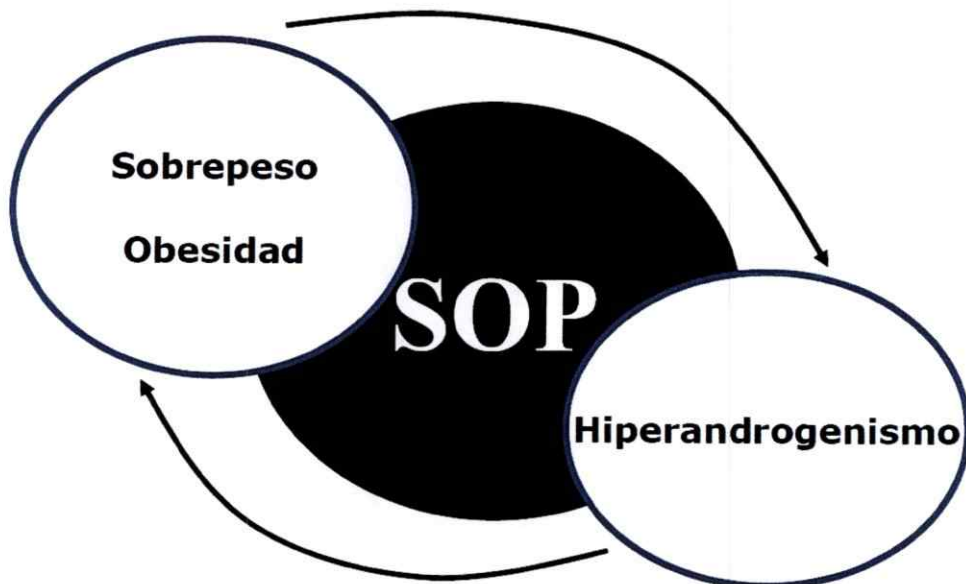
Las evidencias genéticas que podrían sustentar la inflamación observada en el SOP, están dadas principalmente por variantes en genes que codifican para algunas citoquinas proinflamatorias y sus receptores, los cuales están asociados con manifestaciones frecuentes en esta patología como RI, obesidad y diabetes (Erdogan y col., 2008;

Escobar-Morreale y col., 2001; Escobar-Morreale y col., 2005; Möhlig y col., 2004a). Más aún, se ha demostrado que la actividad de las enzimas esteroidales también podría regularse por la concentración de las adipocitoquinas (Munir y col., 2005).

Se ha planteado que dentro de la disfunción del TA que presentan las mujeres con SOP, podría encontrarse un alterado perfil de expresión génica de las adipocitoquinas. Un estudio en TA de mujeres con SOP demostró una menor expresión del ARN mensajero de adiponectina en comparación a mujeres no hiperandrogénicas (Sepilian & Nagamani, 2005). Se ha observado además, que existen diferencias en la expresión génica de adipocitoquinas del tejido adiposo visceral (TAV) de mujeres obesas con SOP en comparación a mujeres controles de peso similar. Estos hallazgos podrían sugerir que los andrógenos tienen una función de "masculinización" en el TA de mujeres con SOP, lo que explicaría, en parte, el tipo de acumulación y distribución de la grasa en esta patología (Cortón y col., 2007). De hecho, algunos estudios han encontrado que las mujeres con SOP presentan mayor contenido de grasa visceral que las mujeres sin esta patología, y similar al de los hombres (Borrueal y col., 2013).

Si bien, la contribución que tienen las adipocitoquinas en la

obesidad ha sido ampliamente descrita, es menos claro lo que ocurre en un modelo particular como el síndrome de ovario poliquístico, en el cual la obesidad y el sobrepeso interactúan con el hiperandrogenismo para modular la función del TA y, particularmente, la expresión de citoquinas a nivel local y sistémico.



**Figura 1. Síndrome de ovario poliquístico: Un estado de obesidad e hiperandrogenismo.** El SOP es una condición particular de sobrepeso u obesidad, que cursa con un exceso de andrógenos. Ambos componentes coexisten en esta patología y cada uno contribuye en la fisiopatología del otro, conformando un "círculo vicioso".

## **Obesidad y tejido adiposo**

La obesidad es una enfermedad multifactorial, producto de la interacción de componentes genéticos, hábitos alimenticios, comportamiento social, psicológico, celular y factores metabólicos; que puede ser definida como un aumento en la acumulación de grasa corporal producto de un desbalance entre la ingesta calórica y el gasto energético (Bohler y col., 2010; Sikaris, 2004).

La organización mundial de la salud define obesidad con un índice de masa corporal (IMC) sobre 30 kg/m<sup>2</sup>, este valor da cuenta de una relación alterada entre el peso y la talla de un individuo (Fernández-Real & Ricart, 2003; Sikaris, 2004). Estudios sugieren que la obesidad se encuentra asociada a un bajo grado de inflamación, proceso que está mediado por elevados niveles de adipocinas, citoquinas y quimioquinas (González y col., 2005). Además, se reconoce que este estado inflamatorio está presente a nivel sistémico, tisular e intracelular (Halberg y col., 2008; Hotamisligil & Erbay, 2008; Visser y col., 1999).

Es ampliamente aceptado que en la obesidad, el TA está aumentado (Fernández-Real & Ricart, 2003). Actualmente se considera que el TA es un órgano complejo y esencial, con alta

actividad endocrina y metabólica y que constituye el mayor sitio para el metabolismo de esteroides sexuales (Kershaw & Flier, 2004; Siiteri, 1987).

El TA expresa y secreta gran variedad de péptidos bioactivos conocidos como adipoquinas y citoquinas, las cuales actúan tanto a nivel local como sistémico. También expresa numerosos receptores capaces de responder a señales aferentes provenientes de hormonas circulantes y del sistema nervioso central. A través de esta red interactiva, el TA está envuelto en la coordinación de una variedad de procesos biológicos, incluyendo el metabolismo energético, la función neuroendocrina, reproductiva e inmune (Kershaw & Flier, 2004). Tales características, son atribuibles en su mayoría, al TA blanco, el cual es muy versátil, variando su función si su localización es alrededor de los órganos, lo que se denomina tejido adiposo visceral o en la capa subcutánea de la piel, llamado tejido adiposo subcutáneo (Hotamisligil & Erbay, 2008; Ibrahim, 2010; Sikaris, 2004).

El TA blanco consta de diferentes tipos celulares como fibroblastos, preadipocitos y macrófagos, y es responsable del almacenamiento de la grasa (Smas & Sul, 1995). Los principales componentes celulares de este tejido son los adipocitos. Aunque su

principal función es controlar el balance energético, almacenando y movilizando triacilglicerol, ellos también juegan un rol fundamental como órgano endocrino y paracrino. El TA se expande cuando el número y tamaño de los adipocitos aumenta (Lefterova & Lazar, 2009).

Se ha propuesto que la asociación con desórdenes metabólicos se debería principalmente a la acumulación de TAV (Goodpaster y col., 2005). No obstante, dado que el TAS es el mayor depósito de grasa, constituyendo cerca del 80% de la grasa total, su contribución también es fundamental (Wahrenberg y col., 1999).

La función del TA está desregulada en la obesidad. El TA de individuos obesos está caracterizado por adipocitos hipertróficos, un perfil de expresión génica proinflamatorio y una desregulación en la secreción de citoquinas, macrófagos y otras células inmunes (Kershaw & Flier, 2004; Lee & Pratley, 2005; Weisberg y col., 2003). Además, recientemente se ha reportado que en esta condición, el TA está caracterizado por mayor infiltración de macrófagos del fenotipo M1 o clásicamente activados y que los macrófagos son importantes contribuyentes de la inflamación (Cancello & Clément, 2006; Dieudonne y col., 1998). A su vez, un aumento en la infiltración de

macrófagos podría ser causado por diferentes quimoquinas secretadas a nivel local (Canello & Clément, 2006). Los macrófagos del TA pueden constituir hasta el 40% de las células de un individuo obeso (Weisberg y col., 2003).

El TA es un órgano blanco para la acción de los andrógenos ya que expresa sus receptores. El número de receptores de andrógenos es mayor en el TAV que en el subcutáneo (Dieudonne y col., 1998; Joyner y col., 2002).

Las evidencias indican que existe un dimorfismo sexual que explicaría las diferencias entre hombres y mujeres en relación a los depósitos de grasa subcutánea y visceral y, por lo tanto, un estado hiperandrogénico en la mujer podría promover el desarrollo de obesidad abdominal (Borrueal y col., 2013; Echiburú y col., 2012).

Los andrógenos cumplen múltiples funciones en el TA, una de ellas relativamente conocida es la disminución de la lipólisis (Blouin y col., 2010; Dicker y col., 2004). Aunque no se ha logrado demostrar que los andrógenos sean responsables directos del bajo grado de inflamación, los antecedentes sugieren que podrían estar involucrados.

Los andrógenos estimulan el crecimiento de los adipocitos,

modificando la expresión de enzimas y proteínas envueltas en el metabolismo de lípidos y carbohidratos, en estrés oxidativo y en la diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduros (Cortón y col., 2007).

Por otro lado, tanto el receptor de estrógenos como el de andrógenos se expresan en macrófagos derivados de células de monocitos humanos y, por lo tanto, los esteroides sexuales también serían mediadores de la función de los macrófagos (Cutolo y col., 1996).

Tanto el TAV como el TAS expresan varias enzimas envueltas en el metabolismo de hormonas esteroidales y podrían contribuir o modular el hiperandrogenismo observado en algunas patologías como el SOP (Gambineri y col., 2002).

La importancia de la función endocrina del TA es enfatizada por las consecuencias metabólicamente adversas que producen tanto un exceso como el déficit de este tejido, lo que sería regulado por la concentración de las adipoquinas y citoquinas que secreta, tanto a nivel local como sistémico.



## **Adipoquinas, Citoquinas e inflamación**

Se ha observado que ciertas condiciones como la obesidad, la resistencia a la insulina, la dislipidemia, el síndrome de ovario poliquístico, la diabetes 2 y la enfermedad cardiovascular presentan inflamación crónica (Fujioka y col., 1987; Kanai y col., 1990). Un factor común entre ellas podría ser la presencia de mayor contenido de TA, el cual es capaz de producir factores que actúan directa o indirectamente como mediadores sistémicos de inflamación.

El eje del mecanismo del proceso de inflamación ha sido relacionado a hipoxia, causada principalmente por una reducida vascularización de los tejidos. Un estado de hipoxia podría aumentar la disponibilidad de varios factores envueltos en procesos inflamatorios (Bell y col., 2008; Goossens y col., 2004).

La respuesta inflamatoria crónica está caracterizada por una producción anormal de adipoquinas y la activación de varias vías de señalización proinflamatorias, resultando en la producción de marcadores biológicos de inflamación (Hotamisligil y col., 1993).

Dentro de las moléculas más estudiadas y que participan en el proceso de inflamación se encuentran las llamadas adipoquinas como adiponectina y leptina, y las citoquinas como la interleuquina 6 (IL-6),

la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

TNF- $\alpha$  fue descrito, inicialmente, como un factor inductor de endotoxinas causante de necrosis tumoral (Ruan & Lodish, 2003). Es producido por monocitos, linfocitos, TA y músculo y se ha descrito que alteraciones en su producción estarían involucradas en la patogénesis de la obesidad y del síndrome metabólico (Dieudonne y col., 1998). En el TA, TNF- $\alpha$  es secretado por adipocitos y células estroma-vasculares (Frayn y col., 2003). La forma biológicamente activa es de 17-kDa y ejerce su efecto a través de sus receptores de tipo I y II. Las concentraciones circulantes de TNF- $\alpha$  son bajas en relación a las concentraciones locales del TA y es probable que esté directamente envuelto en el desarrollo de hiperandrogenismo (Ruan & Lodish, 2003). La expresión de este factor es mayor en el TAS que en el TAV (Fain y col., 2004; Wajchenberg, 2000) y se encuentra aumentada en roedores y humanos obesos (Fernández-Real & Ricart, 2003; Ruan & Lodish, 2003).

IL-6 es otra citoquina que se ha asociado con obesidad e insulino resistencia (Fernández-Real & Ricart, 2003). En circulación se encuentra en múltiples formas glicosiladas (de 22 a 27 kDa) y su

receptor es homólogo al receptor de leptina; presentando una forma unida a la membrana y otra soluble.

En contraste a TNF- $\alpha$ , IL-6 circula en altas concentraciones en el torrente sanguíneo en humanos. Tanto la expresión como la concentración plasmática de IL-6 se correlacionan positivamente con obesidad, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, aunque los resultados aún son conflictivos respecto a los mecanismos envueltos en la RI (Moshage y col., 1988; Pedersen & Febbraio, 2007). En el TA, IL-6 y su receptor son expresados por adipocitos y por la matriz del TA (Fain y col., 2004). La expresión y secreción de IL-6 es de 2 a 3 veces mayor en el TAV en comparación al TAS (Fain y col., 2004; Wajchenberg, 2000). Es producida por macrófagos, adipocitos, células del sistema inmune, fibroblastos, células endoteliales y músculo esquelético (Hotamisligil & Erbay, 2008). Este factor, inhibe la adipogénesis y disminuye la secreción de adiponectina (Fernández-Real & Ricart, 2003).

MCP-1 es una quimioquina, un tipo de citoquina, cuya principal acción es reclutar monocitos hacia los sitios de inflamación (Gerhardt y col., 2001; Wellen & Hotamisligil, 2003). Se ha establecido que tanto los adipocitos como las células estroma-vasculares expresan y



secretan MCP-1 (Wellen & Hotamisligil, 2003), sin embargo monocitos y macrófagos son la principal fuente de producción de esta proteína (Yoshimura y col., 1989). La proteína humana tiene un peso molecular de 13 KDa y ejerce su efecto a través de su receptor CCR2 (Charo y col., 1994).

En modelos animales, su concentración plasmática, así como su expresión y la de su receptor en el TA están directamente relacionados a procesos inflamatorios y grado de infiltración de macrófagos (Egashira, 2003; Sartipy & Loskutoff, 2003; Takahashi y col., 2003).

La expresión de MCP-1 en el TA de sujetos obesos ha sido correlacionada con obesidad y con alteraciones frecuentes en esta condición, como resistencia a la insulina, dislipidemia, hipertensión y diabetes (Canello y col., 2005; Sartipy & Loskutoff, 2003).

La adiponectina y la leptina son adipoquinas producidas principalmente por el TA. La adiponectina es una proteína con propiedades insulino sensibilizantes, antiaterogénicas y antiinflamatorias (Bohler y col., 2010). Esta molécula regula la relación entre peso corporal e insulino sensibilidad, protegiendo contra la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2 (Glintborg y col.,

2006). Tiene 3 formas mayores de distinto peso molecular, siendo la más activa la de mayor peso molecular, la cual actúa suprimiendo la producción hepática de glucosa (Michalakis & Segars, 2010). La acción de la adiponectina en el metabolismo de la glucosa es mediada a través de 2 receptores distintos de tipo 1 (AdipoR1) y 2 (AdipoR2) (Yamauchi y col., 2003), llevando a la activación de AMPK, PPAR- $\gamma$  y presumiblemente por otras vías aún no caracterizadas (Yamauchi y col., 2007). Es posible, incluso, que algunas de las vías de acción de adiponectina lleven a cambios en los macrófagos desde un fenotipo inflamatorio M1 a uno antiinflamatorio M2 (Mandal y col., 2011).

La concentración plasmática de adiponectina está reducida en sujetos obesos y en condiciones de resistencia a la insulina, además su producción disminuye a medida que aumenta el volumen del adipocito en el TAS (Drolet y col., 2009; Meyer y col., 2013; Weyer y col., 2001).

Su concentración se correlaciona negativamente con testosterona (Escobar-Morreale y col., 2006; Orio y col., 2003; Xu y col., 2005) y se ha observado que este andrógeno tiene un efecto inhibitorio en la isoforma de alto peso molecular (Xu y col., 2005).

La leptina es una hormona clave en la homeostasis energética y

en la función neuroendocrina (Cervero y col., 2006). Es una adipoquina de 18-KDa, codificada por el gen ob (Maffei y col., 1995). Su función es regular el apetito, el gasto energético y la función reproductiva e inmune (Zhang y col., 1994). Actúa a través de su receptor (LEPR), el cual tiene 6 isoformas, siendo la soluble capaz de regular la concentración sérica de leptina (Gorska y col., 2010).

La leptina, como regulador de la ingesta de alimentos y del gasto energético, aumenta la oxidación de grasa en tejido y por tanto la sensibilidad insulínica (Goumenou y col., 2003). Además, inhibe la lipogénesis y estimula la lipólisis, reduciendo los niveles de lípidos intracelulares en el músculo esquelético, hígado y células beta pancreáticas (Zhang y col., 1994). La leptina puede inducir la producción de IL-6 y como consecuencia, de proteína C reactiva.

Algunos autores han demostrado que la concentración plasmática de leptina, así como la expresión de ARNm en el adipocito correlacionan fuertemente con obesidad en humanos (Hamilton y col., 1995; Lönnqvist y col., 1995; Maffei y col., 1995). Una alta concentración de leptina en sujetos obesos, podría sugerir una posible resistencia en órganos blancos (Stefanović y col., 2008).

Se ha descrito que existe una diferencia por género en la

expresión de leptina (Montague y col., 1997; Saad y col., 1997), la cual no es completamente explicada por la diferencia en la cantidad de grasa entre hombres y mujeres, si no que probablemente por la concentración de esteroides sexuales (M. Rosenbaum y col., 2001).

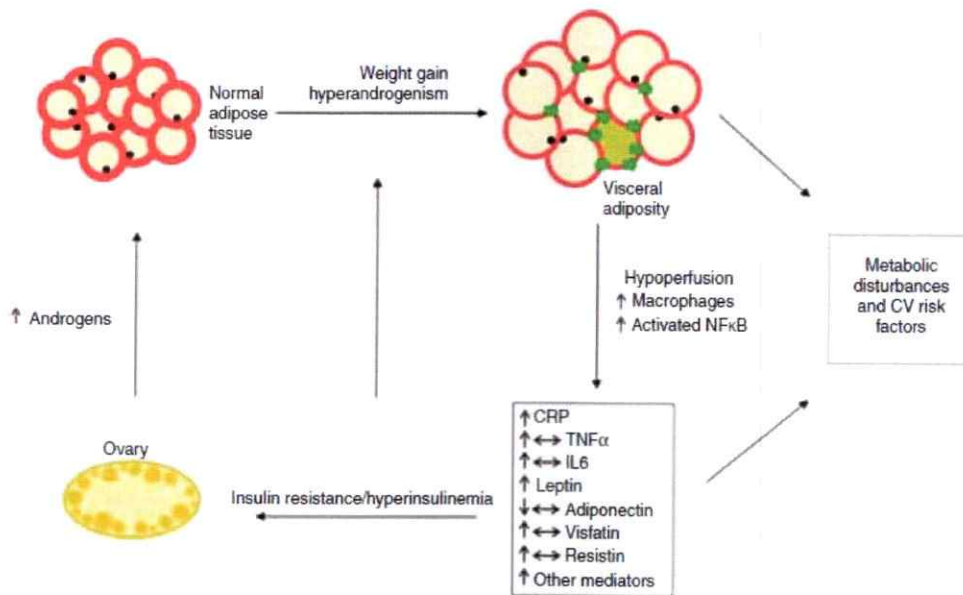
Como hemos mencionado anteriormente, los andrógenos regulan numerosos aspectos de la función del TA, incluyendo el metabolismo lipídico y la diferenciación. Actúan a través de su receptor (RA), el cual modula algunas funciones fisiológicas a través de la activación transcripcional de genes río abajo (Dicker y col., 2004).

Los receptores de andrógenos funcionales están presentes en el TA humano, en las células estromales, en adipocitos maduros y en preadipocitos diferenciados in Vitro (Dieudonne y col., 1998).

Se ha demostrado que los andrógenos regulan la lipólisis y la lipogénesis en el TA de mujeres (Dicker y col., 2004). En preadipocitos subcutáneos diferenciados in vitro, la testosterona inhibe la lipólisis estimulada por catecolaminas (Dicker y col., 2004). Por lo tanto, es probable que el RA pudiese estar involucrado en modular la acción de algunas adipocitoquinas en estados de sobrepeso y obesidad, amplificado aún más este fenómeno en estados

hiperandrogénicos como el síndrome de ovario poliquístico.

En síntesis, se sabe que tanto las citoquinas y adipocinas secretadas por el TA, como un exceso de andrógenos en la mujer, podrían promover o favorecer el desarrollo de resistencia a la insulina (RI) y obesidad, condicionando el estado de bajo grado de inflamación crónica característico del SOP; sin embargo no está claro de qué manera se establece esta asociación.



Spritzer PM, Reproduction 2015 149:219

**Figura 2. Modelo de interacción para el aumento de peso y exceso de andrógenos en el síndrome de ovario poliquístico** Un tejido adiposo hipertrófico inducido por ganancia de peso y/o hiperandrogenismo libera varias adipocitoquinas que contribuyen al desarrollo de un estado hiperinsulinémico y de resistencia a la insulina, el cual promueve, adicionalmente, un aumento de la secreción de andrógenos por el ovario.



## **HIPÓTESIS**

El síndrome de ovario poliquístico es un trastorno endocrino-metabólico que se caracteriza por la presencia de obesidad abdominal e hiperandrogenismo, el cual podría exacerbar el estado pro-inflamatorio que, a su vez, se ha relacionado con este tipo de obesidad. Nuestra hipótesis es que mujeres con SOP presentan un alterado perfil de expresión de genes pro-inflamatorios del tejido adiposo subcutáneo, comparados con mujeres no hiperandrogénicas de edad e índice de masa corporal similar.

## **OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar el perfil de expresión de genes pro-inflamatorios en mujeres con SOP y mujeres no hiperandrogénicas en edad reproductiva.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1.- Determinar, mediante PCR cuantitativo, el perfil de expresión de genes pro-inflamatorios: TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1 y adicionalmente adiponectina y leptina en tejido adiposo de mujeres con SOP y de mujeres no hiperandrogénicas de edad e índice de masa corporal similar.

2.- Cuantificar el contenido de macrófagos presentes en el tejido adiposo de mujeres con SOP y compararlo al de mujeres no hiperandrogénicas de edad e índice de masa corporal similar.

3.- Correlacionar el perfil de expresión génica de los marcadores pro-inflamatorios con las concentraciones séricas de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-6 y MCP-1.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Diseño del Estudio**

Corresponde a un diseño caso-control en el cual se estimó la expresión génica de adipocitoquinas proinflamatorias del TAS y su asociación con la concentración sérica de estos metabolitos y con manifestaciones clínicas y bioquímicas del síndrome de ovario poliquístico.

El estudio contó con la aprobación de los Comités de ética correspondientes y se encuentra en el marco del proyecto Fondecyt 1110864, titulado "Reproductive and metabolic features during the menopausal transition and the early postmenopausal period in women with polycystic ovary syndrome (PCOS): deepening into the pathophysiology of PCOS.

### **Tamaño de la muestra**

Se propuso estudiar 6 mujeres con SOP y 6 mujeres no hiperandrogénicas como grupo control. Finalmente logramos reclutar

17 mujeres en total, 10 mujeres con SOP y 7 mujeres no hiperandrogénicas. Estudios con un número de participantes similar han logrado encontrar diferencias significativas entre mujeres controles y con SOP para la expresión génica de citoquinas en el TA (Covington y col., 2015; Martínez-García y col., 2013; Seow y col., 2011).

### **Sujetos**

Se estudiaron 10 mujeres con SOP y 7 mujeres no hiperandrogénicas como grupo control. Todas ellas se encontraban en la etapa reproductiva, entre 18 a 42 años y presentaron un índice de masa corporal entre 20 y 30 kg/m<sup>2</sup>.

Las pacientes con SOP se reclutaron de mujeres que asistían regularmente a control al policlínico docente del Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo de la Facultad de Medicina Occidente de la Universidad de Chile y fueron diagnosticadas como portadoras de SOP de acuerdo al criterio de la conferencia de consenso de la National Institute of Health (NIH, 1990). Este criterio requiere de 2 características para su diagnóstico: presencia de hiperandrogenismo clínico o bioquímico y alteraciones menstruales, en ausencia de otra causa específica de enfermedad de origen ovárico, adrenal o

hipofisiario (Zawadzki & Dunaif, 1992).

Los criterios diagnósticos de SOP de acuerdo al consenso NIH fueron:

**- Alteraciones menstruales**

Presencia de oligomenorrea o amenorrea. Oligomenorrea se consideró como ciclos de más de 35 días y menos de 90 días (menos de 8 ciclos menstruales por año) y amenorrea se definió como ausencia de menstruación por un periodo de 3 meses o más.

**- Hiperandrogenismo**

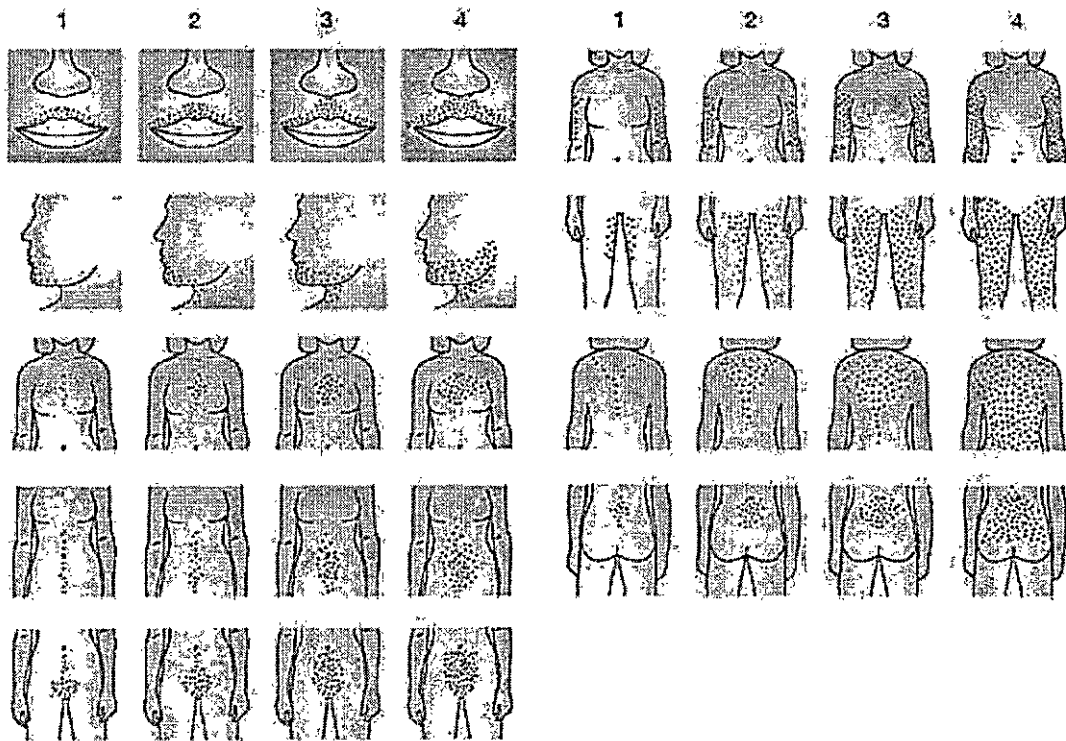
El hiperandrogenismo clínico se evaluó como la presencia de hirsutismo, con un valor de Score de Ferriman-Gallwey  $\geq 8$ , según el tipo y distribución de vello como indica la figura 3.

El hiperandrogenismo bioquímico se definió por una concentración sérica de testosterona  $> 0,80$  ng/ml, de androstenediona  $> 2,46$  ng/ml y/o un índice de andrógenos libres (IAL)  $> 6$ ; de acuerdo a valores de corte previamente establecidos en población chilena sana de nuestro laboratorio (Maliqueo y col., 2003).

El IAL se calculó de acuerdo a la relación entre la concentración sérica de testosterona total y su proteína transportadora, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{IAL} = \frac{\text{Testosterona total nmol/l} \times 100}{\text{SHBG nmol/l}}$$

SHBG nmol/l



**Figura 3. Escala de cuantificación y distribución de vello corporal de Ferriman-Gallwey modificada.** Esta escala permite cuantificar el grado de hirsutismo en las mujeres. Se asigna un valor de 1 a 4 a la densidad del pelo terminal en cada una de las 9 áreas de referencia, de no presentar vello se asigna el valor 0. Si el resultado de la sumatoria total de puntos es  $\geq 8$  se considera patológico.

Si bien el criterio de NIH no considera el aspecto ecográfico de los ovarios para el diagnóstico de SOP, la mayoría de las pacientes presentaron un ovario de morfología compatible con SOP de acuerdo

al consenso de Rotterdam del año 2003 (Group, 2004). El cual establece que un ovario de morfología compatible con SOP es aquel que presenta un volumen aumentado ( $\geq 10$  ml) y/o la presencia de 12 o más folículos de entre 2 a 9 mm; siendo suficiente con que sólo 1 ovario se encuentre afectado.

Las mujeres controles sanas fueron reclutadas de las mismas áreas geográficas que el grupo con SOP. Se incluyeron aquellas que no evidenciaron hiperandrogenismo clínico o bioquímico y que presentaron ciclos menstruales regulares (entre 28-32 días), con un examen físico y ginecológico normal.

En ambos grupos se excluyeron mujeres que se encontraban con tratamiento de anticonceptivos orales, terapias hormonales u otros medicamentos que pudiesen modificar la función hormonal por al menos 6 meses previos al estudio. Tampoco se incluyeron mujeres diabéticas previamente diagnosticadas.

### **Protocolo de estudio**

Las mujeres que cumplieron con los criterios de inclusión, tanto para el grupo con SOP como para el control, fueron entrevistadas e invitadas a participar en el estudio. Aquellas que ingresaron voluntariamente, fueron informadas sobre la naturaleza del estudio y

se les efectuó una evaluación completa, la que incluyó anamnesis dirigida, examen físico general y ginecológico, y consignación de parámetros antropométricos. Posteriormente, todas ellas se presentaron en ayunas en nuestro laboratorio (entre las 8:00-9:00 hrs am) y se efectuaron una prueba de tolerancia a la glucosa oral con determinación de glucosa e insulina. En la muestra basal se determinó además el perfil lipídico, los esteroides sexuales y la concentración de adipocitoquinas. El estudio se efectuó durante la fase folicular temprana (entre el 3<sup>er</sup> al 5<sup>o</sup> día de regla) y en las mujeres con SOP con amenorrea en cualquier momento. Durante este periodo se efectuaron también, una ecografía transvaginal con medición del volumen ovárico y recuento del número de folículos. Todas las participantes se efectuaron un examen de composición corporal mediante absorciometría dual de rayos X (DXA) para determinar la composición de grasa en distintas zonas del cuerpo y una resonancia magnética nuclear en la cual se les evaluó el contenido de grasa visceral y subcutánea.

Para finalizar el estudio, se tomaron una biopsia de grasa abdominal subcutánea, para la caracterización del perfil de expresión génica.



Todas las mujeres firmaron los consentimientos informados correspondientes, aprobados por los comités de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y comité de Ética Científico del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

### **Determinaciones antropométricas**

1.- Índice de masa corporal (IMC): Es un índice que evalúa la relación entre el peso corporal y la talla de un individuo, comúnmente utilizado para clasificar el sobrepeso y obesidad en adultos. Se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:  $IMC = \text{Peso (kg)} / \text{talla}^2 \text{ (m)}$ . Esta relación permite clasificar a un individuo en una categoría de peso. Peso normal es considerado como un IMC entre 18 a 24.9, el sobrepeso se define con un IMC entre 25 a 29.9 y la obesidad es clasificada como un  $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ . Esta clasificación corresponde a la recomendación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO, 1995).

2.- Índice cintura-cadera (ICC): Corresponde al diámetro de cintura mínimo dividido por el diámetro de cadera máximo, dado por la fórmula:  $ICC = \text{diámetro cintura (cm)} / \text{diámetro cadera (cm)}$ . Esta relación permite una estimación del tipo de obesidad, en la mujer



debiera ser menor a 0.85. Un patrón de distribución de grasa alterado está dado por un ICC  $\geq 0.85$ , lo que se denominada androide.

3.- Pliegues cutáneos: Los pliegues cutáneos se consideran una medida de valoración de la cantidad de TAS, determinado por el espesor del pliegue de la piel (sin incluir el músculo). En este estudio incluimos los pliegues tricipital, subescapular, abdominal y suprailíaco. Fueron medidos con un caliper (Lange Skinfold Caliper, Cambridge Scientific Industries) y expresados en milímetros (mm). La evaluación de estos pliegues permitió calcular el porcentaje de grasa total y troncal, dado por las siguientes fórmulas:

$$\text{Porcentaje de grasa total (Faulkner)} = [(P \text{ tricipital} + P \text{ subescapular} + P \text{ suprailíaco} + P \text{ abdominal})] \times 0.213 + 7.9$$

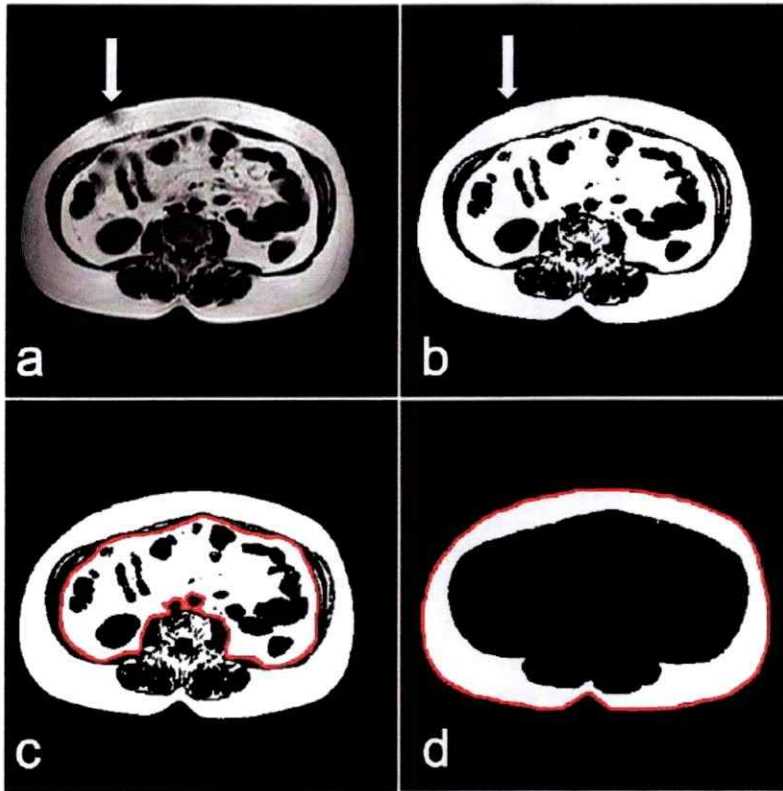
$$\text{Porcentaje de grasa troncal (abdominal)} = P \text{ subescapular} + P \text{ suprailíaco} + P \text{ abdominal}$$

4.- Absorciometría dual de rayos X (DXA): Esta técnica permitió evaluar la composición de huesos (densidad mineral ósea) y de tejidos blandos del cuerpo (masa muscular y masa grasa), así como el contenido de grasa corporal total y regional. Este procedimiento se

realizó en el Centro de Diagnóstico del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (CEDINTA), utilizando un densitómetro Lunar DPX-L (Lunar, Madison, WI; software version 1.30).

5.- Resonancia magnética nuclear (NMR): Esta técnica permitió cuantificar el volumen de la grasa subcutánea abdominal y visceral. El protocolo consistió en recostar a la paciente en posición supina para tomar imágenes sagitales de la región abdominal, adquiriendo cortes transversales de 10 mm de espesor desde el espacio intervertebral L4-L5, continuando hacia los pies para cubrir el abdomen completo. Las imágenes adquiridas fueron analizadas usando el software Image J (National Institute of Health, Bethesda, MD) (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). La figura 4 muestra cómo se demarcaron las zonas abdominal y subcutánea.

Este procedimiento se realizó en el Servicio de Radiología, Unidad de Resonancia Magnética, del Hospital Clínico de la Universidad Católica de Chile. El equipo utilizado fue un resonador Philips Intera MRI 1.5T (Philips Healthcare).



**Figura 4. Cuantificación de la grasa visceral y subcutánea evaluada por resonancia magnética nuclear (NMR).** El cuadro 4a corresponde a la imagen de NMR original. El cuadro 4b muestra la imagen binaria. Las flechas en a y b indican un artefacto en la imagen y su corrección, respectivamente. El cuadro 4c demarca el área de tejido adiposo visceral (TAV) y el 4d del tejido adiposo subcutáneo (TAS). Las imágenes fueron analizadas usando el software Image J. Inicialmente cada imagen fue transformada en binaria, eliminando los artefactos confudentes. Para el cálculo del volumen de TAV y TAS se delineó semiautomáticamente cada una de las zonas y se consideró el número de píxeles blancos de cada imagen binaria multiplicado por el volumen de cada píxel (espesor de corte).

### **Biopsia de tejido adiposo**

Las pacientes fueron citadas en ayuno, a las 7:30 am, al Hospital Clínico de la Universidad de Chile, José Joaquín Aguirre. El procedimiento fue efectuado por un cirujano previamente capacitado,

en una sala estéril y con la infraestructura adecuada. Se obtuvo una muestra de TA abdominal subcutáneo de aproximadamente 600 mg, de acuerdo al procedimiento que se realiza en el Centro de Investigación Biomédica de Pennington (Baton Rouge, LA, USA).

En resumen, el procedimiento consistió en inyectar un anestésico en la zona abdominal peri-umbilical (lidocaína al 2%). Posteriormente se hizo una incisión de 5-6 mm a través de la cual se insertó una aguja de Bergstrom para coleccionar el tejido mediante succión. El TA obtenido mediante esta técnica minimiza la ruptura celular. El tejido fue cortado inmediatamente en secciones de aproximadamente 100 mg y congelado en nitrógeno líquido a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Un trozo de TA fresco fue destinado para análisis por inmunohistoquímica.

### **Determinaciones bioquímicas**

Todas las participantes se efectuaron una prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO), posterior a un ayuno de entre 8 a 12 horas. Luego de la toma de la primera muestra de sangre, se le dio a ingerir a cada paciente, una solución de 75 grs. de glucosa disuelta en 250-300 ml de agua fría. Posteriormente, se tomaron muestras de sangre a los 30, 60 y 120 minutos postcarga de glucosa. En cada muestra se

determinó glucosa e insulina. En la muestra basal se midió la concentración de triglicéridos, colesterol total, colesterol HDL y se calculó el colesterol LDL (fórmula de Friedewald). Además, se determinó la concentración de gonadotrofinas: hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH) y de esteroides sexuales: globulina transportadora de esteroides sexuales (SHBG), testosterona, androstenediona, 17-hidroxiprogesterona y estradiol. Finalmente, se determinaron las citoquinas inflamatorias: TNF- $\alpha$ , IL-6; MCP-1, adiponectina y leptina.

### **Estimación de resistencia a la insulina**

De acuerdo a los valores obtenidos de la PTGO, se pudo caracterizar a las participantes según presentaban o no resistencia a la insulina, de acuerdo a la presencia de alguna de las siguientes alteraciones:

#### 1.- Concentración sérica de insulina

Un valor de insulina en ayuno  $>12.5$  uU/ml ó a las 2 hrs post-carga de glucosa  $> 60$  uU/ml, se consideraron como marcador de RI.

#### 2.- Modelo de valoración homeostática (HOMA-IR)

El cálculo de HOMA-IR es un método para la valoración de la

resistencia insulínica que se ha aplicado principalmente en estudios poblacionales y posee una buena correlación con el clamp euglicémico considerado el "gold standard". Tiene menor costo y complejidad, lo que favorece su aplicación en estudios de prevalencia y es ampliamente utilizado en la práctica clínica. Para su determinación se utiliza la concentración de insulina y de glicemia basal a través de la siguiente fórmula descrita por Matthews (Matthews y col., 1985):

$$\text{HOMA-IR} = \text{Insulina en ayunas } (\mu\text{U/ml}) \times \text{Glicemia en ayunas (mg/dl)} / 405$$

Un valor de HOMA-IR >2.5 se considera como resistente a la insulina, sin embargo un valor menor no descarta su presencia.

### 3.- Índice de sensibilidad a la insulina (ISI composite)

Este método permite evaluar sensibilidad a la insulina y probablemente es el que mejor se correlaciona con el clamp euglicémico (Matsuda & DeFronzo, 1999). Su fórmula está dada por:

$$\text{ISI composite: } \frac{10000}{\sqrt{(\text{GA} \times \text{IA}) \times (\text{Promedio [glucosa]} \times [\text{insulina]})}}$$

GA: glucosa plasmática en ayunas (mg/dl), IA: insulina plasmática en ayunas (μUI/ml)

Un valor de ISI composite <4.5 permite catalogar a un individuo como resistente a la insulina.

### **Parámetros antropométricos-bioquímicos**

Para dar cuenta de las características del TA se utilizaron 2 parámetros que integran mediciones antropométricas y bioquímicas, los cuales se definen como:

1.- Producto de acumulación lipídica (PAL): Este índice se determinó con la concentración sérica de triglicéridos y el diámetro de cintura. Ha sido propuesto como un marcador continuo de sobre acumulación lipídica y un buen predictor de enfermedad cardiovascular y diabetes (Kahn, 2005), en mujeres la fórmula está dada por:

$$\text{PAL} = [\text{Diámetro cintura (cm)} - 58] \times \text{Triglicéridos (mmol/l)}$$

Se han propuesto valores de normalidad dependiendo de la edad, mujeres entre 18-24 años <16.0 y entre 25-49 años <24.6.

2.- Índice de adiposidad visceral (IAV): Este índice comprende un modelo matemático que integra el IMC y la circunferencia de cintura con la concentración de colesterol HDL y de triglicéridos (TG). Se ha propuesto que refleja la adiposidad visceral y estados de resistencia a la insulina (Amato y col., 2010). Es un buen predictor de obesidad, pero relacionado además a síndrome metabólico (Zimmet y col., 2005).



Se calcula por la formula:

$$\text{IAV} = \frac{\text{Diámetro cintura} \times (\text{TG}/0.81) \times (1.52/\text{HDL})}{36.58 + (1.89 \times \text{IMC})}$$

Diámetro cintura (cm), IMC (kg/m<sup>2</sup>), TG (nmol/l), HDL (nmol/l)

### **Ensayos bioquímicos y hormonales**

La glucosa sérica fue determinada por el método de glucosa oxidasa (Roche) y evaluada colorimétricamente en un fotómetro, el coeficiente de variación intra e inter ensayo fue <2.0%. El perfil lipídico (triglicéridos, colesterol total y colesterol HDL) fue determinado por un ensayo colorimétrico (Roche), con un coeficiente de variación intra e inter ensayo de <2.0%. La concentración de colesterol LDL fue calculada por la fórmula de Friedewald (LDL= colesterol total - [HDL+TG/5]).

La concentración de insulina fue medida por un ensayo inmunoradiométrico (IRMA) (DIASource, Nivelles, Belgium), con coeficientes de variación intra e interensayo de 3% y 7%, respectivamente.

La SHBG fue determinada por IRMA con un kit comercial

(Siemens Healthcare Diagnostics), con coeficientes de variación intra e interensayo de 5.0% y 7.9%.

La testosterona, 17-OHP (DIASource, Nivelles, Belgium), androstenediona (DIASource, Nivelles, Belgium) y estradiol (Siemens Healthcare Diagnostics) fueron determinados por radioinmuno ensayo (RIA). Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 3.5% y 5.5 % para testosterona, 1.9% y 5.0% para 17-OHP, 3.8% y 7.5% para androstenediona y 2.7% y 5.0% para estradiol.

LH y FSH fueron medidos por un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (IBL International). Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 5.6 % y 6.2 % y de 10.8 % y 10.6 %, respectivamente.

La concentración de TNF- $\alpha$ , IL-6; MCP-1, adiponectina y leptina séricas fueron determinadas por Luminex (Luminex 200, Austin, TX). Esta metodología consiste en una plataforma de detección diagnóstica basada en los principios de la citometría de flujo, cuya principal ventaja es que permite medir simultáneamente varios analitos en un mismo ensayo y utilizando pequeños volúmenes de muestra con una sensibilidad y especificidad muy alta. Básicamente el ensayo se realiza en la superficie de micro esferas de poliestireno específicas

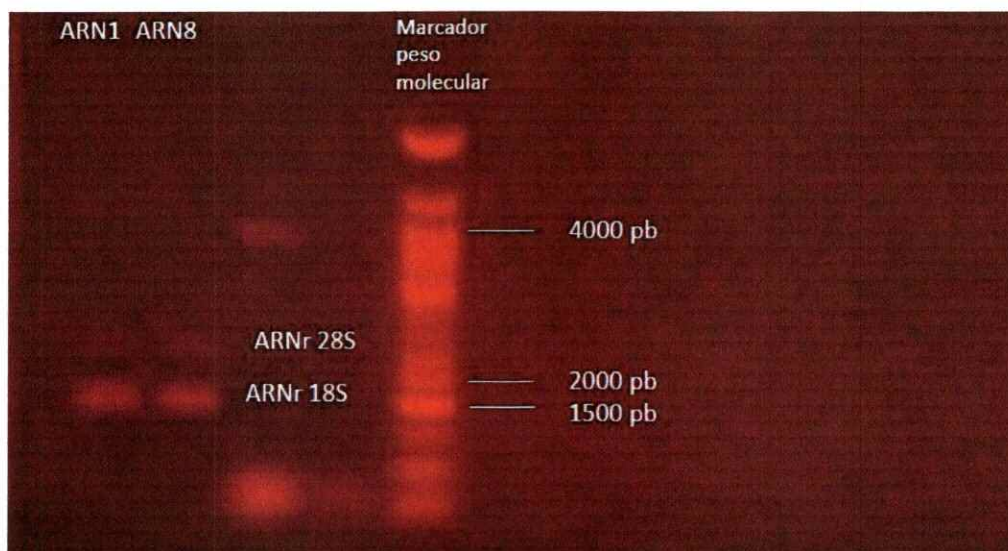
para cada metabolito, las cuales tienen anclados los analitos de detección. La cuantificación de los metabolitos se realiza haciendo pasar las microesferas marcadas con 2 fluoróforos c/u por una corriente de flujo. La concentración de cada metabolito está dada de acuerdo al marcaje fluorescente interno de cada micro esfera (tipo de metabolito y cantidad relativa). Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron no mayor de 2.9% y 5.6%, para los distintos metabolitos. El límite de detección fue de 0.1 pg/ml para TNF- $\alpha$ , 0.4 pg/ml para IL-6, 1.1 pg/ml para MCP-1, 6.0 pg/ml para adiponectina y 4.7 pg/ml para leptina. Las determinaciones de adipocitoquinas séricas se realizaron en el Departamento de Virología (Proyecto Luminex), Facultad de Medicina Norte de la Universidad de Chile.

## **METODOLOGÍA MOLECULAR**

### **1.- Obtención de ARN mensajero (ARNm)**

La extracción de ARNm total del TAS, se realizó mediante un kit comercial para extracción de lípidos de tejido "RNeasy Lipid Tissue Mini Kit" (QIAGEN, Hilden, Germany) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Este es un procedimiento simple que nos permitió obtener un producto de óptima concentración e integridad a partir de

aproximadamente 100 mg de tejido. Brevemente, el procedimiento comprendió cuatro fases diferenciadas: homogenización, extracción, purificación en mini columnas y finalmente elución. La concentración y calidad del ARN fue determinado por espectrofotometría (ND-1000 spectrophotometer, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE9), las concentraciones estuvieron en un rango de entre 50 y 300 ng/ $\mu$ l con un rendimiento  $A_{260/280} > 1.8$ . La integridad de algunas muestras se corroboró por electroforesis con un gel denaturante de agarosa al 1% en presencia de bromuro de etidio, como se muestra en la figura 5.



**Figura 5. Gel de integridad para evaluar la calidad del ARN extraído de las biopsias de grasa subcutánea.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, indica integridad del ARN del TAS mediante la visualización de bandas de ARN ribosomal (18S y 28S).

Todas las muestras fueron tratadas con desoxirribonucleasa (DNasa) (RNase-Free DNase Set Qiagen), como un paso anexo en el

mismo protocolo de extracción, con el fin de remover posibles contaminantes de ADN genómico.

## **2.- Síntesis de ADN complementario (ADNc)**

La primera hebra de ADNc se sintetizó a partir de igual cantidad de ARN inicial, 250 ng, utilizando la enzima transcriptasa reversa Superscript III (SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR, Invitrogen), en un volumen de reacción final de 20 µl, de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

## **3.- Amplificación de ADN por la técnica de PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR)**

El ARNm fue transcrito en forma reversa y amplificado por PCR en tiempo real en un termociclador Stratagene Mx 3000P (Agilent, USA) usando las condiciones de amplificación indicadas para el master mix comercial (Taqman Universal PCR Master Mix II, Applied Biosystems) y las sondas Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) específicas para cada uno de los genes de interés: TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1 y adicionalmente adiponectina, leptina y el receptor de andrógenos (RA). Las sondas TaqMan utilizadas en los ensayos de expresión génica se detallan en la tabla 1.

La mezcla para la amplificación por PCR contenía: 10  $\mu$ l del Master Mix, 1  $\mu$ l de cada sonda 20x (concentración final de 1x), 4  $\mu$ l de ADNc y 5  $\mu$ l de agua, en un volumen final de 20  $\mu$ l. El protocolo consistió en una denaturación inicial a 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos con una denaturación a 95°C por 15 segundos y 1 minuto a 60°C como fase de hibridación y extensión. Las muestras se amplificaron en cuadruplicado.

Para la normalización de los datos se utilizó el gen de GAPDH según el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak & Schmittgen, 2001; Schmittgen & Livak, 2008). El parámetro del ciclo umbral ( $C_t$ ) se definió como el ciclo en el cual la intensidad de la fluorescencia excedió un umbral fijo.

Gen	Nombre comercial
CCL2	CCL2 (Hs00234140_m1)
TNF- $\alpha$	TNF (Hs01113624_g1)
IL-6	IL6 (Hs00985639_m1)
Adiponectina	AdipoQ (Hs00605917_m1)
Leptina	LEP (Hs00174877_m1)
Receptor de andrógenos	AR (Hs00171172_m1)
GAPDH	GAPDH (Hs99999905_m1)

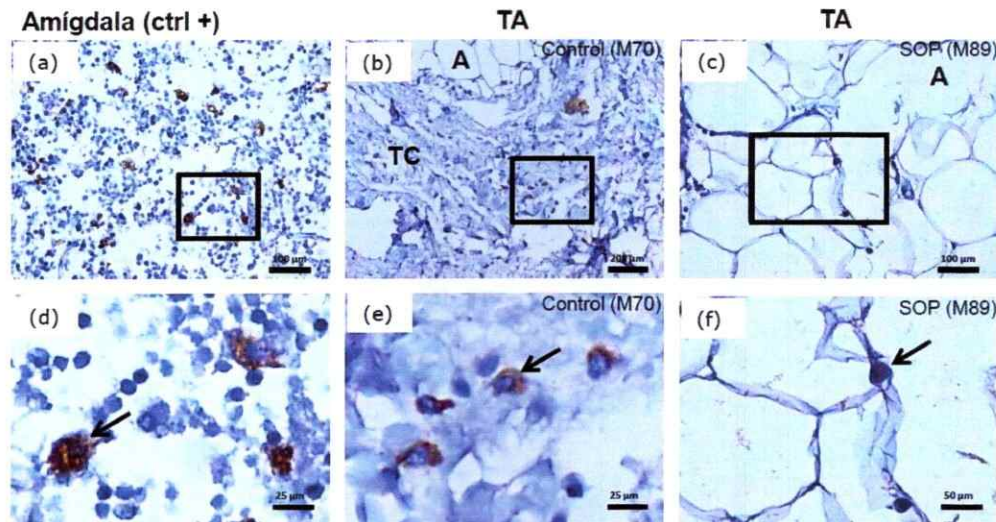
**Tabla 1. Sondas Taqman (Applied Biosystems).** Genes caracterizados en los análisis de expresión y nombre comercial de cada sonda Taqman utilizada en los ensayos de PCR en tiempo real.

## **CARACTERIZACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO SUBCUTÁNEO ABDOMINAL**

### **1.-Inmunohistoquímica**

Las muestras de TA fresco fueron fijadas en formalina al 10% por 48 horas a temperatura ambiente y luego embebidas en parafina en un sistema automatizado. En cada muestra se realizaron cortes seriados (secciones de 5  $\mu\text{m}$ ), los que fueron montados en portaobjetos xilinizados. Se obtuvieron 3 niveles para cada muestra, a intervalos de 50  $\mu\text{m}$ . Las secciones fueron deparafinizadas en xiloles consecutivos y en una serie de alcoholes de concentración decreciente. Se realizó una recuperación antigénica con citrato de sodio 10 mM, pH 6.0, a 80°C durante 20 minutos. Luego se efectuó el bloqueo de peroxidasa endógena con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3% por 20 minutos y posteriormente el bloqueo de uniones inespecíficas por el mismo tiempo (Invitrogen #00-3218). En cada portaobjeto, se incubó una sección con anticuerpo anti CD68 por 30 minutos (1:800, Dako #M0814) y otra sólo con la solución de dilución de los anticuerpos (Invitrogen #00-3218) como control negativo. Posteriormente, las secciones fueron incubadas con un anticuerpo secundario biotinilado y el sistema de estreptavidina peroxidada (LSAB), según las

instrucciones del fabricante (Dako #K0679). Finalmente, las secciones fueron contra teñidas con hematoxilina. Se utilizó amígdala como control positivo. La figura 6 muestra una inmunohistoquímica representativa de una mujer control y una con SOP.



**Figura 6. Inmunodetección de macrófagos en tejido adiposo subcutáneo de mujeres controles y con SOP.** Las microfotografías muestran secciones representativas de tejido adiposo subcutáneo (TAS) de una mujer control (M70) y una mujer con SOP (M89), incubadas con el anticuerpo anti CD68 y contra teñidas con hematoxilina. La figura 6a y 6d corresponden un corte de amígdala utilizada como control positivo (barra 100 y 25  $\mu\text{m}$ , respectivamente). La figura 6b y 6e muestran una sección de tejido adiposo de una mujer control (barra 200 y 25  $\mu\text{m}$ , respectivamente). La figura 6c y 6f corresponde a TAS de una mujer con SOP (barra 100 y 50  $\mu\text{m}$ , respectivamente). En el panel superior, los cuadros contienen macrófagos positivos. En el panel inferior, las flechas indican macrófagos positivos. A: Adipocitos uniloculares (adipocitos blancos), TC: Tejido conectivo.

## **2.-Recuento de macrófagos**

Las células CD68 positivas se reconocieron como los núcleos rodeados de tinción café. Debido al tamaño de las muestras se hizo



un barrido completo (10X) de la totalidad de los cortes en búsqueda de la tinción específica, luego se confirmó con aumento 40X y se contaron los núcleos. Debido al escaso número de macrófagos totales, se consideró la sumatoria de la cuantificación en cada nivel, obteniendo un número total para cada muestra.

Se definieron, arbitrariamente, categorías de acuerdo al número de macrófagos presentes, las cuales se describen a continuación.

#### Categorías presencia macrófagos

0: 0 macrófagos totales

1: 1 a 10 macrófagos totales

2: 11 a 30 macrófagos totales

3: 31 a 50 macrófagos totales

### **3.- Cálculo de área de los adipocitos**

La determinación del área de los adipocitos se realizó mediante el análisis de imágenes computarizadas con el programa ImageJ (NIH). Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio LEICA DM2000. La metodología consistió en medir 100 adipocitos, escogiendo 2 campos al azar y con la precaución de que las zonas

estuvieran histológicamente bien conservadas. Finalmente se promedió el área de los adipocitos de cada muestra y se expresó en  $\text{mm}^2$ .

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos son expresados como medianas y rango. Dado el número de muestras que se incluyó en cada grupo, se utilizó estadística no paramétrica. Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante el test de Mann-Whitney. Las comparaciones entre porcentajes se realizaron con el test de Fisher. Para evaluar las correlaciones entre los distintos parámetros se realizaron correlaciones bivariadas de Spearman. El efecto confundente de la edad fue evaluado mediante regresión múltiple. Los análisis fueron realizados en el programa SPSS 17.0.

## RESULTADOS

La tabla 2 muestra las características clínicas de las mujeres controles y con SOP. Las mujeres con SOP presentaron un peso e índice de masa corporal comparable al de las mujeres controles, sin embargo tuvieron una edad significativamente menor ( $p= 0.034$ ). Salvo por la estatura que fue menor en las mujeres controles, los otros parámetros antropométricos como circunferencia de cintura y cadera, la relación entre la cintura y la cadera y la presión arterial también fue similar entre ambos grupos. Las mujeres con SOP presentaron mayor grado de hirsutismo de acuerdo al score de Ferriman-Gallwey ( $p=0.007$ ) y un volumen ovárico aumentado ( $p=0.020$ ), en comparación a las mujeres controles. Al corregir todos estos parámetros por la edad, se mantuvieron las diferencias entre los grupos.

**Tabla 2.** Características clínicas de mujeres controles y con síndrome de ovario poliquístico (SOP)

	<b>C</b> <b>(n=7)</b>	<b>SOP</b> <b>(n=10)</b>	<b>p</b>
Edad (años)	41.0 (30.0 - 42.0)	31.0 (18 - 42)	0.034
Peso (kg)	57.7 (51.0 - 70.0)	68.0 (54.0 - 83.0)	0.051
Talla (m)	1.52 (1.48 - 1.61)	1.60 (1.49 - 1.70)	0.025
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	25.0 (21.6 - 29.8)	26.9 (20.8 - 30.1)	0.379
Circ. cintura (cm)	75.0 (58.0 - 89.0)	85.0 (65.0 - 87.0)	0.171
Circ. cadera (cm)	95.0 (86.0 - 108.0)	97.0 (86.0 - 106.0)	0.557
ICC	0.83 (0.54 - 0.94)	0.84 (0.70 - 0.99)	0.435
PAS (mm Hg)	110 (90 - 120)	100 (90 - 130)	0.403
PAD (mm Hg)	70 (60 - 70)	65 (50 - 80)	0.712
Score Ferriman-Gallwey	1 (0-2)	11 (2-18)	0.007
Volumen ovárico (cc)	4.7 (3.7 - 6.9)	8.2 (5.2 - 18.1)	0.020

IMC: Índice de masa corporal, ICC: índice cintura/cadera, PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica. Datos expresados en mediana y rango.  $p < 0.05$  se considera significativo.

La tabla 3 muestra el perfil hormonal de las mujeres estudiadas. Las mujeres con SOP presentaron mayor concentración de 17 OHP, androstenediona y testosterona que las mujeres controles. El índice de andrógenos libres tendió a ser mayor en las mujeres con SOP, aunque sin alcanzar significancia estadística ( $p=0.064$ ). La hormona folículo estimulante fue menor en el grupo de mujeres con SOP ( $P=0.010$ ), mientras que las concentraciones de hormona luteinizante y de SHBG fueron comparables entre ambos grupos.

**Tabla 3.** Parámetros hormonales de mujeres controles y con síndrome de ovario poliquístico (SOP)

	<b>C</b> <b>(n=7)</b>	<b>SOP</b> <b>(n=10)</b>	<b>p</b>
LH (UI/L)	3.2 (0.8 - 62.9)	2.6 (1.1 - 7.0)	0.922
FSH (UI/L)	8.4 (6.1 - 10.8)	5.5 (1.0 - 7.4)	0.010
17-OH Progesterona (ng/ml)	0.80 (0.31 - 1.79)	1.6 (0.9 - 2.5)	0.025
Androstenediona (ng/ml)	1.8 (1.0 - 3.1)	2.9 (1.6 - 4.0)	0.040
Testosterona (ng/ml)	0.51 (0.23 - 0.62)	0.81 (0.31 - 1.55)	0.051
Estradiol (pg/ml)	37.1 (10.7 - 69.2)	30.4 (11.7 - 67.2)	0.329
SHBG (nmol/L)	88.1 (42.3 - 118.3)	52.2 (5.4- 107.8)	0.283
IAL	2.2 (0.9 - 4.6)	6.5 (1.2 - 56.3)	0.064

IAL: índice de andrógenos libres. Datos expresados en mediana y rango.  $p < 0.05$  se considera significativo.

Los parámetros metabólicos se presentan en la tabla 4. Las mujeres con SOP presentaron concentraciones basales de glucosa e insulina comparables al grupo control, a su vez el perfil lipídico también fue similar entre los grupos. En las determinaciones posteriores a la carga de glucosa, se pudo evidenciar que las mujeres con SOP presentaron mayor secreción de insulina, con una diferencia estadísticamente significativa para el área bajo la curva de insulina ( $p=0.040$ ). Los parámetros indicativos de secreción de glucosa fueron comparables entre ambos grupos.

Al corregir por edad, no se observaron variaciones en el análisis para ninguna de estas variables.

**Tabla 4.** Parámetros metabólicos en mujeres controles y con síndrome de ovario poliquístico (SOP)

	<b>C</b> <b>(n=7)</b>	<b>SOP</b> <b>(n=10)</b>	<b>p</b>
<b>Ayuno</b>			
Glucosa basal (mg/dl)	75 (68-92)	83 (57-101)	0.696
Insulina basal (uUI/ml)	10.8 (7.7-13.4)	10.3 (4.5-15.0)	0.922
HOMA-IR	2.0 (1.5 - 2.8)	1.9 (1.1 - 3.7)	0.845
Triglicéridos (mg/dl)	144 (84-209)	148 (76 -224)	1.000
Colesterol total (mg/dl)	205 (150-240)	164 (138 -185)	0.064
Colesterol HDL (mg/dl)	48.7 (30.8 - 66.8)	45.6 (25.5 -64.9)	0.626
Colesterol LDL (mg/dl)	180 (121-246)	152 (105.9-176.3)	0.118
<b>Post-estímulo</b>			
Glucosa (mg/dl)	91 (76-133)	104 (73-167)	0.329
Insulina (uUI/ml)	86.1 (17.8-99.7)	98.5 (23.4-278.4)	0.205
Promedio glucosa	111 (83-132)	114 (89-145)	0.526
Promedio insulina	38.2 (24-94)	70.5 (53-134)	0.064
ABC glucosa	14205 (10110-17250)	14565 (10440-19140)	0.696
ABC insulina	4996 (2896-12998)	9730 (7107-20013)	0.040
ISIcomposite	5.4 (3.5-6.8)	3.9 (1.9-5.6)	0.118

ABC: área bajo la curva. Datos expresados en mediana y rango.  $p < 0.05$  se considera significativo.

La tabla 5 muestra el contenido de grasa total y compartimentalizada para las zonas subcutánea y visceral. La determinación de los pliegues cutáneos medidos con un calíper, demostró que el contenido de grasa subcutánea fue comparable entre ambos grupos de mujeres, tanto para la sumatoria de los pliegues totales (Faulkner), así como para los pliegues de la zona abdominal. De manera similar a lo evaluado mediante los pliegues, la cuantificación de grasa corporal por absorciometría dual de rayos X tampoco encontró diferencias en la composición de grasa total y abdominal.

Por su parte, la resonancia magnética nuclear no permitió

encontrar diferencias sustanciales en la cantidad de grasa subcutánea entre mujeres controles y con SOP, así como tampoco en la relación entre el compartimento visceral y subcutáneo. Sólo el contenido de grasa visceral se encontró discretamente aumentado en la mujeres con SOP aunque sin alcanzar una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.315$ ).

Finalmente se calculó el producto de acumulación lipídica y el índice de adiposidad visceral, resultando ambos parámetros comparables entre mujeres controles y con SOP.

Si bien como ya se mencionó, el contenido de grasa visceral fue sólo levemente superior en las mujeres con SOP, al corregir por edad se observó que esta diferencia se hizo estadísticamente significativa ( $p=0.046$ ), con un mayor contenido de grasa visceral para las mujeres con SOP; el resto de los parámetros se mantuvieron comparables luego de ajustar por la edad.

**Tabla 5.** Contenido de grasa total, abdominal y visceral en mujeres controles y con síndrome de ovario poliquístico (SOP), evaluado mediante diferentes métodos

	<b>C</b> <b>(n=7)</b>	<b>SOP</b> <b>(n=10)</b>	<b>p</b>
<b>Pliegues cutáneos</b>			
% Grasa total (%) (Faulkner)	27.0 (19.2-38.6)	34.7 (23.7-40.5)	0.239
Σ pliegues abdominales (mm)	68.5 (40-107)	104.0 (57-120)	0.157
<b>DXA</b>			
Grasa total (%)	33.9 (9.8-42.0)	39.2 (19.3-42.6)	0.427
Grasa troncal total (%)	36.5 (8.1-45.8)	40.3 (15.6-47.7)	0.222
<b>RMN</b>			
TAS (cc)	2981 (1009-3860)	3135 (1673-4215)	0.560
TAV (cc)	794.6 (234-2389)	1595 (194-3515)	0.315
R TAV/TAS	0.25 (0.14-1.02)	0.40 (0.11-2.10)	0.711
<b>Índices antropométrico-bioquímico</b>			
PAL	22.1 (1.6-65.8)	44.4 (6.0-70.8)	0.329
IAV	3.1 (1.8-4.5)	3.3 (1.2-5.9)	0.696

TAS: tejido adiposo subcutáneo, TAV: tejido adiposo visceral, PAL: producto de acumulación lipídica, IAV: índice de adiposidad visceral. Datos expresados en mediana y rango.  $p < 0.05$  se considera significativo

La tabla 6 muestra el porcentaje de mujeres con sobrepeso y con una distribución de grasa de tipo androide de acuerdo al ICC y al producto de acumulación lipídica. El 42.9% de las mujeres controles y el 70% de las mujeres con SOP presentaron sobrepeso, porcentaje que fue comparable entre los grupos ( $p=0.263$ ). La distribución de grasa corporal de tipo androide tampoco mostró diferencias entre ambos grupos.

A pesar de que el porcentaje de mujeres con el PAL sobre el valor de corte normal fue comparable entre ambos grupos, al corregir por edad se observó que las mujeres con SOP tenían más alterado



este índice ( $p=0.039$ ).

**Tabla 6.** Prevalencia de alteraciones antropométricas y antropométrica-bioquímica en mujeres controles y con síndrome de ovario poliquístico (SOP)

	<b>C</b> <b>(n=7)</b>	<b>SOP</b> <b>(n=10)</b>	<b>p</b>
% Sobrepeso-obesidad ( $IMC > 25 \text{ kg/m}^2$ )	42.9	70.0	0.263
% Obesidad tipo androide ( $ICC > 0.85$ )	42.9	40.0	0.906
% PAL elevado	42.9	80.0	0.787

IMC: Índice de masa corporal, ICC: índice cintura/cadera, PAL: producto de acumulación lipídica.

La tabla 7 muestra la prevalencia de RI, evaluada por distintos indicadores. Si bien el porcentaje de mujeres catalogadas como resistentes a la insulina varió dependiendo del método que se utilizó para definirlo, fue siempre similar entre las mujeres controles y con SOP para un mismo parámetro.

**Tabla 7.** Prevalencia de resistencia a la insulina, evaluada por distintos indicadores en mujeres controles y con síndrome de ovario poliquístico (SOP)

	<b>C</b> <b>(n=7)</b>	<b>SOP</b> <b>(n=10)</b>	<b>p</b>
RI ( $HOMA-IR > 2.5$ )	14.3	10.0	0.760
RI ( $Ins_b > 12.5 \text{ y/o-Ins}_{120\text{min}} > 60 \text{ UI/ml}$ )	85.7	80.0	0.115
RI ( $ISI_{\text{composite}} < 4.5$ )	42.9	80.0	0.787
RI (cualquiera de los 3 indicadores)	85.7	90.0	0.115

RI: resistencia a la insulina

La tabla 8 muestra la concentración de citoquinas séricas determinadas por Miliplex. Los datos indican que las mujeres con SOP presentaron mayor concentración sérica de leptina en comparación a las mujeres controles ( $p=0.030$ ). IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$  y adiponectina no

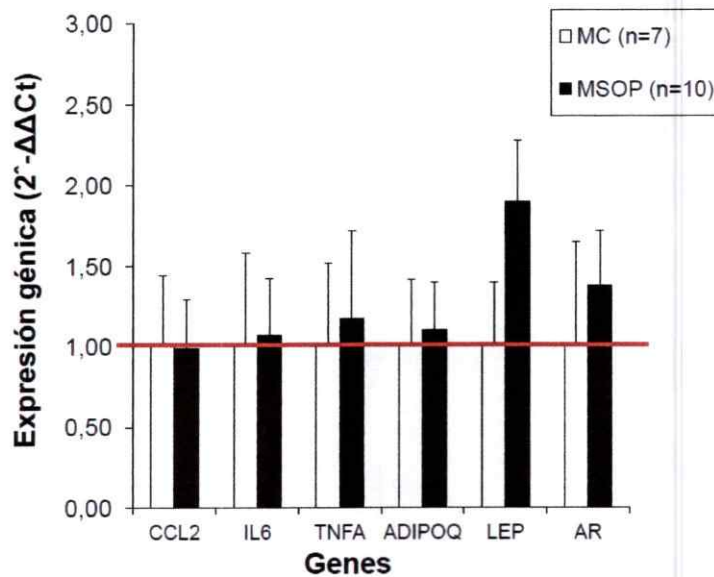
mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Al corregir por la edad, se mantuvo la diferencia en la concentración de leptina entre los grupos ( $p=0.004$ ). Respecto a la concentración de las otras adipocitoquinas, aparentemente, la edad no parece ejercer un efecto.

**Tabla 8.** Concentración de citoquinas séricas (MILLIPLEX MAP) en mujeres controles y con síndrome de ovario poliquístico (SOP)

	<b>C</b> <b>(n=7)</b>	<b>SOP</b> <b>(n=10)</b>	<b>p</b>
IL-6 (pg/ml)	3.9 (1.6 - 12.5)	2.3 (0.3 - 5.9)	0.174
MCP-1 (pg/ml)	209.5 (160 - 348)	195 (111 - 548)	0.704
TNF (pg/ml)	2.0 (0.5 - 6.4)	1.9 (0.15 - 4.3)	0.871
Adiponectina (ug/ml)	22.5 (7.5 - 60.4)	17.0 (4.3 - 51.6)	0.588
Leptina (ng/ml)	8.2 (3.4 - 16.7)	19.2 (6.1 - 25.0)	0.030

Datos expresados en mediana y rango.  $p<0.05$  se considera significativo

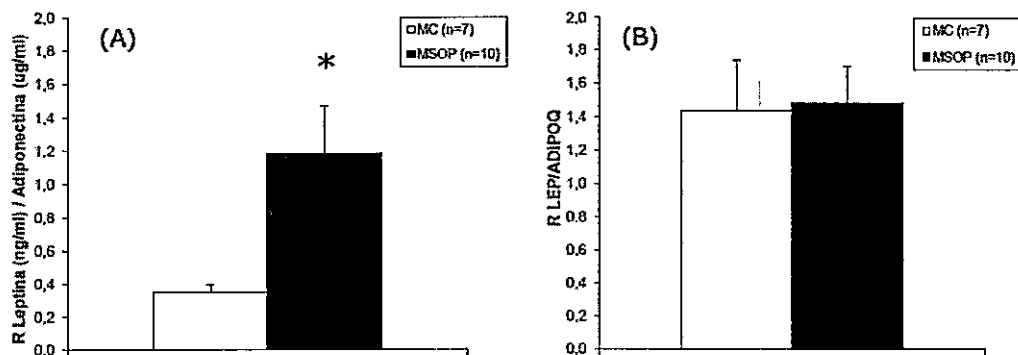
La figura 7 presenta la expresión génica de las adipocitoquinas y del receptor de andrógenos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de ARNm entre el grupo control y con SOP para los genes estudiados.



**Figura 7. Perfil de expresión génica en tejido adiposo subcutáneo de mujeres controles y con SOP.** Para el análisis de expresión génica el ARNm fue transcrito en forma reversa y amplificado por PCR en tiempo real en un termociclador Stratagene Mx 3000P (Agilent, USA) con una master mix comercial (Taqman Universal PCR Master Mix II, Applied Biosystems) y sondas Taqman para cada gen. Para la normalización de los datos se empleó el gen GAPDH. Las muestras se amplificaron en cuadruplicado. La línea roja marca la expresión basal del grupo control. Los valores son expresados en promedio  $\pm$  EEM.

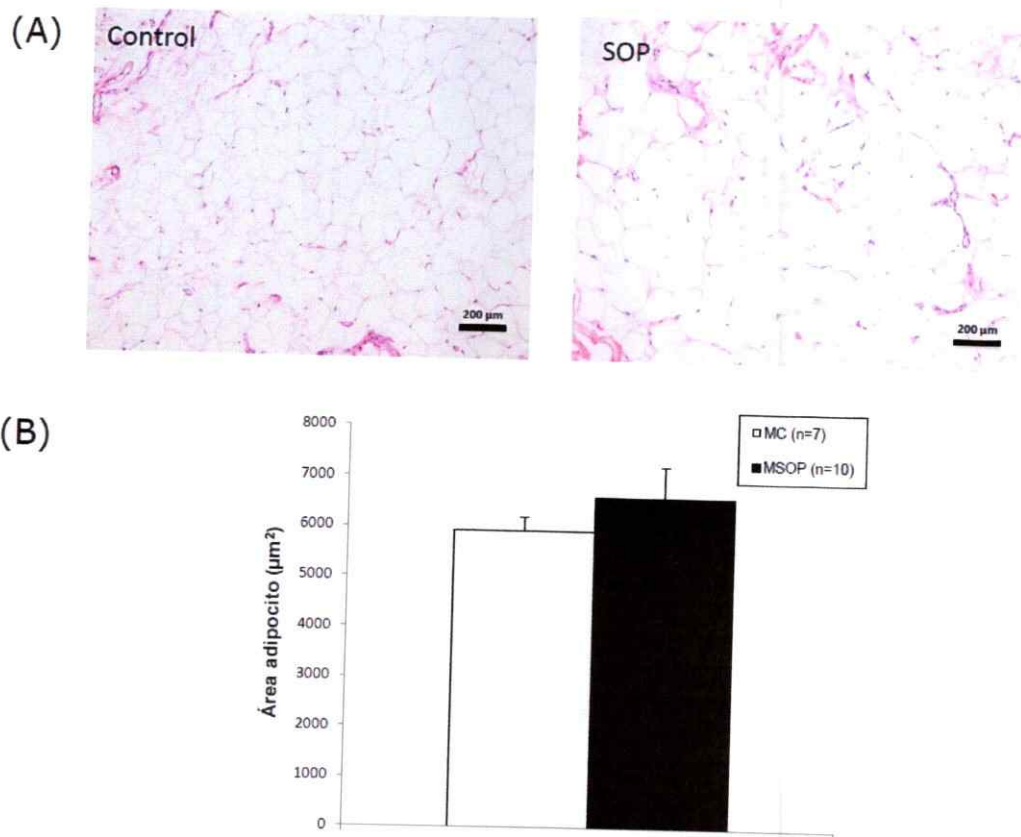
La figura 8 muestra la relación leptina/adiponectina para su concentración sérica y expresión génica. Se observó que la relación entre la concentración sérica de leptina y adiponectina estuvo significativamente aumentada en las mujeres con SOP en comparación a la mujeres controles ( $p=0.013$ ). Esta relación no se mantuvo para su expresión génica ( $p=0.807$ ). Al corregir por la edad, se conservó la relación de la concentración leptina/adiponectina aumentada en las mujeres con SOP ( $p=0.041$ ), sin modificaciones en

la expresión génica.



**Figura 8. Relación leptina/adiponectina para la concentración sérica (A) y expresión génica (B) en mujeres controles y con SOP.** Valores expresados en promedio  $\pm$  EE, \*  $p < 0.05$  al comparar MC vs MSOP.

La figura 9-A muestra una imagen de un corte de tejido adiposo abdominal subcutáneo de una mujer control y de una mujer con SOP, en las cuales se observan el tamaño de los adipocitos. La figura 9-B muestra un gráfico del área de los adipocitos del TAS en ambos grupos de mujeres. Observamos que el área promedio de los adipocitos fue comparable entre las mujeres controles y con SOP. Las mujeres con SOP presentaron un aumento de 11% en el área de sus adipocitos en comparación al grupo control, lo que no fue estadísticamente significativo.



**Figura 9. Área de los adipocitos del tejido adiposo subcutáneo en mujeres controles y con SOP.** La figura 9A muestra una microfotografía de tejido adiposo subcutáneo (TAS) de una mujer control y una mujer con SOP (barra 200 μm). La figura 9B representa el promedio del área de los adipocitos obtenido para cada grupo de mujeres. Los valores están expresados en promedio ± EEM. Las secciones de TAS fueron teñidas con hematoxilina-eosina. Las imágenes de los adipocitos se adquirieron con un microscopio LEICA DM2000 y el análisis del área se realizó con el programa ImageJ (NIH). Para cada muestra se midieron 100 células de 2 campos al azar (40X).

La tabla 9 muestra la cuantificación de macrófagos en el TAS abdominal de ambos grupos de mujeres. No logramos observar diferencias en el número de macrófagos por área, ni en la distribución porcentual en distintas categorías para la presencia de macrófagos

entre mujeres controles y con SOP.

**Tabla 9.** Cuantificación de macrófagos en tejido adiposo de mujeres controles y con síndrome de ovario poliquístico (SOP)

	<b>C</b> <b>(n=7)</b>	<b>SOP</b> <b>(n=10)</b>	<b>p</b>
Nº macrófagos/área	4 (0 - 47)	4 (0 - 50)	0.767
<b>Categoría Nº macrófagos</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	
0 macrófagos n (%)	2 (28.6)	3 (30)	0.632
1-10 macrófagos n (%)	4 (57.1)	4 (40)	
11-30 macrófagos n (%)	0	2 (20)	
31-50 macrófagos n (%)	1 (14.3)	1 (10)	

La tabla 10 muestra las correlaciones bivariadas de Spearman, entre distintos parámetros. Si bien no se encontraron correlaciones entre la expresión génica y la concentración sérica de cada adipocitoquina, se observaron otro tipo de asociaciones. Entre ellas podemos mencionar, por ejemplo, en las mujeres con SOP una asociación negativa entre la concentración sérica de adiponectina y el área bajo la curva de insulina y una asociación positiva entre la concentración sérica de MCP-1 con el número de macrófagos en TA. Además, observamos una asociación positiva de la grasa troncal medida por DXA con el IAL y con la expresión génica de CCL2; de la concentración sérica de leptina con el IAV, y una asociación negativa entre la expresión de adiponectina en grasa y el peso corporal. En estas mujeres también se encontró una asociación positiva de la edad

con la concentración sérica de TNF- $\alpha$  y de MCP-1 y negativa con la expresión de adiponectina. Por último, encontramos una correlación positiva entre el área de los adipocitos y el contenido de grasa visceral.

En las mujeres controles, encontramos una asociación positiva de la edad con parámetros antropométricos de peso y contenido de grasa corporal: IMC, contenido de grasa corporal medido por los pliegues cutáneos, el contenido de grasa visceral y la relación TAV/TAS.



**Tabla 10.** Correlaciones bivariadas para distintos parámetros en mujeres controles y con síndrome de ovario poliquístico (SOP)

		<b>C</b>		<b>SOP</b>	
		<b>r</b>	<b>p</b>	<b>r</b>	<b>p</b>
<b>IAL</b>	% grasa troncal (DXA)	0.607	0.148	0.879	0.001
	RCCL2	0.036	0.939	0.745	0.013
<b>Concentración sérica</b>					
MCP-1	Nº macrófagos	0.177	0.738	0.683	0.029
Adiponectina	ABCinsulina	0.657	0.156	-0.636	0.048
Leptina	HOMA-IR	-0.657	0.156	-0.855	0.002
	IAV	0.314	0.544	0.830	0.003
<b>Expresión génica</b>					
<b>RTNFA</b>	Peso	0.500	0.253	-0.809	0.005
	IMC	0.500	0.253	-0.707	0.022
	R TAV/TAS	0.536	0.215	-0.700	0.036
<b>RLEP</b>	RADIPOQ	0.821	0.023	0.842	0.002
	peso	0.214	0.645	-0.675	0.032
<b>RADIPOQ</b>	RIL6	-0.179	0.702	0.685	0.029
<b>EDAD</b>	IMC	0.815	0.025	0.119	0.743
	TAV	0.852	0.015	0.494	0.177
	Grasa total (Faulkner)	0.820	0.046	-0.067	0.864
	Σ Pliegues cutáneos	0.820	0.046	0.017	0.966
	R TAV/SAT	0.852	0.015	0.343	0.366
	(MCP-1)	0.273	0.600	0.634	0.049
	(TNF-α)	-0.395	0.439	0.640	0.046
	RADIPOQ	0.074	0.875	-0.707	0.022
<b>Área adipocito</b>	TAV	-0.200	0.747	0.747	0.010

r: coeficiente de correlación de Spearman



## DISCUSIÓN

En este estudio en mujeres chilenas con SOP en edad reproductiva observamos que ellas presentaron una alta concentración de leptina sérica en comparación a las mujeres controles. Más aún, la relación entre la concentración de leptina/adiponectina también fue mayor en este grupo. La concentración sérica de adiponectina, IL-6, TNF- $\alpha$  y MCP-1 fue similar entre las mujeres con SOP y controles. Por su parte, la expresión génica de las adipocitoquinas y del RA tampoco mostró diferencias entre los grupos. Cabe mencionar que las mujeres controles presentaron un promedio de edad mayor que las mujeres con SOP. A pesar de ello, el hecho de que las concentraciones de adipocitoquinas fueran similares entre los grupos no fue atribuible a la diferencia de edad. Las mujeres con SOP presentaron un perfil hiperandrogénico, con presencia de RI y obesidad, sin alteraciones en el metabolismo de la glucosa ni del perfil lipídico. Las mujeres con SOP siendo comparables en IMC a las mujeres controles, mostraron un mayor

contenido de grasa visceral al corregir por la edad, lo que podría explicar en parte las alteraciones metabólicas descritas en el SOP.

Es probable que las mujeres con SOP desarrollen un círculo vicioso en el cual el hiperandrogenismo favorece el depósito de grasa visceral y el desarrollo de RI, y esto a su vez, facilita la secreción de andrógenos en estas pacientes (Escobar-Morreale y col., 2006). Si bien, se ha puesto gran interés en estudiar el efecto de la obesidad en las mujeres con SOP, es menos claro lo que ocurre en estados intermedios como el sobrepeso, categoría en la que se encuentran las mujeres en este trabajo.

Nuestros datos mostraron que las mujeres con SOP presentaron mayor concentración sérica de leptina que las mujeres controles, siendo ambos grupos comparables en IMC. Si bien la expresión del gen de leptina en TA se encontró levemente aumentada, no alcanzó significancia estadística, probablemente por el bajo número de mujeres estudiadas. Cabe señalar que estudios anteriores han reportado que la leptina es una de las pocas adipoquinas que podría encontrarse aumentada en circulación en mujeres con SOP (Cervero y col., 2006).

Fulghesu AM et al. encontraron que mujeres italianas con SOP

tenían una alta concentración de leptina, la cual además se correlacionaba con el IMC (Fulghesu y col., 2011). No obstante, otros estudios en mujeres con SOP han mostrado que la concentración de leptina es equivalente a la de mujeres controles, luego de ajustar por grasa corporal (Remsberg y col., 2002; Vicennati y col., 1998).

Dos fuentes de producción de leptina son el TA y el ovario, y ambos son afectados en su estructura y función en estados de obesidad e hiperandrogenismo (Pasquali y col., 2006). Existe evidencia de que la administración de leptina a animales experimentales induce anovulación por efecto directo al ovario (Duggal y col., 2000).

En relación a la adiponectina, estudios previos han reportado resultados conflictivos. Algunos han encontrado disminución en la concentración de adiponectina en mujeres con SOP comparadas con mujeres controles pareadas por IMC, mientras que otros no han encontrado estas diferencias (Fulghesu y col., 2011; Wickham y col., 2011). Un meta análisis que incluyó más de 3400 mujeres, concluyó que después de ajustar por IMC, la concentración de adiponectina era menor en las mujeres con SOP y se correlacionaba con la RI (Toulis y col., 2009). Sin embargo, uno de los grandes problemas es que

muchos de los estudios han medido adiponectina total y no la de alto peso molecular que al parecer tiene mayor correlación con sensibilidad insulínica. En este sentido, un estudio en el cual se determinó la concentración sérica de la adiponectina de alto peso molecular, luego de ajustar por IMC y masa grasa, no encontró diferencias significativas entre mujeres controles y con SOP, pero sí describió una correlación entre adiponectina y grasa visceral en las mujeres con SOP (Barber y col., 2008b). Nuestros resultados son comparables a este último estudio, ya que medimos la adiponectina de alto peso molecular sin encontrar diferencias entre los grupos.

Uno de los parámetros que se han propuesto para caracterizar la funcionalidad del TA es la relación leptina/adiponectina, la cual ha sido descrita como un buen marcador del estado inflamatorio en el SOP (Xita y col., 2007). En el presente estudio encontramos que las mujeres con SOP presentaron aumentada esta relación para la concentración sérica de las adipoquinas, lo que está de acuerdo con lo descrito previamente (Golbahar y col., 2012; Savastano y col., 2011). Sin embargo, esta relación no se encontró alterada para la expresión génica. Lo que podría indicar que a pesar de que ambos genes tienen una expresión similar, hay otros factores que estarían influyendo en la concentración de las proteínas en circulación. Entre ellas podríamos

mencionar la concentración de insulina o de andrógenos, las cuales se encuentran aumentadas en las mujeres con SOP. Además, como ha sido postulado previamente, modificaciones post-transcripcionales también podrían contribuir a la concentración de las adipocitoquinas circulantes (O'Connor y col., 2010).

Respecto a las otras citoquinas, clásicamente se ha considerado que las mujeres con SOP tienen mayor concentración de proteína C reactiva, IL-6 y TNF- $\alpha$  (Lindholm y col., 2011; Orio y col., 2003; Xiong y col., 2011), sin embargo dos estudios recientes encontraron que esas diferencias descritas son causadas exclusivamente por la obesidad y no por la condición SOP (Escobar-Morreale y col., 2003; Möhlig y col., 2004b).

Nuestros resultados muestran que las concentraciones séricas de IL-6, TNF- $\alpha$  y MCP-1 fueron comparables entre ambos grupos de mujeres, lo que es concordante con estudios en los cuales no se han encontrado diferencias en la concentración sérica de citoquinas entre mujeres controles y con SOP, cuando los grupos son comparables en IMC (Lin y col., 2011; Xiong y col., 2011).

Tanto las características intrínsecas del adipocito, así como la expresión génica de las adipocitoquinas son importantes en el

desarrollo de disfunciones metabólicas. Se ha demostrado que el diámetro de los adipocitos de mujeres con SOP es aproximadamente 25% mayor que el de mujeres controles de igual IMC (Mannerås-Holm y col., 2011) y que se asociaría con presencia de RI (Lee & Pratley, 2005). En este estudio evaluamos el área de los adipocitos y su funcionalidad a través de la expresión del ARNm de adipocitoquinas.

El tamaño de los adipocitos del TAS de las mujeres con SOP fue comparable al de mujeres controles, lo que concuerda con los reportado por Rosenbaum et al (D. Rosenbaum y col., 1993). Sin embargo difiere de lo que han descrito una serie de trabajos en los cuales hallaron que los adipocitos de mujeres con SOP tienen mayor diámetro y volumen que los de mujeres controles (Lee & Pratley, 2005; Mannerås-Holm y col., 2014; Mannerås-Holm y col., 2011; Villa & Pratley, 2011). Los adipocitos hipertróficos podrían ser consecuencia de variaciones en su capacidad de almacenamiento y/o función lipolítica y se han asociado a presencia de RI (Lee & Pratley, 2005; Mannerås-Holm y col., 2011). En este sentido, nuestro grupo de mujeres controles y con SOP no difirieron en prevalencia de RI ni en la concentración de lípidos séricos, sin embargo este estudio no evaluó la actividad lipolítica en el TAS. No obstante, en las mujeres con SOP encontramos una correlación positiva entre el área de los

adipocitos del TAS y el contenido de grasa visceral, lo que podría interpretarse fisiológicamente ya que se ha descrito que cuando el TAS alcanza su capacidad máxima de acumulación de triglicéridos, el exceso de lípidos se desvía hacia el TAV, incrementando así el volumen de este compartimento (Ali y col., 2011).

Nuestros resultados indican que la expresión génica de las adipocitoquinas en el TAS de las mujeres con SOP, no difiere a la del grupo control. Estos resultados concuerdan con un estudio en población sueca en el cual se encontró que la expresión de TNF- $\alpha$  y MCP-1 en TAS de mujeres obesas con SOP fue similar al de mujeres obesas controles. Este estudio reportó además, que la presencia de macrófagos fue comparable entre los grupos, concluyendo que sería la obesidad, más que la condición SOP, la que podría explicar las diferencias encontradas en otros trabajos (Lindholm y col., 2011). Otro estudio mostró resultados similares para la expresión de adiponectina y leptina en TA en población danesa (Svendsen y col., 2012). Por el contrario, Carmina et al. describieron que había una menor expresión de adiponectina y leptina en TAS de mujeres con SOP (Carmina y col., 2008). Sin embargo, esas diferencias las atribuyeron al número de participantes, a la metodología de obtención de la muestra y al background genético y étnico.

Evidencia reciente sugiere que los macrófagos que infiltran el TA secretan citoquinas y contribuyen al estado proinflamatorio sistémico observado en sujetos obesos (Weisberg y col., 2003). En este estudio no encontramos diferencias en el número de macrófagos que están infiltrando el TAS entre las mujeres con SOP y controles. Esto podría explicarse, por un lado, en base a que ambos grupos presentaban un IMC y una concentración de citoquinas similar. No obstante, en las mujeres con SOP observamos una correlación positiva entre la concentración sérica de MCP-1 y el número de macrófagos en tejido, lo que confirma la regulación que se ha observado entre ellos (Hu y col., 2011; Tao y col., 2012).

Dado que los andrógenos cumplen una activa función en regular el metabolismo de los adipocitos e influyen en el remodelamiento de los depósitos grasos, es de suma importancia evaluar su contribución en el SOP, cuyo eje central es el hiperandrogenismo. Tanto andrógenos como estrógenos influyen en la distribución y función del TA a través de la unión a sus receptores específicos, los cuales presentan una densidad y actividad diferente en el TAS y en el TAV (Rodríguez-Cuenca y col., 2005). Estos depósitos también difieren en la expresión de enzimas envueltas en el metabolismo de hormonas esteroidales (Blouin y col., 2009).



Datos recientes sugieren que los esteroides sexuales no sólo influyen en la acumulación de grasa, sino que además en la función del TA y en la concentración de las adipocitoquinas (Luque-Ramírez y col., 2013).

Modelos animales expuestos a andrógenos desde la etapa prenatal, confirman la importancia de los andrógenos en el remodelamiento y distribución del TA, así como en las posibles consecuencias metabólicas deletéreas que podrían desarrollarse a lo largo de la vida (Padmanabhan y col., 2010). Este fenómeno también se evidencia en ciertos rasgos antropométricos y metabólicos que hemos detectado en niñas y niños nacidos de mujeres con SOP desde etapas tempranas de la vida (Recabarren y col., 2008; Sir-Petermann y col., 2007). La desregulación de la adipogénesis, como consecuencia de un exceso de andrógenos en etapas tempranas podría llevar a RI sistémica por conversión de grasa desde depósitos subcutáneos a sitios ectópicos como hígado y músculo y perpetuar de esta manera el SOP (Eisner y col., 2003; Roland y col., 2010).

Un estudio de expresión génica del RA en TA, demostró que los niveles de ARNm estaban aumentados en mujeres danesas con SOP en comparación a un grupo control (O'Connor y col., 2010). A

diferencia de esos resultados, en el presente estudio no encontramos diferencias en la expresión génica del receptor de andrógenos entre las mujeres controles y con SOP, así como tampoco observamos alguna asociación directa del receptor con la expresión o concentración de las adipocitoquinas.

En este sentido, la concentración de andrógenos séricos de las mujeres con SOP no se correlacionó con la concentración ni expresión génica de las adipocitoquinas. Estos datos son concordantes con un estudio en mujeres con SOP conducido por Pusalkar et al en el cual se concluyó que a pesar que estas mujeres tenían altas concentraciones de andrógenos y leptina, esas hormonas se regulaban de manera independiente (Pusalkar y col., 2010).

Los estudios acerca de la relación entre las adipocitoquinas y los andrógenos han sido sujeto de resultados conflictivos, por lo tanto, no se ha logrado establecer de manera absoluta una correlación directa entre ellos (Seftel, 2005; Yilmaz y col., 2009).

Aún no existe claridad si en el SOP, el exceso de andrógenos promueve el estado de inflamación o si ocurre en sentido inverso (Repaci y col., 2011). En virtud de la primera hipótesis, cabe recordar que los andrógenos causan hipertrofia de los adipocitos, regulan la

expresión de proteínas y enzimas envueltas en el metabolismo de los carbohidratos y lípidos, y participan en la diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduros (Cortón y col., 2007). Además, promueven la activación de células mononucleares (González, 2012). Esto sugiere que el exceso de andrógenos en el SOP podría promover el proceso inflamatorio (Cortón y col., 2007; González, 2012).

A favor de la segunda hipótesis, estudios *in vitro* han demostrado que estímulos proinflamatorios tienen la capacidad de regular positivamente las enzimas esteroideogénicas de las células de la teca del ovario, responsables de la producción de andrógenos, ese hallazgo podría indicar que la inflamación estimula directamente la producción de andrógenos al menos a nivel del ovario en mujeres con SOP (González y col., 2005; González y col., 2009).

Es interesante mencionar un estudio que propone que en el SOP, el hiperandrogenismo podría ejercer un efecto antiinflamatorio cuando la obesidad está presente, por tanto no promovería la inflamación en este desorden (Ek y col., 1997). Esa única observación supone que los andrógenos tienen un efecto pleiotrópico en la inflamación, dependiente de una combinación entre el SOP y el peso presente en cada individuo (Ek y col., 1997; Gonzalez y col., 2012).

En este trabajo no logramos establecer correlaciones entre la expresión génica y la concentración sérica de cada adipocitoquina. Lo que nos permite sugerir que la concentración circulante de las adipocitoquinas podría ser reflejo del microambiente particular o estar siendo modulada por vías o mecanismos post-transcripcionales, en los cuales también participan otros tipos celulares. Estudios recientes han demostrado que cerca del 90% de las adipoquinas liberadas por el TA, excepto adiponectina y leptina, podrían ser atribuibles a células no grasas (Fain y col., 2004). La secuencia de eventos en la cascada inflamatoria con el TA compromete las células inmunes, primero linfocitos y luego los macrófagos (Nishimura y col., 2009).

No obstante, este estudio logró establecer correlaciones entre algunos parámetros clínicos y bioquímicos. En las mujeres con SOP se encontró una asociación negativa entre la concentración sérica de adiponectina y el área bajo la curva de insulina y una asociación positiva entre la concentración sérica de MCP-1 y el número de macrófagos en TA. También hallamos una asociación positiva de la concentración de leptina con el HOMA-IR y con el IAV. Algunas de estas observaciones habían sido previamente reportadas (Kanda y col., 2006; Mannerås-Holm y col., 2011; Stienstra y col., 2011; Wang y col., 2011). Además, se observaron algunas correlaciones entre la

expresión génica de adipocitoquinas con parámetros de distribución de grasa y peso corporal. Finalmente, en este grupo se encontró una asociación positiva de la edad con la concentración sérica de TNF- $\alpha$  y de MCP-1 y negativa con la expresión de adiponectina, parámetros que probablemente pudieran modificarse con el paso del tiempo, llevando incluso a una exacerbación de la hiperinsulinemia (Puurunen y col., 2011; Ramanand y col., 2014).

En las mujeres controles, se encontró una correlación positiva de la edad con el IMC y con el contenido de grasa corporal evaluado por distintos métodos, lo que es concordante con estudios previos que han reportado un cambio en la distribución de grasa corporal en mujeres de la población general a medida que se acercan a la menopausia (Sowers y col., 2007).

Más específicamente, se ha descrito que las mujeres durante este período de transición podrían ir empeorando su condición metabólica, con un evidente aumento de peso y redistribución de la grasa corporal hacia la zona abdominal y glúteo-femoral (Sowers y col., 2007).

Dado que en el grupo de mujeres con SOP y controles se presentaron diferentes correlaciones entre la expresión y la

concentración de las adipocitoquinas y los parámetros hormonales y antropométricos, se refuerza el concepto de que probablemente existe una regulación distinta en el TAS de cada grupo, la que estaría modulada por un microambiente local, en el cual posiblemente las enzimas que participan tienen distintas actividades y gatillan una serie de procesos biológicos particulares dependiendo de las condiciones que presenta cada mujer.

El desarrollo de un exceso de TA se ha asociado consistentemente con inflamación crónica causada por infiltración de células inmunes activadas y sobreproducción de citoquinas proinflamatorias. Inicialmente, el TAV se asoció más estrechamente con anomalías metabólicas que la adiposidad subcutánea (Hamdy y col., 2006; Lebovitz & Banerji, 2005). Posiblemente, porque el TAV es más vulnerable a la pérdida de regulación inmune y por tanto a inflamación. Aún no está claro si lo que desencadena las alteraciones metabólicas es la adiposidad, la inflamación y/u otros factores. Se ha señalado que muchas de las alteraciones en las citoquinas y adipocitoquinas en sangre reportadas en mujeres con SOP podrían ser producto de un mayor contenido de TA (Puder y col., 2005; Yildirim y col., 2003), dado que varios estudios han encontrado un aumento en marcadores inflamatorios en pacientes con SOP obesas y delgadas

con alto contenido de grasa abdominal (Escobar-Morreale y col., 2011; Wild y col., 2011).

Debido a que en el presente estudio se evaluó el contenido de grasa corporal por métodos con diferentes grados de complejidad, es posible concluir que ambos grupos fueron comparables en cuanto a la distribución de grasa del TAS. Con respecto al TAV, debemos ser más cautos en la interpretación de los resultados pues, al corregir este parámetro por la edad, se observó que el contenido de TAV fue estadísticamente mayor en las mujeres con SOP en comparación a las mujeres controles ( $p=0.046$ ).

Aún no hay consenso respecto al patrón de distribución de grasa corporal en el SOP, y al parecer dependen del tipo de TA que se evalúa, del grado de obesidad de las participantes y de la técnica utilizada. Un estudio conducido por Barber et al. no encontró diferencias en el contenido de grasa subcutánea y visceral entre mujeres obesas con y sin SOP (Barber y col., 2008a). De manera opuesta, otros grupos han reportado que las mujeres con SOP, incluso de peso normal, tienen un mayor contenido de grasa en comparación a mujeres controles de igual IMC (Carmina y col., 2007; Huang y col., 2013; Sprung y col., 2014). Interesantemente un estudio demostró

que las mujeres delgadas con SOP tenían menor contenido de grasa visceral que las mujeres controles (Dolfing y col., 2011).

Se ha postulado que la mayor desregulación en las mujeres con SOP podría observarse en el TAV, el cual estaría acumulando los ácidos grasos y triglicéridos extra del compartimento subcutáneo. Sin embargo, la dificultad en la obtención de este tejido no nos permitió estudiarlo. No obstante, no se debe minimizar la contribución del TAS, pues en extensión constituye el mayor depósito de grasa, cerca del 80% de la grasa total, además es el principal secretor de adiponectina y leptina (Cortón y col., 2007; Cortón y col., 2008; Wahrenberg y col., 1999). Además, estudios cuidadosamente ejecutados han señalado que el TAS es más fuertemente asociado con mediciones de estimación de sensibilidad insulínica derivadas derivada del clamp-euglicémico hiperinsulinémico, el test de referencia para medir la sensibilidad insulínica (Abate y col., 1995; Goodpaster y col., 1997). Fox et al. mostraron que tanto el TAV como el TAS fueron asociados con un perfil metabólico adverso, destacando la importancia que tienen ambos depósitos (Fox y col., 2007).

Recientemente se ha reportado que depósitos de grasa de diferentes orígenes difieren en cuanto a sus marcadores inflamatorios



(Huber y col., 2008; Poulain-Godefroy y col., 2008) y análisis de perfiles genómicos y proteómicos en mujeres obesas con SOP han revelado cambios en varias vías biológicas (Cortón y col., 2007; Cortón y col., 2008). A pesar de que en algunos estudios se han encontrado diferencias en la expresión de moléculas inflamatorias de mujeres con SOP, principalmente en el TAV, no implica que este tejido sea responsable absoluto de la concentración sérica de las citoquinas, ya que sólo un limitado número de mediadores derivados del TA son liberados a la circulación en cantidades suficientes como para provocar un aumento de la concentración sistémica y así lo demuestran dos estudios (Dahlman y col., 2005; Murdolo y col., 2007).

En conclusión, podríamos decir que el hiperandrogenismo no confiere un efecto particular en las características y contenido del TAS de mujeres jóvenes con SOP de peso normal y con sobrepeso. No obstante, existiría un grado de disfunción de este tejido evidenciado por el aumento de la leptina sérica y de la relación leptina/adiponectina, sin alteraciones aparentes en la expresión génica de las adipocitoquinas ni del receptor de andrógenos. Interesantemente, observamos que las mujeres con SOP presentaron un mayor contenido de grasa visceral en comparación al grupo

control, probablemente debido a que este compartimento es más sensible que el TAS a la acción de los andrógenos. No podemos descartar que las características observadas en el TAS y en el perfil inflamatorio de las mujeres con SOP pudiese modificarse si las mujeres con SOP aumentan de peso, agregándose nuevas alteraciones o empeorando las preexistentes.

## CONCLUSIÓN

En el contexto de la caracterización de factores proinflamatorios en mujeres normopeso y sobrepeso con SOP, esta investigación ha hecho los siguientes aportes:

1.- Las concentraciones séricas de IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1 y adiponectina de las mujeres con SOP no estuvieron aumentadas al compararse con mujeres controles de edad y peso similar.

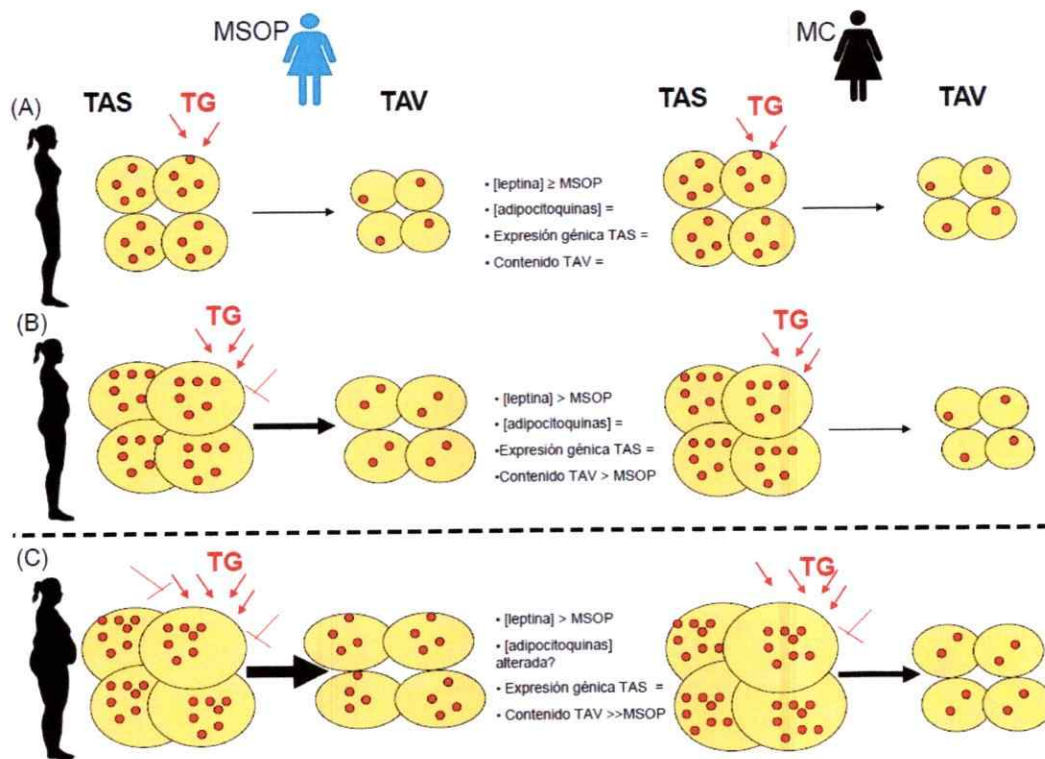
2.- El aumento de la leptina sérica y de la relación leptina/adiponectina que presentaban estas mujeres, podría dar cuenta de algún tipo de disfunción del tejido adiposo.

3.- El tejido adiposo subcutáneo de las mujeres con SOP presentó una expresión génica normal de IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP-1, adiponectina y leptina, donde los andrógenos no parecen tener un rol mayor en su expresión. Además este tejido mostró características morfológicas similares a las de mujeres controles.

4.- El aumento del contenido de tejido adiposo visceral, pero no

del subcutáneo en las mujeres con SOP podría ser consecuencia de una mayor sensibilidad a los andrógenos de este compartimento.

En conjunto, podemos decir que mujeres con SOP en edad reproductiva y con sobrepeso tendrían un patrón de expresión de citoquinas del tejido adiposo subcutáneo comparable al de mujeres controles de igual peso corporal, con un aumento sólo en la secreción de leptina sérica. Sin embargo no podemos descartar que en condiciones más severas de obesidad, en interacción con los andrógenos e insulina, pudiera modificarse el perfil proinflamatorio.



**Figura 10. Modelo integrativo propuesto: Características del tejido adiposo subcutáneo, secreción y expresión génica de adipocitoquinas y respuesta del tejido adiposo visceral en mujeres controles (MC) y con SOP (MSOP) de peso normal, con sobrepeso y obesas. (A)** En una condición de peso normal, el TAS y TAV de las MSOP es similar en su cantidad, función y expresión de genes proinflamatorios al de mujeres controles de igual peso. Sólo la leptina sérica podría estar aumentada en las MSOP. **(B)** En estados de sobrepeso, las MSOP podrían presentar indicios de una disfunción del TAS, con una disminuida capacidad de almacenar TG, desviando el exceso hacia el TAV. Frente a este estímulo los adipocitos del TAV acumulan los TG y aumentan de tamaño, lo que observamos en las MSOP como un mayor contenido de TAV en comparación a las MC. Las otras propiedades del TAS no sufrirían modificaciones sustanciales. La leptina sérica se encuentra aumentada en las MSOP. **(C)** En franca obesidad es probable que las MSOP presenten un TAS con adipocitos con una muy limitada capacidad de expansión, por tanto de almacenar TG. La cantidad de este tejido es igual o levemente superior al de MC. Sin embargo, podrían presentar un evidente aumento del contenido de TAV, el cual acumula el exceso de TG. La leptina sérica se mantendría aumentada y es probable que otras adipocitoquinas presenten una alterada secreción. Además, el TAS al estar sometido a un mayor estrés podría presentar diferencias en la expresión génica de algunas adipocitoquinas. TAS: tejido adiposo subcutáneo, TAV: tejido adiposo visceral, TG: triglicéridos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abate, N., Garg, A., Peshock, R.M., Stray-Gundersen, J., & Grundy, S.M. 1995. Relationships of generalized and regional adiposity to insulin sensitivity in men. *J Clin Invest.* 96: 88-98
- Ali, A.T., Ferris, W.F., Naran, N.H., & Crowther, N.J. 2011. Insulin resistance in the control of body fat distribution: A new hypothesis. *Horm Metab Res.* 43: 77-80
- Amato, M.C., Giordano, C., Galia, M., Criscimanna, A., Vitabile, S., Midiri, M., Galluzzo, A., & Group, A.S. 2010. Visceral adiposity index: A reliable indicator of visceral fat function associated with cardiometabolic risk. *Diabetes Care.* 33: 920-922
- Barber, T.M., Golding, S.J., Alvey, C., Wass, J.A., Karpe, F., Franks, S., & McCarthy, M.I. 2008a. Global adiposity rather than abnormal regional fat distribution characterizes women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 93: 999-1004
- Barber, T.M., Hazell, M., Christodoulides, C., Golding, S.J., Alvey, C., Burling, K., Vidal-Puig, A., Groome, N.P., Wass, J.A., Franks, S., & McCarthy, M.I. 2008b. Serum levels of retinol-binding protein 4 and adiponectin in women with polycystic ovary syndrome: Associations with visceral fat but no evidence for fat mass-independent effects on pathogenesis in this condition. *J Clin Endocrinol Metab.* 93: 2859-2865
- Barber, T.M., McCarthy, M.I., Wass, J.A., & Franks, S. 2006. Obesity and polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 65: 137-145
- Bell, L.N., Cai, L., Johnstone, B.H., Traktuev, D.O., March, K.L., & Considine, R.V. 2008. A central role for hepatocyte growth factor in adipose tissue angiogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 294: E336-344
- Blouin, K., Nadeau, M., Perreault, M., Veilleux, A., Drolet, R., Marceau, P., Mailloux, J., Luu-The, V., & Tchernof, A. 2010. Effects of androgens on adipocyte differentiation and adipose

- tissue explant metabolism in men and women. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 72: 176-188
- Blouin, K., Veilleux, A., Luu-The, V., & Tchernof, A. 2009. Androgen metabolism in adipose tissue: Recent advances. *Mol Cell Endocrinol*. 301: 97-103
- Bohler, H., Mokshagundam, S., & Winters, S.J. 2010. Adipose tissue and reproduction in women. *Fertil Steril*. 94: 795-825
- Borrueil, S., Fernández-Durán, E., Alpañés, M., Martí, D., Alvarez-Blasco, F., Luque-Ramírez, M., & Escobar-Morreale, H.F. 2013. Global adiposity and thickness of intraperitoneal and mesenteric adipose tissue depots are increased in women with polycystic ovary syndrome (pcos). *J Clin Endocrinol Metab*. 98: 1254-1263
- Boulman, N., Levy, Y., Leiba, R., Shachar, S., Linn, R., Zinder, O., & Blumenfeld, Z. 2004. Increased c-reactive protein levels in the polycystic ovary syndrome: A marker of cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 89: 2160-2165
- Canello, R., & Clément, K. 2006. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG*. 113: 1141-1147
- Canello, R., Henegar, C., Viguerie, N., Taleb, S., Poitou, C., Rouault, C., Coupaye, M., Pelloux, V., Hugol, D., Bouillôt, J.L., Bouloumié, A., Barbatelli, G., Cinti, S., Svensson, P.A., Barsh, G.S., Zucker, J.D., Basdevant, A., Langin, D., & Clément, K. 2005. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes*. 54: 2277-2286
- Carmina, E., Bucchieri, S., Esposito, A., Del Puente, A., Mansueto, P., Orio, F., Di Fede, G., & Rini, G. 2007. Abdominal fat quantity and distribution in women with polycystic ovary syndrome and extent of its relation to insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 92: 2500-2505
- Carmina, E., Chu, M.C., Moran, C., Tortoriello, D., Vardhana, P., Tena, G., Preciado, R., & Lobo, R. 2008. Subcutaneous and omental fat expression of adiponectin and leptin in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 89: 642-648
- Carmina, E., Orio, F., Palomba, S., Cascella, T., Longo, R.A., Colao, A.M., Lombardi, G., & Lobo, R.A. 2005. Evidence for altered adipocyte function in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol*. 152: 389-394
- Cascella, T., Palomba, S., De Sio, I., Manguso, F., Giallauria, F., De Simone, B., Tafuri, D., Lombardi, G., Colao, A., & Orio, F. 2008. Visceral fat is associated with cardiovascular risk in women with

- polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 23: 153-159
- Cervero, A., Domínguez, F., Horcajadas, J.A., Quiñonero, A., Pellicer, A., & Simón, C. 2006. The role of the leptin in reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 18: 297-303
- Cortón, M., Botella-Carretero, J.I., Benguría, A., Villuendas, G., Zaballos, A., San Millán, J.L., Escobar-Morreale, H.F., & Peral, B. 2007. Differential gene expression profile in omental adipose tissue in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 92: 328-337
- Cortón, M., Botella-Carretero, J.I., López, J.A., Camafeita, E., San Millán, J.L., Escobar-Morreale, H.F., & Peral, B. 2008. Proteomic analysis of human omental adipose tissue in the polycystic ovary syndrome using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Hum Reprod.* 23: 651-661
- Covington, J.D., Bajpeyi, S., Moro, C., Tchoukalova, Y.D., Ebenezer, P.J., Burk, D.H., Ravussin, E., & Redman, L.M. 2015. Potential effects of aerobic exercise on the expression of perilipin 3 in the adipose tissue of women with polycystic ovary syndrome: A pilot study. *Eur J Endocrinol.* 172: 47-58
- Cutolo, M., Accardo, S., Villaggio, B., Barone, A., Sulli, A., Coviello, D.A., Carabbio, C., Felli, L., Miceli, D., Farruggio, R., Carruba, G., & Castagnetta, L. 1996. Androgen and estrogen receptors are present in primary cultures of human synovial macrophages. *J Clin Endocrinol Metab.* 81: 820-827
- Charo, I.F., Myers, S.J., Herman, A., Franci, C., Connolly, A.J., & Coughlin, S.R. 1994. Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 2752-2756
- Dahlman, I., Kaaman, M., Olsson, T., Tan, G.D., Bickerton, A.S.T., Wahlen, K., Andersson, J., Nordstrom, E.A., Blomqvist, L., Sjogren, A., Forsgren, M., Attersand, A., & Arner, P. 2005. A unique role of monocyte chemoattractant protein 1 among chemokines in adipose tissue of obese subjects. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 90: 5834-5840
- Dicker, A., Rydén, M., Näslund, E., Muehlen, I.E., Wirén, M., Lafontan, M., & Arner, P. 2004. Effect of testosterone on lipolysis in human pre-adipocytes from different fat depots. *Diabetologia.* 47: 420-428
- Dieudonne, M.N., Pecquery, R., Boumediene, A., Leneuve, M.C., & Giudicelli, Y. 1998. Androgen receptors in human preadipocytes and adipocytes: Regional specificities and regulation by sex





- steroids. *Am J Physiol.* 274: C1645-1652
- Dolfing, J.G., Stassen, C.M., van Haard, P.M., Wolffenbuttel, B.H., & Schweitzer, D.H. 2011. Comparison of mri-assessed body fat content between lean women with polycystic ovary syndrome (pcos) and matched controls: Less visceral fat with pcos. *Hum Reprod.* 26: 1495-1500
- Drolet, R., Bélanger, C., Fortier, M., Huot, C., Mailloux, J., Légaré, D., & Tchernof, A. 2009. Fat depot-specific impact of visceral obesity on adipocyte adiponectin release in women. *Obesity (Silver Spring).* 17: 424-430
- Duggal, P.S., Van Der Hoek, K.H., Milner, C.R., Ryan, N.K., Armstrong, D.T., Magoffin, D.A., & Norman, R.J. 2000. The in vivo and in vitro effects of exogenous leptin on ovulation in the rat. *Endocrinology.* 141: 1971-1976
- Echiburú, B., Pérez-Bravo, F., Maliqueo, M., Ladrón de Guevara, A., Gálvez, C., Crisosto, N., & Sir-Petermann, T. 2012. Cag repeat polymorphism of androgen receptor gene and x-chromosome inactivation in daughters of women with polycystic ovary syndrome (pcos): Relationship with endocrine and metabolic parameters. *Gynecol Endocrinol.* 28: 516-520
- Egashira, K. 2003. Molecular mechanisms mediating inflammation in vascular disease: Special reference to monocyte chemoattractant protein-1. *Hypertension.* 41: 834-841
- Eisner, J.R., Dumesic, D.A., Kemnitz, J.W., Colman, R.J., & Abbott, D.H. 2003. Increased adiposity in female rhesus monkeys exposed to androgen excess during early gestation. *Obes Res.* 11: 279-286
- Ek, I., Arner, P., Bergqvist, A., Carlström, K., & Wahrenberg, H. 1997. Impaired adipocyte lipolysis in nonobese women with the polycystic ovary syndrome: A possible link to insulin resistance? *J Clin Endocrinol Metab.* 82: 1147-1153
- Erdogan, M., Karadeniz, M., Berdeli, A., Alper, G., Caglayan, O., & Yilmaz, C. 2008. The relationship of the interleukin-6 -174 g>c gene polymorphism with oxidative stress markers in turkish polycystic ovary syndrome patients. *J Endocrinol Invest.* 31: 624-629
- Escobar-Morreale, H.F., Calvo, R.M., Sancho, J., & San Millán, J.L. 2001. Tnf-alpha and hyperandrogenism: A clinical, biochemical, and molecular genetic study. *J Clin Endocrinol Metab.* 86: 3761-3767
- Escobar-Morreale, H.F., Luque-Ramírez, M., & González, F. 2011. Circulating inflammatory markers in polycystic ovary syndrome:

- A systematic review and metaanalysis. *Fertil Steril.* 95: 1048-1058.e1041-1042
- Escobar-Morreale, H.F., Luque-Ramírez, M., & San Millán, J.L. 2005. The molecular-genetic basis of functional hyperandrogenism and the polycystic ovary syndrome. *Endocr Rev.* 26: 251-282
- Escobar-Morreale, H.F., Villuendas, G., Botella-Carretero, J.I., Alvarez-Blasco, F., Sanchón, R., Luque-Ramírez, M., & San Millán, J.L. 2006. Adiponectin and resistin in pcos: A clinical, biochemical and molecular genetic study. *Hum Reprod.* 21: 2257-2265
- Escobar-Morreale, H.F., Villuendas, G., Botella-Carretero, J.I., Sancho, J., & San Millán, J.L. 2003. Obesity, and not insulin resistance, is the major determinant of serum inflammatory cardiovascular risk markers in pre-menopausal women. *Diabetologia.* 46: 625-633
- Fain, J.N., Madan, A.K., Hiler, M.L., Cheema, P., & Bahouth, S.W. 2004. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology.* 145: 2273-2282
- Fernández-Real, J.M., & Ricart, W. 2003. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev.* 24: 278-301
- Ferrante, A.W. 2007. Obesity-induced inflammation: A metabolic dialogue in the language of inflammation. *J Intern Med.* 262: 408-414
- Fox, C.S., Massaro, J.M., Hoffmann, U., Pou, K.M., Maurovich-Horvat, P., Liu, C.Y., Vasan, R.S., Murabito, J.M., Meigs, J.B., Cupples, L.A., D'Agostino, R.B., & O'Donnell, C.J. 2007. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: Association with metabolic risk factors in the framingham heart study. *Circulation.* 116: 39-48
- Frayn, K.N., Karpe, F., Fielding, B.A., Macdonald, I.A., & Coppack, S.W. 2003. Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 27: 875-888
- Fujioka, S., Matsuzawa, Y., Tokunaga, K., & Tarui, S. 1987. Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity. *Metabolism.* 36: 54-59
- Fulghesu, A.M., Sanna, F., Uda, S., Magnini, R., Portoghese, E., & Batetta, B. 2011. Il-6 serum levels and production is related to an altered immune response in polycystic ovary syndrome girls

- with insulin resistance. *Mediators Inflamm.* 2011: 389317
- Gambineri, A., Pelusi, C., Vicennati, V., Pagotto, U., & Pasquali, R. 2002. Obesity and the polycystic ovary syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 26: 883-896
- Gerhardt, C.C., Romero, I.A., Canello, R., Camoin, L., & Strosberg, A.D. 2001. Chemokines control fat accumulation and leptin secretion by cultured human adipocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 175: 81-92
- Glintborg, D., Andersen, M., Hagen, C., Frystyk, J., Hulstrøm, V., Flyvbjerg, A., & Hermann, A.P. 2006. Evaluation of metabolic risk markers in polycystic ovary syndrome (pcos). Adiponectin, ghrelin, leptin and body composition in hirsute pcos patients and controls. *Eur J Endocrinol.* 155: 337-345
- Golbahar, J., Das, N.M., Al-Ayadhi, M.A., & Gumaa, K. 2012. Leptin-to-adiponectin, adiponectin-to-leptin ratios, and insulin are specific and sensitive markers associated with polycystic ovary syndrome: A case-control study from bahrain. *Metab Syndr Relat Disord.* 10: 98-102
- González, F. 2012. Inflammation in polycystic ovary syndrome: Underpinning of insulin resistance and ovarian dysfunction. *Steroids.* 77: 300-305
- González, F., Minium, J., Rote, N.S., & Kirwan, J.P. 2005. Hyperglycemia alters tumor necrosis factor-alpha release from mononuclear cells in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 90: 5336-5342
- González, F., Rote, N.S., Minium, J., & Kirwan, J.P. 2009. Evidence of proatherogenic inflammation in polycystic ovary syndrome. *Metabolism.* 58: 954-962
- Gonzalez, F., Sia, C.L., Stanczyk, F.Z., Blair, H.E., & Krupa, M.E. 2012. Hyperandrogenism exerts an anti-inflammatory effect in obese women with polycystic ovary syndrome. *Endocrine.* 42: 726-735
- Goodpaster, B.H., Krishnaswami, S., Harris, T.B., Katsiaras, A., Kritchevsky, S.B., Simonsick, E.M., Nevitt, M., Holvoet, P., & Newman, A.B. 2005. Obesity, regional body fat distribution, and the metabolic syndrome in older men and women. *Arch Intern Med.* 165: 777-783
- Goodpaster, B.H., Thaete, F.L., Simoneau, J.A., & Kelley, D.E. 1997. Subcutaneous abdominal fat and thigh muscle composition predict insulin sensitivity independently of visceral fat. *Diabetes.* 46: 1579-1585
- Goossens, G.H., Blaak, E.E., Saris, W.H., & van Baak, M.A. 2004.

- Angiotensin ii-induced effects on adipose and skeletal muscle tissue blood flow and lipolysis in normal-weight and obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 89: 2690-2696
- Gorska, E., Popko, K., Stelmaszczyk-Emmel, A., Ciepiela, O., Kucharska, A., & Wasik, M. 2010. Leptin receptors. *Eur J Med Res.* 15 Suppl 2: 50-54
- Goumenou, A.G., Matalliotakis, I.M., Koumantakis, G.E., & Panidis, D.K. 2003. The role of leptin in fertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 106: 118-124
- Group, R.E.A.-S.P.C.W. 2004. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 81: 19-25
- Halberg, N., Wernstedt-Asterholm, I., & Scherer, P.E. 2008. The adipocyte as an endocrine cell. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 37: 753-768, x-xi
- Hamdy, O., Porramatikul, S., & Al-Ozairi, E. 2006. Metabolic obesity: The paradox between visceral and subcutaneous fat. *Curr Diabetes Rev.* 2: 367-373
- Hamilton, B.S., Paglia, D., Kwan, A.Y., & Deitel, M. 1995. Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. *Nat Med.* 1: 953-956
- Hotamisligil, G.S., & Erbay, E. 2008. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat Rev Immunol.* 8: 923-934
- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., & Spiegelman, B.M. 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 259: 87-91
- Hu, W., Qiao, J., Yang, Y., Wang, L., & Li, R. 2011. Elevated c-reactive protein and monocyte chemoattractant protein-1 in patients with polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 157: 53-56
- Huang, Z.H., Manickam, B., Ryvkin, V., Zhou, X.J., Fantuzzi, G., Mazzone, T., & Sam, S. 2013. Pcos is associated with increased cd11c expression and crown-like structures in adipose tissue and increased central abdominal fat depots independent of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 98: E17-24
- Huber, J., Kiefer, F.W., Zeyda, M., Ludvik, B., Silberhumer, G.R., Prager, G., Zlabinger, G.J., & Stulnig, T.M. 2008. Cc chemokine and cc chemokine receptor profiles in visceral and subcutaneous adipose tissue are altered in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 93: 3215-3221
- Ibrahim, M.M. 2010. Subcutaneous and visceral adipose tissue:

- Structural and functional differences. *Obes Rev.* 11: 11-18
- Joyner, J., Hutley, L., & Cameron, D. 2002. Intrinsic regional differences in androgen receptors and dihydrotestosterone metabolism in human preadipocytes. *Horm Metab Res.* 34: 223-228
- Kahn, H.S. 2005. The "lipid accumulation product" performs better than the body mass index for recognizing cardiovascular risk: A population-based comparison. *BMC Cardiovasc Disord.* 5: 26
- Kanai, H., Matsuzawa, Y., Kotani, K., Keno, Y., Kobatake, T., Nagai, Y., Fujioka, S., Tokunaga, K., & Tarui, S. 1990. Close correlation of intra-abdominal fat accumulation to hypertension in obese women. *Hypertension.* 16: 484-490
- Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Miyachi, H., Maeda, S., Egashira, K., & Kasuga, M. 2006. Mcp-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest.* 116: 1494-1505
- Kershaw, E.E., & Flier, J.S. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 89: 2548-2556
- Lebovitz, H.E., & Banerji, M.A. 2005. Point: Visceral adiposity is causally related to insulin resistance. *Diabetes Care.* 28: 2322-2325
- Lee, Y.H., & Pratley, R.E. 2005. The evolving role of inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Curr Diab Rep.* 5: 70-75
- Lefterova, M.I., & Lazar, M.A. 2009. New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab.* 20: 107-114
- Legro, R.S. 2001. Polycystic ovary syndrome: The new millenium. *Mol Cell Endocrinol.* 184: 87-93
- Lin, Y.S., Tsai, S.J., Lin, M.W., Yang, C.T., Huang, M.F., & Wu, M.H. 2011. Interleukin-6 as an early chronic inflammatory marker in polycystic ovary syndrome with insulin receptor substrate-2 polymorphism. *Am J Reprod Immunol.* 66: 527-533
- Lindholm, A., Blomquist, C., Bixo, M., Dahlbom, I., Hansson, T., Sundström Poromaa, I., & Burén, J. 2011. No difference in markers of adipose tissue inflammation between overweight women with polycystic ovary syndrome and weight-matched controls. *Hum Reprod.* 26: 1478-1485
- Livak, K.J., & Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2(-delta delta c(t)) method. *Methods.* 25: 402-408
- Lönnqvist, F., Arner, P., Nordfors, L., & Schalling, M. 1995. Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of

- human obese subjects. *Nat Med.* 1: 950-953
- Luque-Ramírez, M., Martínez-García, M., Montes-Nieto, R., Fernández-Durán, E., Insenser, M., Alpañés, M., & Escobar-Morreale, H.F. 2013. Sexual dimorphism in adipose tissue function as evidenced by circulating adipokine concentrations in the fasting state and after an oral glucose challenge. *Hum Reprod.* 28: 1908-1918
- Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R.E., Lee, G.H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., & Ranganathan, S. 1995. Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob rna in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med.* 1: 1155-1161
- Maliqueo, M., Atwater, I., Lahsen, R., Pérez-Bravo, F., Angel, B., & Sir-Petermann, T. 2003. Proinsulin serum concentrations in women with polycystic ovary syndrome: A marker of beta-cell dysfunction? *Hum Reprod.* 18: 2683-2688
- Mandal, P., Pratt, B.T., Barnes, M., McMullen, M.R., & Nagy, L.E. 2011. Molecular mechanism for adiponectin-dependent m2 macrophage polarization: Link between the metabolic and innate immune activity of full-length adiponectin. *J Biol Chem.* 286: 13460-13469
- Mannerås-Holm, L., Benrick, A., & Stener-Victorin, E. 2014. Gene expression in subcutaneous adipose tissue differs in women with polycystic ovary syndrome and controls matched pair-wise for age, body weight, and body mass index. *Adipocyte.* 3: 190-196
- Mannerås-Holm, L., Leonhardt, H., Kullberg, J., Jennische, E., Odén, A., Holm, G., Hellström, M., Lönn, L., Olivecrona, G., Stener-Victorin, E., & Lönn, M. 2011. Adipose tissue has aberrant morphology and function in pcos: Enlarged adipocytes and low serum adiponectin, but not circulating sex steroids, are strongly associated with insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 96: E304-311
- Martínez-García, M., Montes-Nieto, R., Fernández-Durán, E., Insenser, M., Luque-Ramírez, M., & Escobar-Morreale, H.F. 2013. Evidence for masculinization of adipokine gene expression in visceral and subcutaneous adipose tissue of obese women with polycystic ovary syndrome (pcos). *J Clin Endocrinol Metab.* 98: E388-396
- Matsuda, M., & DeFronzo, R.A. 1999. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: Comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care.* 22: 1462-1470
- Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F., & Turner, R.C. 1985. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma

- glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 28: 412-419
- Meyer, L.K., Ciaraldi, T.P., Henry, R.R., Wittgrove, A.C., & Phillips, S.A. 2013. Adipose tissue depot and cell size dependency of adiponectin synthesis and secretion in human obesity. *Adipocyte*. 2: 217-226
- Michalakis, K.G., & Segars, J.H. 2010. The role of adiponectin in reproduction: From polycystic ovary syndrome to assisted reproduction. *Fertil Steril*. 94: 1949-1957
- Möhlig, M., Boeing, H., Spranger, J., Osterhoff, M., Kroke, A., Fisher, E., Bergmann, M.M., Ristow, M., Hoffmann, K., & Pfeiffer, A.F. 2004a. Body mass index and c-174g interleukin-6 promoter polymorphism interact in predicting type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 89: 1885-1890
- Möhlig, M., Spranger, J., Osterhoff, M., Ristow, M., Pfeiffer, A.F., Schill, T., Schlösser, H.W., Brabant, G., & Schöfl, C. 2004b. The polycystic ovary syndrome per se is not associated with increased chronic inflammation. *Eur J Endocrinol*. 150: 525-532
- Montague, C.T., Prins, J.B., Sanders, L., Digby, J.E., & O'Rahilly, S. 1997. Depot- and sex-specific differences in human leptin mRNA expression: Implications for the control of regional fat distribution. *Diabetes*. 46: 342-347
- Moshage, H.J., Roelofs, H.M., van Pelt, J.F., Hazenberg, B.P., van Leeuwen, M.A., Limburg, P.C., Aarden, L.A., & Yap, S.H. 1988. The effect of interleukin-1, interleukin-6 and its interrelationship on the synthesis of serum amyloid a and c-reactive protein in primary cultures of adult human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 155: 112-117
- Munir, I., Yen, H.W., Baruth, T., Tarkowski, R., Azziz, R., Magoffin, D.A., & Jakimiuk, A.J. 2005. Resistin stimulation of 17alpha-hydroxylase activity in ovarian theca cells in vitro: Relevance to polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 90: 4852-4857
- Murdolo, G., Hammarstedt, A., Sandqvist, M., Schmelz, M., Herder, C., Smith, U., & Jansson, P.A. 2007. Monocyte chemoattractant protein-1 in subcutaneous abdominal adipose tissue: Characterization of interstitial concentration and regulation of gene expression by insulin. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 92: 2688-2695
- Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., Yoshimura, K., Kadowaki, T., & Nagai, R. 2009. Cd8+ effector t cells

- contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med.* 15: 914-920
- O'Connor, A., Phelan, N., Tun, T.K., Boran, G., Gibney, J., & Roche, H.M. 2010. High-molecular-weight adiponectin is selectively reduced in women with polycystic ovary syndrome independent of body mass index and severity of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 95: 1378-1385
- Orio, F., Palomba, S., Cascella, T., Milan, G., Mioni, R., Pagano, C., Zullo, F., Colao, A., Lombardi, G., & Vettor, R. 2003. Adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 88: 2619-2623
- Padmanabhan, V., Veiga-Lopez, A., Abbott, D.H., Recabarren, S.E., & Herkimer, C. 2010. Developmental programming: Impact of prenatal testosterone excess and postnatal weight gain on insulin sensitivity index and transfer of traits to offspring of overweight females. *Endocrinology.* 151: 595-605
- Pasquali, R., Gambineri, A., & Pagotto, U. 2006. The impact of obesity on reproduction in women with polycystic ovary syndrome. *BJOG.* 113: 1148-1159
- Pedersen, B.K., & Febbraio, M.A. 2007. Point: Interleukin-6 does have a beneficial role in insulin sensitivity and glucose homeostasis. *J Appl Physiol* (1985). 102: 814-816
- Poulain-Godefroy, O., Lecoeur, C., Pattou, F., Frühbeck, G., & Froguel, P. 2008. Inflammation is associated with a decrease of lipogenic factors in omental fat in women. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 295: R1-7
- Puder, J.J., Varga, S., Kraenzlin, M., De Geyter, C., Keller, U., & Müller, B. 2005. Central fat excess in polycystic ovary syndrome: Relation to low-grade inflammation and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 90: 6014-6021
- Pusalkar, M., Meherji, P., Gokral, J., Savardekar, L., Chinnaraj, S., & Maitra, A. 2010. Obesity and polycystic ovary syndrome: Association with androgens, leptin and its genotypes. *Gynecol Endocrinol.* 26: 874-882
- Puurunen, J., Piltonen, T., Morin-Papunen, L., Perheentupa, A., Järvelä, I., Ruokonen, A., & Tapanainen, J.S. 2011. Unfavorable hormonal, metabolic, and inflammatory alterations persist after menopause in women with pcos. *J Clin Endocrinol Metab.* 96: 1827-1834
- Ramanand, S.J., Ramanand, J.B., Ghongane, B.B., Patwardhan, M.H., Patwardhan, V.M., Ghanghas, R., Halasawadekar, N.R., & Patil, P. 2014. Correlation between serum adiponectin and clinical



- characteristics, biochemical parameters in indian women with polycystic ovary syndrome. *Indian J Endocrinol Metab.* 18: 221-225
- Recabarren, S.E., Smith, R., Rios, R., Maliqueo, M., Echiburú, B., Codner, E., Cassorla, F., Rojas, P., & Sir-Petermann, T. 2008. Metabolic profile in sons of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 93: 1820-1826
- Remsburg, K.E., Talbott, E.O., Zborowski, J.V., Evans, R.W., & McHugh-Pemu, K. 2002. Evidence for competing effects of body mass, hyperinsulinemia, insulin resistance, and androgens on leptin levels among lean, overweight, and obese women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 78: 479-486
- Repaci, A., Gambineri, A., & Pasquali, R. 2011. The role of low-grade inflammation in the polycystic ovary syndrome. *Mol Cell Endocrinol.* 335: 30-41
- Rodriguez-Cuenca, S., Monjo, M., Proenza, A.M., & Roca, P. 2005. Depot differences in steroid receptor expression in adipose tissue: Possible role of the local steroid milieu. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 288: E200-207
- Roland, A.V., Nunemaker, C.S., Keller, S.R., & Moenter, S.M. 2010. Prenatal androgen exposure programs metabolic dysfunction in female mice. *J Endocrinol.* 207: 213-223
- Rosenbaum, D., Haber, R.S., & Dunaif, A. 1993. Insulin resistance in polycystic ovary syndrome: Decreased expression of glut-4 glucose transporters in adipocytes. *Am J Physiol.* 264: E197-202
- Rosenbaum, M., Pietrobelli, A., Vasselli, J.R., Heymsfield, S.B., & Leibel, R.L. 2001. Sexual dimorphism in circulating leptin concentrations is not accounted for by differences in adipose tissue distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 25: 1365-1371
- Ruan, H., & Lodish, H.F. 2003. Insulin resistance in adipose tissue: Direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14: 447-455
- Saad, M.F., Damani, S., Gingerich, R.L., Riad-Gabriel, M.G., Khan, A., Boyadjian, R., Jinagouda, S.D., el-Tawil, K., Rude, R.K., & Kamdar, V. 1997. Sexual dimorphism in plasma leptin concentration. *J Clin Endocrinol Metab.* 82: 579-584
- Samy, N., Hashim, M., Sayed, M., & Said, M. 2009. Clinical significance of inflammatory markers in polycystic ovary syndrome: Their relationship to insulin resistance and body mass index. *Dis Markers.* 26: 163-170
- Sartipy, P., & Loskutoff, D.J. 2003. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:

7265-7270

- Savastano, S., Valentino, R., Di Somma, C., Orio, F., Pivonello, C., Passaretti, F., Brancato, V., Formisano, P., Colao, A., Beguinot, F., & Tarantino, G. 2011. Serum 25-hydroxyvitamin d levels, phosphoprotein enriched in diabetes gene product (ped/pea-15) and leptin-to-adiponectin ratio in women with pcos. *Nutr Metab (Lond)*. 8: 84
- Schmittgen, T.D., & Livak, K.J. 2008. Analyzing real-time pcr data by the comparative c(t) method. *Nat Protoc*. 3: 1101-1108
- Seftel, A.D. 2005. Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes. *J Urol*. 174: 1045-1046
- Seow, K.M., Hwang, J.L., Wang, P.H., Ho, L.T., & Juan, C.C. 2011. Expression of visfatin mrna in peripheral blood mononuclear cells is not correlated with visfatin mrna in omental adipose tissue in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 26: 2869-2873
- Sepilian, V., & Nagamani, M. 2005. Adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome and severe insulin resistance. *J Soc Gynecol Investig*. 12: 129-134
- Siiteri, P.K. 1987. Adipose tissue as a source of hormones. *Am J Clin Nutr*. 45: 277-282
- Sikaris, K.A. 2004. The clinical biochemistry of obesity. *Clin Biochem Rev*. 25: 165-181
- Sir-Petermann, T., Maliqueo, M., Codner, E., Echiburú, B., Crisosto, N., Pérez, V., Pérez-Bravo, F., & Cassorla, F. 2007. Early metabolic derangements in daughters of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 92: 4637-4642
- Smas, C.M., & Sul, H.S. 1995. Control of adipocyte differentiation. *Biochem J*. 309 ( Pt 3): 697-710
- Sowers, M., Zheng, H., Tomey, K., Karvonen-Gutierrez, C., Jannausch, M., Li, X., Yosef, M., & Symons, J. 2007. Changes in body composition in women over six years at midlife: Ovarian and chronological aging. *J Clin Endocrinol Metab*. 92: 895-901
- Sprung, V.S., Jones, H., Pugh, C.J., Aziz, N.F., Daousi, C., Kemp, G.J., Green, D.J., Cable, N.T., & Cuthbertson, D.J. 2014. Endothelial dysfunction in hyperandrogenic polycystic ovary syndrome is not explained by either obesity or ectopic fat deposition. *Clin Sci (Lond)*. 126: 67-74
- Stefanović, A., Kotur-Stevuljević, J., Spasić, S., Bogavac-Stanojević, N., & Bujisić, N. 2008. The influence of obesity on the oxidative stress status and the concentration of leptin in type 2 diabetes

- mellitus patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 79: 156-163
- Stienstra, R., van Diepen, J.A., Tack, C.J., Zaki, M.H., van de Veerdonk, F.L., Perera, D., Neale, G.A., Hooiveld, G.J., Hijmans, A., Vroegrijk, I., van den Berg, S., Romijn, J., Rensen, P.C., Joosten, L.A., Netea, M.G., & Kanneganti, T.D. 2011. Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108: 15324-15329
- Svendsen, P.F., Christiansen, M., Hedley, P.L., Nilas, L., Pedersen, S.B., & Madsbad, S. 2012. Adipose expression of adipocytokines in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 98: 235-241
- Takahashi, K., Mizuarai, S., Araki, H., Mashiko, S., Ishihara, A., Kanatani, A., Itadani, H., & Kotani, H. 2003. Adiposity elevates plasma mcp-1 levels leading to the increased cd11b-positive monocytes in mice. *J Biol Chem.* 278: 46654-46660
- Tao, T., Li, S., Zhao, A., Zhang, Y., & Liu, W. 2012. Expression of the cd11c gene in subcutaneous adipose tissue is associated with cytokine level and insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol.* 167: 705-713
- Toulis, K.A., Goulis, D.G., Farmakiotis, D., Georgopoulos, N.A., Katsikis, I., Tarlatzis, B.C., Papadimas, I., & Panidis, D. 2009. Adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome: A systematic review and a meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 15: 297-307
- Vicennati, V., Gambineri, A., Calzoni, F., Casimirri, F., Macor, C., Vettor, R., & Pasquali, R. 1998. Serum leptin in obese women with polycystic ovary syndrome is correlated with body weight and fat distribution but not with androgen and insulin levels. *Metabolism.* 47: 988-992
- Villa, J., & Pratley, R.E. 2011. Adipose tissue dysfunction in polycystic ovary syndrome. *Curr Diab Rep.* 11: 179-184
- Visser, M., Bouter, L.M., McQuillan, G.M., Wener, M.H., & Harris, T.B. 1999. Elevated c-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA.* 282: 2131-2135
- Wahrenberg, H., Ek, I., Reynisdottir, S., Carlström, K., Bergqvist, A., & Arner, P. 1999. Divergent effects of weight reduction and oral contraception treatment on adrenergic lipolysis regulation in obese women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 84: 2182-2187
- Wajchenberg, B.L. 2000. Subcutaneous and visceral adipose tissue: Their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev.* 21: 697-738

- Wang, Q., Guo, T., Tao, Y., Song, Y., & Huang, W. 2011. Association between serum adipocyte factor level and insulin resistance in polycystic ovarian syndrome. *Gynecol Endocrinol.* 27: 931-934
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., & Ferrante, A.W. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 112: 1796-1808
- Wellen, K.E., & Hotamisligil, G.S. 2003. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest.* 112: 1785-1788
- Weyer, C., Funahashi, T., Tanaka, S., Hotta, K., Matsuzawa, Y., Pratley, R.E., & Tataranni, P.A. 2001. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: Close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 86: 1930-1935
- WHO. 1995. Physical status: The use and interpretation of anthropometry. Report of a who expert committee. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 854: 1-452
- Wickham, E.P., Cheang, K.I., Clore, J.N., Baillargeon, J.P., & Nestler, J.E. 2011. Total and high-molecular weight adiponectin in women with the polycystic ovary syndrome. *Metabolism.* 60: 366-372
- Wild, R.A., Rizzo, M., Clifton, S., & Carmina, E. 2011. Lipid levels in polycystic ovary syndrome: Systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 95: 1073-1079.e1071-1011
- Xiong, Y.L., Liang, X.Y., Yang, X., Li, Y., & Wei, L.N. 2011. Low-grade chronic inflammation in the peripheral blood and ovaries of women with polycystic ovarian syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 159: 148-150
- Xita, N., Papassotiropou, I., Georgiou, I., Vounatsou, M., Margeli, A., & Tsatsoulis, A. 2007. The adiponectin-to-leptin ratio in women with polycystic ovary syndrome: Relation to insulin resistance and proinflammatory markers. *Metabolism.* 56: 766-771
- Xu, A., Chan, K.W., Hoo, R.L., Wang, Y., Tan, K.C., Zhang, J., Chen, B., Lam, M.C., Tse, C., Cooper, G.J., & Lam, K.S. 2005. Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes. *J Biol Chem.* 280: 18073-18080
- Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., Murakami, K., Ohteki, T., Uchida, S., Takekawa, S., Waki, H., Tsuno, N.H., Shibata, Y., Terauchi, Y., Froguel, P., Tobe, K., Koyasu, S., Taira, K., Kitamura, T., Shimizu, T., Nagai, R., & Kadowaki, T. 2003. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature.* 423: 762-769

- Yamauchi, T., Nio, Y., Maki, T., Kobayashi, M., Takazawa, T., Iwabu, M., Okada-Iwabu, M., Kawamoto, S., Kubota, N., Kubota, T., Ito, Y., Kamon, J., Tsuchida, A., Kumagai, K., Kozono, H., Hada, Y., Ogata, H., Tokuyama, K., Tsunoda, M., Ide, T., Murakami, K., Awazawa, M., Takamoto, I., Froguel, P., Hara, K., Tobe, K., Nagai, R., Ueki, K., & Kadowaki, T. 2007. Targeted disruption of adipor1 and adipor2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med.* 13: 332-339
- Yildirim, B., Sabir, N., & Kaleli, B. 2003. Relation of intra-abdominal fat distribution to metabolic disorders in nonobese patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 79: 1358-1364
- Yilmaz, M., Bukan, N., Demirci, H., Oztürk, C., Kan, E., Ayvaz, G., & Arslan, M. 2009. Serum resistin and adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol.* 25: 246-252
- Yoshimura, T., Yuhki, N., Moore, S.K., Appella, E., Lerman, M.I., & Leonard, E.J. 1989. Human monocyte chemoattractant protein-1 (mcp-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene je. *FEBS Lett.* 244: 487-493
- Zawadzki, J.K., & Dunaif, A. (1992). Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: Towards a rational approach. In G. J. Dunaif A, Haseltine FP, Merriam GR (Ed.), *Polycystic ovary syndrome* (pp. 59-69). Oxford, UK: Blackwell.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J.M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 372: 425-432
- Zimmet, P., Magliano, D., Matsuzawa, Y., Alberti, G., & Shaw, J. 2005. The metabolic syndrome: A global public health problem and a new definition. *J Atheroscler Thromb.* 12: 295-300