



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Efecto del hiperandrogenismo prenatal sobre la funcionalidad uterina.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en
el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Lic. Silvana Rocío Ferreira

Directores de Tesis: Dra. Alicia B. Motta
Dr. Carlos M. Telleria

Consejero de Estudios: Dr. Matias Pandolfi

Lugar de trabajo: Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO),
Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, 2019.

Efecto del hiperandrogenismo prenatal sobre la funcionalidad uterina

Resumen

El Síndrome del Ovario Poliquístico (SOP) es una patología reproductiva de alta incidencia en mujeres en edad fértil. La etiología del SOP se desconoce, pero actualmente se postula que un exceso androgénico intrauterino genera programación fetal. El SOP es una de las principales causas de infertilidad. Esto puede atribuirse no solo a disfunción ovárica ya que aun restableciendo la función ovulatoria o mediante técnicas de reproducción asistida, existe una alta tasa de aborto espontaneo lo que sugiere un problema de receptividad uterina.

En este trabajo, nos propusimos estudiar los efectos de la hiperandrogenización prenatal (PH) sobre el tejido uterino en un modelo murino de programación fetal por exceso androgénico, el cual nos permite emular características de tipo SOP en ratas adultas.

Nuestros resultados revelan que la PH conlleva a la expresión de dos fenotipos: ovulatorio irregular y anovulatorio, los cuales presentan hiperandrogenismo, quistes ováricos y alteraciones hormonales y metabólicas. En el útero, las vías de señalización responsables de la homeostasis celular se encontraron alteradas. Como consecuencia, se han observado cambios en la histomorfología uterina que se evidencian por un aumento del grosor uterino, displasia del epitelio luminal e hiperplasia glandular que se asocian con la presencia de un estado pro-oxidante y un estado pro-inflamatorio elevado.

En conclusión, estos resultados revelan que la PH programa a largo plazo las vías de señalización responsables de la proliferación, supervivencia y muerte celular, generando una desregulación homeostática que se traduce en cambios en la histomorfología del útero lo que condicionaría su funcionalidad.

Palabras clave: programación fetal; síndrome de ovario poliquístico; útero; endometrio; proliferación; apoptosis.

Effect of prenatal hyperandrogenization on the uterine function

Abstract

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common endocrine-reproductive disorder that affects women during their reproductive years. The etiology of PCOS is unclear but current theories postulate that an excess of androgens in the intrauterine environment leads to fetal programming. PCOS is a leading cause of female infertility. PCOS women have high rates of pregnancy loss even if the ovulation has been restored, or by using assisted reproduction techniques, suggesting a problem in the uterine receptivity.

In the present work, we aimed to study the effect of prenatal hyperandrogenization (PH) on the uterine tissue in a murine model of fetal programming caused by androgen excess, which let us recreate PCOS features in adult rats.

Our results show that PH led to two phenotypes according to the estrous cycle: irregular ovulatory and anovulatory, accompanied by hyperandrogenism, ovarian cysts, and hormonal and metabolic alterations. In the uterine tissue, signaling pathways that maintain homeostasis were found altered. As a consequence, changes in the histomorphology have been observed and are evidenced through the increased uterine thickness, luminal epithelial dysplasia, and glandular hyperplasia. Moreover, a pro-oxidant and pro-inflammatory status was found.

In conclusion, these results revealed that PH programs several signaling pathways responsible for proliferation, survival, and cell death, leading to homeostatic deregulation evidenced by altered histomorphology, which could likely condition its functioning.

Keywords: fetal programming; polycystic ovary syndrome; uterus; endometrium; proliferation; apoptosis.

Agradecimientos

Durante el transcurso del doctorado fueron numerosas las vivencias que atravesé y que me hicieron madurar y aprender, no solo a nivel académico sino en lo personal. En este proceso me acompañaron muchas personas, seguro olvide algunas, por lo tanto, quiero agradecerles a todos aquellos que se cruzaron en mi camino en esta etapa de mi vida.

En primer lugar, quiero darle las gracias a Alicia, que me abrió las puertas de su laboratorio cuando era joven y no entendía nada de la ciencia. Gracias por darme la posibilidad de hacer un doctorado en tu laboratorio, por dejarme crecer, por acompañarme en los momentos difíciles, por escucharme y recibirme para hablar no solo de resultados, sino también de la vida misma.

También quiero agradecerle y mucho a Carlos y Alicia, quienes me recibieron en su laboratorio muy amorosamente y me ayudaron a concretar un montón de cosas del proyecto. A Carlos, gracias por tu mirada crítica y detallista que me ayudo a armar la historia con los resultados. A Alicia, gracias por todas lo que me enseñaste de mesada, por las discusiones de resultados y luchas experimentales, a través de las cuales me transmitiste tu pasión por la ciencia.

Gracias a mis compas, a los que están hoy y a los que recuerdo siempre. Por el tiempo compartido ya sea de trabajo o de after's lab. A Lean (tajai?), que siempre tuvo una paciencia infinita. A Flor, que me enseñó muchas cosas de manejo de las ratas, pero además me traía la calma con abrazos fuertes y ricos mates. A Gise, por aunar fuerzas para hacer trabajos en equipo. A Majo por hacerme reír siempre. Aunque fue menos el tiempo compartido con ellas, gracias a Aimé y Marie por su buena onda.

Gracias a la Universidad McGill, y la gente del Dpto. de Patología, que me recibió y me despidió varias veces y me hizo sentir local. De igual manera, gracias a mis compañeros durante mis estadias en Canadá: Subeha, Sabrina, Michael, Robert y Sarah, por su buena onda y ayuda cada vez que lo necesité.

Gracias a mis amigas que me bancan siempre y que, aunque las veo poco, el tiempo parece no pasar cada vez que nos juntamos. Gracias por acompañarme siempre, por multiplicar alegrías y dividir tristezas. Por ser fieles amigas.

A mi mamá, eternamente gracias por ayudarme con absolutamente todo. Sino fuera por vos, esta tesis no hubiese sido posible. Gracias por ser la mejor madre, aprendo de vos cada día, admiro tu resiliencia. A mi papá, a quien extraño horrores y no pasa un día en que no me haga falta. Gracias por inculcarme la importancia de estudiar y por sobre todo de hacer lo que me gusta, esa felicidad que nadie te quita. A Maru, mi hermana que me malcría siempre y que está al pie del cañón 24/7 para escucharme y aconsejarme y su dupla, Diego siempre bancándome en todas.

A todo el resto de la familia gracias por estar pendiente, por aguantar mis ausencias y apoyarme en todo lo que hago.

A Tico, por su amor, su paciencia y su buen humor. Jamás imaginé que el amor vendría por correo a tocarme la puerta. Gracias por aguantarme con los patos volados, por enseñarme a mirar un poco más allá, por sacarme una sonrisa, por su escucha atenta, su confianza en mí y su fe. A Elías, porque supo ganar mi corazón (aunque me hizo renegar también) y ser mi compinche.

A mi comunidad, con quien comparto la fe y mis búsquedas más hondas, por siempre recibirme con amor y acompañarme en todo tiempo.

Gracias al CEFyBO y su gente, por su buena onda y predisposición siempre. A la gente del piso 17, gracias por los días compartidos...almuerzos, risas, tortas y quejas, gracias por hacer más amenos y divertidos los días en el instituto.

A la FCEyN – UBA, que me permitió seguir formándome durante este doctorado. Por darme educación gratuita y de calidad, además de haberme regalado un montón de personas que hoy resultan indispensables en mis días.

El presente trabajo de tesis doctoral ha sido posible gracias al soporte financiero dado por:

Becas

- La Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) para la realización de la beca inicial de doctorado.
- El Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) quien ha otorgado una beca de finalización de doctorado.
- El Gobierno de Canadá, a través de la beca "*Emerging Leaders in the Americas Program*"

Proyectos

- Los subsidios otorgados por el CONICET y ANPCyT, han permitido la realización de esta tesis doctoral.

Esta tesis de doctorado fue realizada en:

- Laboratorio de Fisiopatología Ovárica, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, Universidad de Buenos Aires, CONICET.
- Ovarian Cancer Research Laboratory, Experimental Pathology Unit, Department of Pathology, Faculty of Medicine, McGill University.

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

- Prenatally androgenized female rats develop uterine hyperplasia when adult.
Molecular and Cellular Endocrinology. **2019** Oct. 10.1016/j.mce.2019.110610
Silvana R. Ferreira, Alicia A. Goyeneche, María F. Heber, Giselle A. Abruzzese,
Carlos M. Telleria, Alicia B. Motta.

Contenidos

Abreviaturas	1
I. Introducción	4
Síndrome de Ovario Poliquístico	5
Etiología.....	7
SOP, infertilidad, hiperplasia y cáncer endometrial.....	8
Programación del desarrollo	10
Exceso androgénico.....	12
Modelos animales para el estudio de SOP.....	13
Roedores: modelo de exceso androgénico prenatal para el estudio de SOP	15
El útero	17
El endometrio.....	18
Hormonas ováricas y su influencia en el ciclo endometrial	19
Receptores hormonales	21
<i>Receptores de estrógenos en el endometrio</i>	22
<i>Receptores de progesterona en el endometrio</i>	22
<i>Receptores de andrógenos en el endometrio</i>	23
Endometrio y exceso androgénico.....	24
Homeostasis endometrial	25
Proliferación	25
Apoptosis.....	28
Receptores activados por proliferadores peroxisomales	31
Estructura y mecanismos de regulación de los PPARs.....	32
PPARs y su función en el útero.....	33
PPAR gama, estrés oxidativo e inflamación	34
II. Hipótesis y objetivos	36
Hipótesis.....	37
Objetivo general.....	37
Objetivos específicos.....	37
III. Materiales y métodos	38
Modelo experimental animal.....	39
Seguimiento animal y determinaciones experimentales.....	40
Estudio del ciclo estral.....	41
Determinación fenotípica.....	42

Obtención de tejidos	43
Estudios histológicos y morfométricos	43
Morfología del tejido por técnica de Hematoxilina-Eosina.....	43
Inmunohistoquímica	44
Evaluación semicuantitativa por HScore.....	45
Determinación de niveles proteicos	45
Determinaciones séricas	48
Evaluación del balance oxidante/antioxidante	52
Método colorimétrico de detección de la apoptosis (TUNEL)	54
Estudios de apareo, fertilidad y capacidad materna.....	55
Análisis estadístico	56
IV. Resultados.....	57
Capítulo 1: Caracterización del modelo murino de hiperandrogenización prenatal	58
Resultados	59
<i>Evaluación de camadas</i>	59
<i>Curva de crecimiento</i>	60
<i>Estado metabólico</i>	62
<i>Estado hormonal sistémico</i>	63
Discusión	64
Resumen visual del capítulo 1.....	68
Capítulo 2: Caracterización morfológica del tejido uterino	69
Resultados	70
<i>Análisis histomorfológico</i>	70
<i>Expresión de receptores hormonales</i>	73
<i>Expresión de aromatasa</i>	75
Discusión	76
Resumen visual del capítulo 2.....	80
Capítulo 3: Estudio de la homeostasis del tejido uterino	81
Resultados	82
<i>Expresión de p27</i>	82
<i>Expresión proteica de reguladores del ciclo celular</i>	83
<i>Inmunolocalización del marcador de proliferación PCNA</i>	85
<i>Inmunolocalización del marcador mitótico fosfo-histona-H3</i>	86
<i>Estudio de la expresión proteica de Akt y ERK</i>	87
<i>Estado apoptótico</i>	87
<i>Estado apoptótico: Estudio de la fragmentación del DNA por TUNEL</i>	90

Discusión	90
Resumen visual del capítulo 3.....	94
Capítulo 4: Balance oxidativo, estado pro-inflamatorio y niveles de PPARg	95
Resultados	96
<i>Expresión de PPARg</i>	96
<i>Estado proinflamatorio</i>	97
<i>Balance oxidativo</i>	101
Discusión	103
Resumen visual del capítulo 4.....	107
Capítulo 5: Estudios de fertilidad	108
Resultados	109
<i>Peso y glucosa</i>	109
<i>Capacidad reproductiva</i>	110
<i>Capacidad materna y evaluación de camadas nacidas</i>	110
Discusión	112
V. Conclusiones	114
VI. Referencias	117

Abreviaturas

3TC: 3 tipos celulares

Akt: alfa serina/treonina proteína

AR: receptor de andrógenos

ARN: ácido ribo nucleico

COX: ciclooxigenasa

Ct: ciclo umbral

CuSOD: Cobre Super óxido dismutasa

D.E: desviación estándar

DAB: diaminobencidina

DBD: dominio de unión a DNA

DHEA: dihidroepiandrosterona

DHT: dihidrotestosterona

DNA: ácido desoxiribonucleico

DNTP: desoxitibonucleotidos

E₂: estradiol

ECL: enhanced chemiluminescence

ERK: quinasa regulada por señales extracelulares

FSH: hormona folículo estimulante

Gl: glándulas endometriales

GR: glutatión reductasa

GSH: glutatión

GSSG: glutatión oxidado

HOMA-IR: índice homeostático de insulino resistencia

HRP: horseradish peroxidase

IHC: inmunohistoquímica

IL: interleuquinas

IR: insulino resistencia

LH: hormona luteinizante

Lu: Lumen epitelial

MAPK: proteína quinasa mitogénica activada

MDA: malondialdehído

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NCoR: co-represor de receptores nucleares

NFKB: factor nuclear kappa B

NHS: Suero normal de caballo

ON: overnight (toda la noche)

P₄: progesterona

PBS: buffer fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PG: prostaglandinas

PH: grupo hiperandrogenizado prenatalmente

PPAR_γ: receptor activado por proliferadores peroxisomales gama

PPARs: receptores activados por proliferadores peroxisomales

PPRE: secuencia de respuesta a los PPARs

RA: receptor de andrógeno

REa: receptor de estrógeno alfa

REb: receptor de estrógeno beta

RPA: receptor de progesterona A

PRB: receptor de progesterona B

RIA: radioinmunoensayo

ROS: especies reactivas de oxígeno

RPL32: proteína ribosomal L32

SHBG: proteína ligante de esteroides sexuales

SOP: Síndrome de ovario poliquístico

Str: estroma

T: testosterona

TBA: ácido tiobarbitúrico

TBARs: especies reactivas de TBA

TCA: ácido tricloroacético

TNB: 5-tio-2 nitro benzoato

TNF alfa: factor de necrosis tumoral alfa

WB: western blot

I. Introducción

Introducción

Síndrome de Ovario Poliquístico

El Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP) es una de las endocrinopatías más frecuentes que afecta entre un 5 y 20% a mujeres en edad reproductiva, según el criterio utilizado para su diagnóstico y a la población estudiada, reflejando el efecto de factores étnicos y ambientales sobre la expresión fenotípica de la patología (Sirmans y Pate, 2013).

El SOP es una patología heterogénea y multifactorial, dado que se encuentra asociada a numerosos desórdenes endocrino-metabólicos y de la salud en general, entre los que cabe destacar: insulino resistencia (IR), diabetes, obesidad y síndrome metabólico (Franks, 1995; Asunción et al., 2000; Abbott et al., 2002; Jeanes y Reeves, 2017a). Además, esta patología se encuentra frecuentemente relacionada con infertilidad y aborto recurrente (Palomba et al., 2015; Bahri Khomami et al., 2019). Más aún, la presencia de SOP incrementa el riesgo a contraer otras enfermedades como lo son: la enfermedad cardiovascular, el cáncer de ovario e hiperplasia y cáncer endometrial (Scicchitano et al., 2012; Dumesic y Lobo, 2013).

Dada la complejidad de la patología se han realizado numerosos consensos con el objetivo de aunar criterios diagnósticos. Por lo tanto, a lo largo de los años se fueron realizando conferencias, con el objetivo de actualizar y acordar el mejor criterio diagnóstico y tratamiento para el SOP.

El primer intento por consolidar una definición clínica de SOP, fue en 1990. Este consenso fue realizado por expertos del *National Institute of Child Health and Human Disease* (NICHD) de los EE. UU. que dio lugar a una publicación en la que se conoció el criterio diagnóstico para el SOP (Zawadzki, JK y Dunaif, 1992), los cuales considerados en orden de importancia (Azziz, 2005) fueron: 1) exceso de andrógenos, junto con 2) oligo o anovulación, en ausencia de otras enfermedades que cursan con exceso de andrógenos (hiperplasia suprarrenal congénita, hiperprolactinemia, síndrome de Cushing y disfunción tiroidea).

El segundo consenso realizado en Rotterdam en 2003 y organizado por la *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) y la *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM) (Anón, 2004) determinó que el síndrome debe ser diagnosticado, después de la exclusión de otras enfermedades relacionadas y frente a

la presencia de dos de los siguientes tres características: 1) oligo o anovulación, 2) signos clínicos y/o bioquímicos de hiperandrogenismo y 3) ovarios poliquísticos por ecografía. Debido a las controversias que se generaron a partir del criterio de Rotterdam dado que contempla como criterio la presencia de ovarios poliquísticos y con el objetivo de conciliar entre las opiniones y posiciones al respecto, la Sociedad de Exceso de Andrógenos (AES) luego de otra conferencia en el año 2006, publicó la última definición de SOP (Azziz, 2006; Azziz et al., 2006) que determina que los criterios para el diagnóstico son los siguientes: 1) hiperandrogenismo: hirsutismo y/o hiperandrogenemia, 2) disfunción ovárica: oligo o anovulación y/o ovarios poliquísticos por ecografía y 3) exclusión de otros desórdenes de andrógenos o enfermedades relacionadas.

Si bien estos criterios continúan en debate, y resultan ser motivo de controversia entre la comunidad científica, uno de los más utilizados por ser el más inclusivo, es el criterio de Rotterdam (2003), quien amplía la expresión fenotípica del síndrome y redefine al SOP como un síndrome de disfunción ovárica (es decir, uno que ocurre en presencia de anovulación y / o dismorfología ovárica) (Azziz, 2005; Lujan et al., 2008). Este criterio y por combinación de sus características nos permite enmarcar la patología dentro de 4 fenotipos.

El fenotipo 1 es la combinación clásica de todas las características endocrinas y reproductivas del síndrome, es decir, presencia de hiperandrogenismo, oligo o anovulación y ovarios poliquísticos. El fenotipo 2 es la combinación de hiperandrogenismo y oligo o anovulación. El fenotipo 3 es la combinación de hiperandrogenismo y ovarios poliquísticos, en ausencia de oligo o anovulación (SOP ovulatorio). El fenotipo 4 es la combinación de oligo o anovulación y ovarios poliquísticos (SOP normoandrogénico). Este último fenotipo, queda contemplado sólo bajo el diagnóstico por el criterio de Rotterdam (2003), ya que los otros consensos exigen la presencia de hiperandrogenismo para el diagnóstico de SOP (Fig. 1.1). Si bien la insulino resistencia y la obesidad se encuentran comúnmente en SOP, no se reconocen como criterios de diagnóstico. Del mismo modo, las alteraciones en la secreción de gonadotropinas no están incluidas en ninguna de las definiciones del síndrome (Rosenfield y Ehrmann, 2016).

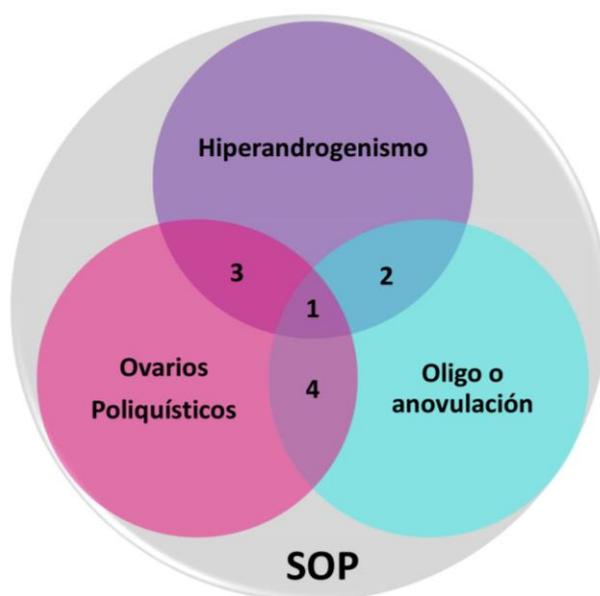


Figura 1.1: Características de SOP y fenotipos asociados según el criterio de Rotterdam (2003).

Etiología

Dentro de los factores que pueden contribuir mayormente a la etiología del SOP se encuentran: la genética, la epigenética y el ambiente.

Los factores genéticos y ambientales interactúan y juegan un papel fundamental en las alteraciones presentes que posee SOP (Vink et al., 2006). El estilo de vida, la nutrición y la contaminación ambiental aún más contribuyen al desarrollo y severidad de la patología.

El SOP es considerado una patología familiar y en la mayoría de los casos las vías genético-moleculares han sido implicadas en las alteraciones tanto metabólicas como bioquímicas que se encuentran asociadas al SOP (Escobar-Morreale et al., 2005; Urbanek, 2007). Sin embargo, resulta complicado precisar los genes responsables de la patología. El advenimiento de los estudios de asociación de genoma completo (GWAS por sus siglas en inglés: *Genome Wide Association Study*) ha permitido identificar 15 loci con susceptibilidad genética para SOP, pero estos y otros aún no se han confirmado (Chen et al., 2011; Shi et al., 2012; Louwers et al., 2013). Dichos genes sólo explican parte de la heredabilidad del síndrome, lo que ha llevado a destacar la importancia de los roles del ambiente y de la contribución epigenética al desarrollo de SOP. Existen discrepancias en el trabajo publicado sobre el análisis genético de SOP causado principalmente por diferentes criterios utilizados para definir al SOP.

Otro posible factor que se ha considerado para el SOP, es el fenómeno epigenético que involucra la hiper exposición del feto a un exceso de andrógenos intrauterino, dado por programación fetal (Abbott et al., 2002). También se ha sugerido que el acortamiento de los telómeros es otro mecanismo asociado con la patogénesis del PCOS y sus comorbilidades (Li et al., 2014). Por último, otros autores, han sugerido la metilación del DNA como la alteración epigenética y la explicación de la programación del desarrollo de SOP (Li y Huang, 2008; Xu et al., 2012).

En resumen, la combinación de todos estos factores contribuye a la manifestación del SOP en sus diversos fenotipos y, a la aparición de las patologías asociadas al mismo (infertilidad, obesidad, diabetes, enfermedad cardiovascular, etc.).

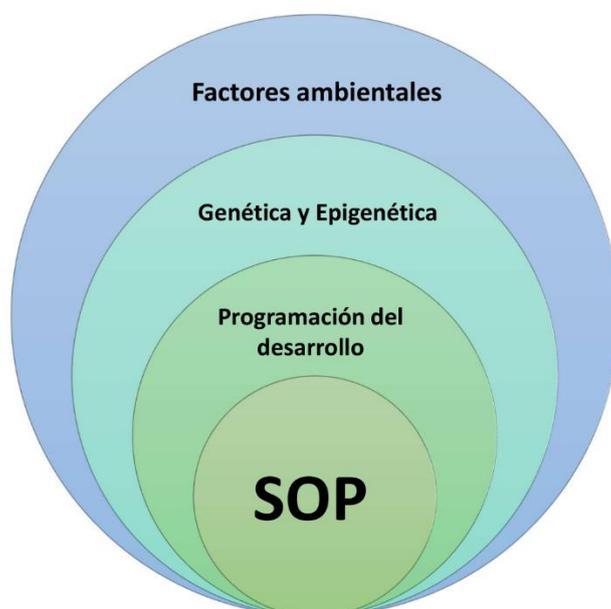


Figura 1.2: Factores que contribuyen al desarrollo del SOP.

SOP, infertilidad, hiperplasia y cáncer endometrial

Desde el punto de vista reproductivo, el SOP es una de las principales causas de subfertilidad e infertilidad femenina, que según se ha reportado padecen entre un 70 a 80% de las mujeres con el síndrome (Melo et al., 2015). Entre las manifestaciones reproductivas y obstétricas se incluyen además complicaciones del embarazo, abortos espontáneos, hipertensión (pre-eclampsia) y diabetes gestacional (Boomsma et al., 2006; Usadi y Legro, 2012). Las mujeres con SOP presentan un alto número de folículos arrestados en estadios tempranos y medios del desarrollo, esto se debe a que se

producen fallas en el proceso de maduración folicular, lo que impide su correcta progresión por el mismo (Erickson et al., 1992; Mason et al., 1994; Das et al., 2008). Al ocurrir esto, no se produce la selección de un folículo dominante y, por lo tanto, no existe folículo capaz de liberar al oocito en respuesta al aumento de hormona luteinizante (LH). Por ende, no se produce la ovulación ni el proceso normal de retroalimentación negativa necesario para inhibir la secreción de LH. Bajo el estímulo trófico de las gonadotropinas, los folículos arrestados continúan secretando hormonas, que se acumulan en el antro y devienen en la formación de quistes (Franks et al., 2008). Dadas estas alteraciones en el desarrollo folicular y debido a los desórdenes hormonales presentes (principalmente al hiperandrogenismo), un gran porcentaje de estas pacientes poseen problemas para concebir un embarazo, por lo que requieren de tratamientos de reproducción asistida (Balén et al., 2016). Según se ha reportado, las mujeres con SOP constituyen alrededor de un 90% de las consultantes en clínicas de reproducción asistidas por infertilidad asociada a anovulación (Kjøtrød et al., 2011). En general, se utilizan terapias hormonales para dichos casos, a los que responden correctamente, sin embargo, bien se logra el reclutamiento de oocitos, estos suelen ser de mala calidad o presentan alteraciones en los oocitos reclutados (Wood et al., 2007), embriones formados, como también fallas posteriores que pueden ser de implantación o en el mantenimiento del embarazo (Urman et al., 1992; Cano et al., 1997; Balén y Rutherford, 2007; Liu et al., 2019b).

Por otra parte, un estudio en mujeres con SOP, ha indicado que un 35.7% de estas, presentaba hiperplasia endometrial. De ellas, 60% fueron clasificadas como hiperplasia simple, 15% como hiperplasia compleja y 25% como hiperplasia y atipia citológica (Cheung, 2001). La hiperplasia endometrial es un desorden ginecológico frecuente, caracterizado por un aumento en el número de células epiteliales y que se puede clasificar histológicamente en hiperplasia simple o compleja con o sin atipia (Buckley y Fox, 1989). Si bien la naturaleza multifactorial del SOP y su heterogeneidad hace difícil conocer qué factores (obesidad, hiperinsulinemia, concentraciones alteradas de factores de crecimiento, predisposición genética), son causa de riesgo para el desarrollo de hiperplasia endometrial, en general éste es debido a que los endometrios de estas pacientes están sometidos a estimulación estrogénica no compensada por progesterona. Además, la hiperinsulinemia característica de un gran porcentaje de

pacientes con SOP (50 - 60%), puede contribuir al desarrollo de neoplasia endometrial, debido a la actividad mitogénica de la insulina mediada a través de sus receptores.

En los últimos años se le ha dado especial importancia a la asociación entre ciertas características del SOP que son factores de riesgo para cáncer endometrial y se ha sugerido la necesidad de evaluación del endometrio de pacientes con SOP por biopsia si el grosor endometrial es mayor de 4 mm, dado el riesgo significativo de desarrollar hiperplasia y/o cáncer endometrial (Ehrmann, 2005; Giudice, 2006). Más aún, Pillay y colaboradores han demostrado recientemente que existe una asociación entre SOP y cáncer endometrial en mujeres pre-menopáusicas (Pillay et al., 2006).

En consecuencia, dado que en mujeres con trastornos endocrinos como es el SOP, la función y supervivencia de las células endometriales están afectadas pudiendo inducir infertilidad, hiperplasia y cáncer endometrial, es necesario comprender como se ven modificados los mecanismos involucrados en la viabilidad celular endometrial debido a un entorno hormonal alterado; la función endometrial, es fundamental para entender esta patología y su abordaje desde un punto de vista diagnóstico y terapéutico.

Programación del desarrollo

El término “Programación fetal o *in utero*” se refiere a las adaptaciones fisiológicas o metabólicas que adquiere el feto en respuesta a un microambiente adverso, dado por ciertos estímulos o agresiones. Estos pueden ser de origen endógeno (señalización hormonal) o exógeno (medio ambiente), ya sea por un aporte pobre o por un abastecimiento exagerado de los mismos, los cuales suceden en una etapa crítica del desarrollo estructural o funcional de ciertos órganos, e influyen de manera permanente en las condiciones en las que el individuo se desarrollará en la vida extrauterina. Por lo tanto, cualquier estímulo o insulto que suceda en un período crítico de desarrollo embrionario y fetal puede dar lugar a adaptaciones del desarrollo que producen cambios estructurales, fisiológicos y metabólicos permanentes, lo que predispone a un individuo a enfermedades cardiovasculares, metabólicas y endocrinas en la vida adulta (Barker et al., 2002; Kwon y Kim, 2017).

Este concepto surge a partir de la teoría de Barker, quien comenzó a estudiar a personas con bajo peso al nacer y consideró a esto como una variable “insignia”, para demostrar la correlación entre un ambiente intrauterino adverso y la posibilidad de la futura

instauración de una enfermedad cardiovascular (Barker, 1995). Barker a través de los estudios en malnutrición materna, fue quien propuso que las adaptaciones fetales son la causa de cambios permanentes en la estructura y desarrollo de enfermedades en la vida adulta (Barker, 1997).

El desarrollo es un proceso plástico (fenómeno que permite a un organismo que se está desarrollando, cambiar su estructura y funciones en respuesta a efectos ambientales) que es sensible a las perturbaciones ambientales, incluida la nutrición, el estrés, las drogas y los contaminantes ambientales. La plasticidad del desarrollo permitió explicar en parte porque las alteraciones durante la vida intrauterina se traducen en cambios en la vida extrauterina o adulta, lo cual puede deberse a cambios epigenéticos, adaptaciones fisiológicas o cambios estables en la expresión de los genes (Gluckman et al., 2011; Barouki et al., 2012) (Figura 1.3).

De hecho, se ha demostrado que durante la etapa de desarrollo post-natal las influencias ambientales afectan la etiología y la susceptibilidad a las enfermedades no transmisibles y a las disfunciones que constituyen los principales problemas de salud pública en todo el mundo, que incluyen obesidad, diabetes, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, asma y alergias, inmunes y enfermedades autoinmunes, enfermedades / disfunciones del neurodesarrollo y neurodegenerativas, infertilidad, cánceres, depresión y trastornos psiquiátricos (Hanson y Gluckman, 2015).

Por lo tanto, hoy en día se utiliza el término “Origen del desarrollo de la salud y enfermedad” (DOHaD, por sus siglas en inglés: *Developmental Origins of Health and Disease*) el cual incluye de manera integral una serie de factores ambientales y su relevancia a la aparición de enfermedades no solo a lo largo de la vida sino potencialmente a través de varias generaciones (Barker, 2004; Heindel et al., 2015). En la actualidad, existen numerosos modelos animales que estudian patologías multifactoriales y complejas como la obesidad, la enfermedad cardiovascular, la diabetes, el SOP, y los desórdenes neuronales (Gluckman et al., 2010; Ho et al., 2017).

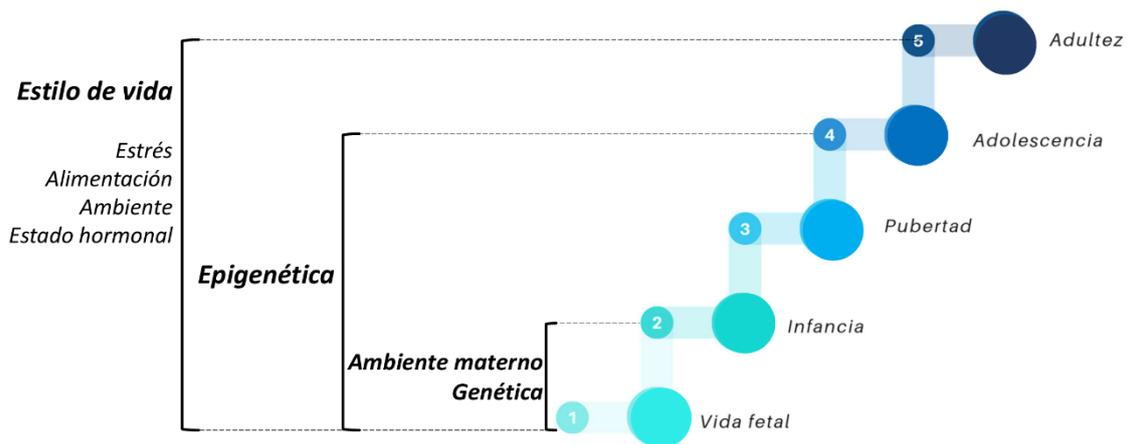


Figura 1.3: Etapas y factores que predisponen la programación del desarrollo.

Exceso androgénico

Los andrógenos se sintetizan tanto en el ovario como en las glándulas suprarrenales en las mujeres y juegan un rol importante en la regulación de la fertilidad femenina. Estos se encuentran involucrados en la etiología de patologías como el SOP, la endometriosis y el cáncer de endometrio, pudiendo también afectar a otros órganos importantes como lo son: hígado, riñones, hueso y músculo (Hakim et al., 2017). La testosterona (T), ejerce sus acciones principalmente a través del receptor de andrógenos (RA), pero también puede inducir efectos biológicos a través de sus principales metabolitos activos: la dihidrotestosterona (DHT) y el estradiol (E₂).

Los andrógenos no solo desempeñan importantes funciones durante la vida prenatal sino también en el período postparto temprano, siendo fundamentales para el desarrollo cerebral y la diferenciación sexual (Abruzzese et al., 2018, 2019). Según se ha reportado, la T es importante para el desarrollo del cerebro de mamíferos (Hines, 2006). Si bien en hembras el nivel de T durante la vida fetal es mayor que en adultas, los fetos machos presentan un mayor nivel de T que las hembras durante el desarrollo temprano (Foeking et al., 2008). Ambos sexos expresan el RA, pero durante el desarrollo se produce una ausencia de andrógenos en hembras que conduce a la formación y desarrollo de características genitales femeninas (Hiort, 2013).

Un estudio realizado por Hart y col. proporciona evidencia de que el entorno uterino podría "programar" los ovarios en el ser humano en una etapa muy temprana (Hart et al., 2010). De hecho, podría haber una "ventana crítica" de susceptibilidad durante la

diferenciación de órganos y sistemas que podrían estar relacionados con la patogénesis del SOP, como se observa en estudios animales (Birch et al., 2003). Por ejemplo, la exposición temprana a los andrógenos, prenatalmente, crea hembras virilizadas fenotípicamente en ovejas (Steckler et al., 2007) mientras que la exposición posterior crea fenotipos de SOP con ovulación irregular y tasas de fertilidad más bajas en comparación con los controles (Wood y Foster, 1998). Cabe resaltar, que en un modelo de exceso androgénico prenatal en ratas se ha demostrado que no solo la “ventana” de exposición es importante, sino también que dependiendo de la dosis del andrógeno se observan diferentes alteraciones endocrino-metabólicas fenotipo dependientes (Amalfi et al., 2012).

Cabe destacar que si bien los andrógenos, y otras hormonas, pueden actuar directamente por vía genómica, también pueden hacerlo indirectamente, modificando el desarrollo placentario, el metabolismo fetal y la producción de factores de crecimiento y de otras hormonas por la unidad feto-placentaria (Fowden, 2003; Fowden y Forhead, 2004).

Por último, la teoría del desarrollo que se planteó en un trabajo en monas preñadas a las que se le inyectó T en dos etapas durante la gestación (Abbott et al., 2005), permitió demostrar que la progenie desde pubertad en adelante presentaba ovarios poliquísticos y altas concentraciones séricas de LH e IR. Más aún, otros estudios demuestran que altos niveles de T materna durante el embarazo pueden influenciar en la vida adulta de niñas a través de cambios hormonales y comportamentales (Wolf et al., 2002; Manikkam et al., 2006; Nada et al., 2010).

Modelos animales para el estudio de SOP

Teniendo en cuenta que el diagnóstico de SOP se realiza después de la pubertad y dado que existe una imposibilidad para obtener muestras fetales (más allá de aquella que puede obtenerse de la sangre del cordón umbilical a término), es prácticamente imposible determinar los eventos tempranos que contribuyen al desarrollo de esta patología en humanos. Los modelos animales proporcionan una herramienta valiosa para superar estas dificultades. Además de ser un medio para abordar eventos causales que conducen al desarrollo del fenotipo del SOP, los modelos animales permiten probar

estrategias preventivas y terapéuticas. Hasta la actualidad, son numerosos los modelos animales de SOP que han sido desarrollados y estudiados. Entre los diversos modelos animales ratas, ratones, ovejas y monos Rhesus son los más utilizados en la investigación del SOP, y cada uno ofrece diferentes beneficios (Padmanabhan y Veiga-Lopez, 2013a; b; Maliqueo et al., 2014; van Houten y Visser, 2014). Sin embargo, la etiología del SOP aún no está clara debido a su compleja manifestación y a las limitaciones que poseen los estudios traslacionales realizados con animales.

Aunque existe una brecha en lo que respecta a la fisiología reproductiva entre los humanos y los animales de laboratorio, (por ejemplo: diferencias en el número y patrones de ovulación, perfil hormonal, sensibilidad a las hormonas, estilos de comportamiento y anatomía de los órganos), los estudios que utilizan modelos animales son esenciales para explorar la fisiopatología del SOP *in vivo*.

De acuerdo con el criterio de Rotterdam para el diagnóstico de SOP (Anón, 2004), deberían manifestarse ciertas características en los modelos animales como son el hiperandrogenismo, ovarios poliquísticos, y un ciclo estral anormal (amenorrea u oligomenorrea en el caso de primates no humanos).

Es por ello que los modelos de SOP que se han desarrollado hasta el momento han utilizado una variedad de métodos para emular el síndrome, mediante la utilización de andrógenos, estrógenos, antiprogestágenos, manipulación genética y exposición crónica a la luz (Walters et al., 2012; Walters, 2015). Sin embargo, la mayoría de los modelos animales se han generado induciendo hiperandrogenismo, que se ha demostrado que produce modelos que muestran las características reproductivas, endocrinas y metabólicas del SOP. La justificación para el uso de estos modelos animales de SOP que se establecen al inducir un exceso androgénico radican en una vasta evidencia clínica que demuestra que los andrógenos tienen un papel clave en el desarrollo y la progresión del SOP.

El uso de modelos animales para proporcionar una visión biológica y clínica de los trastornos reproductivos humanos, como el SOP, se basa en el alto grado de conservación evolutiva (Walters et al., 2012) del sistema reproductivo de los mamíferos. Debido a razones éticas o logísticas los estudios en humanos no han sido posibles, por ello las similitudes fisiológicas con ciertos animales han permitido explorar y proporcionar información necesaria sobre trastornos reproductivos humanos.

Hasta la fecha, se han generado modelos de SOP en roedores, ovejas y primates (Walters et al., 2012; Abbott et al., 2013; Padmanabhan y Veiga-Lopez, 2013a) y no se deben subestimar los beneficios de estos modelos y su contribución hasta ahora a la comprensión del SOP (Fig. 1.4). Los modelos de roedores de SOP en particular han proporcionado información valiosa sobre la patogénesis del mismo debido a su facilidad y accesibilidad de uso, ciclo de vida reproductiva corta y antecedentes genéticos estables que permiten estudios decisivos sobre los mecanismos relevantes que subyacen a la patología. La viabilidad de generar ratones genéticamente manipulados personalizados los ha hecho recurso particularmente valioso y versátil para tales investigaciones.

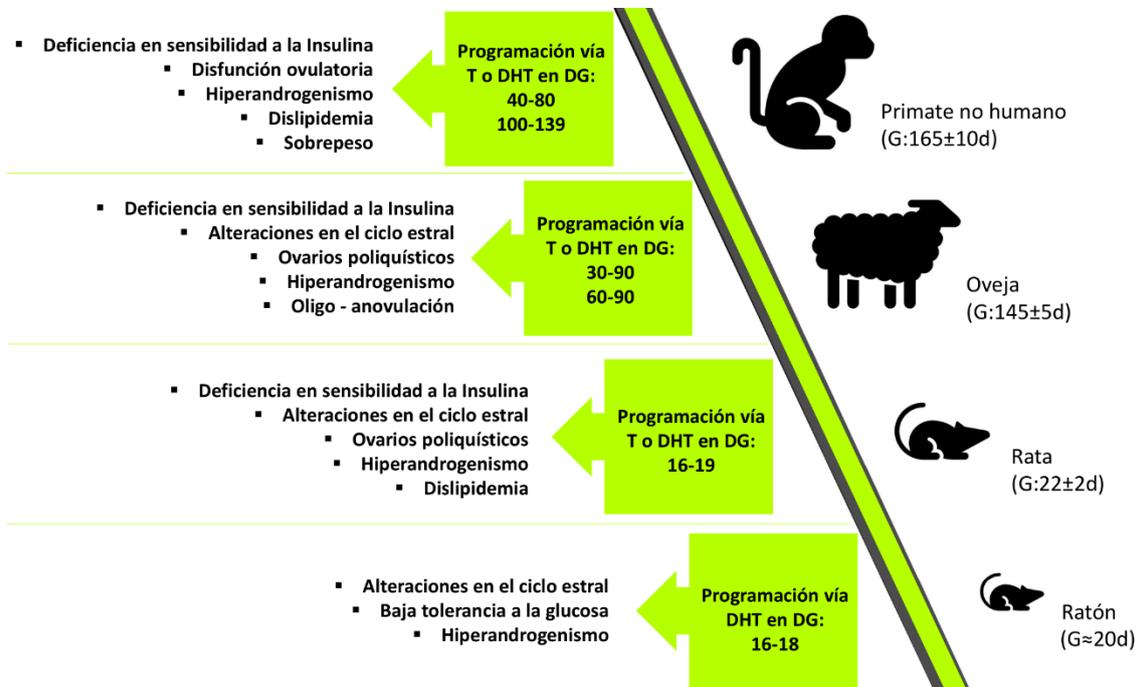


Figura 1.4: Modelos de programación fetal debido a exceso androgénico y características resultantes obtenidas (Adaptado de (Abruzzese et al., 2018)).

Referencias: DG= días de la gestación; G=duración de la gestación.

Roedores: modelo de exceso androgénico prenatal para el estudio de SOP

La exposición prenatal androgénica a ovejas y primates no humanos ha proporcionado modelos que muestran sorprendentes similitudes con el modelo humano de SOP (Abbott et al., 1998; Eisner et al., 2002; Recabarren et al., 2005). Más aún, se ha sugerido que el modelo animal ideal debería ser el primate no humano: el mono Rhesus, en el

que los aspectos fisiológicos del modelo se asemejan más al metabolismo humano. Sin embargo, estos modelos son extremadamente costosos y no se pueden adaptar fácilmente al uso de manipulaciones genéticas.

En contraparte, los modelos de roedores proporcionan una herramienta versátil para descifrar los mecanismos biológicos precisos asociados con el desarrollo de PCOS. Entre las numerosas ventajas del uso de ratas y ratones sobre otras especies animales utilizadas como modelos *in vivo* se incluyen sus antecedentes genéticos estables, facilidad de manejo y mantenimiento, vida útil reproductiva más corta y tiempos de generación, ciclos estrales cortos y viabilidad de manipulaciones genéticas (Walters et al., 2012).

Algunos de los modelos para el estudio de SOP se desarrollan mediante programación perinatal (Walters et al., 2012) y también se han desarrollado modelos en donde la inducción del SOP ocurre en etapa puberal y/o prepuberal (Motta, 2010; Walters et al., 2012; Paixão et al., 2017). Sin embargo, dentro de los diferentes modelos para el estudio de SOP en roedores, los modelos prenatales son de los más utilizados en los últimos años debido a que inducen cambios y alteraciones durante la diferenciación y maduración de los tejidos y órganos, llevando a alteraciones a largo plazo e incluso permanentes (Abbott et al., 2007; Padmanabhan et al., 2014).

Según la bibliografía existente, diferentes modelos de programación fetal debido a exceso androgénico han sido desarrollados, y mayormente se diferencian en la dosis, tipo de andrógeno y momento de la gestación en que fue aplicado y entre ellos las características que se han emulado en roedores (ya sean metabólicas y reproductivas) presentan diferencias, lo cual ha generado discrepancias y, por lo tanto, son varios los modelos posibles para emular las características de SOP (Wolf et al., 2002; Demissie et al., 2008; Amalfi et al., 2012; Walters et al., 2012; Heber et al., 2013; Yan et al., 2013). Las diferencias en la secreción de gonadotrofinas se establecen durante la vida fetal y perinatal, siendo la secreción testicular de andrógenos la que modula el cerebro masculino en desarrollo haciéndolo incapaz de producir picos pre-ovulatorios de gonadotrofinas en la adultez. Mientras que, en ausencia de andrógenos, el cerebro femenino en desarrollo adquiere la habilidad de sostener secreciones cíclicas de gonadotrofinas durante la adultez (Foeking et al., 2008). Teniendo en cuenta que esta diferencia en la exposición al andrógeno durante la gestación puede modular el sistema

neuroendocrino, los modelos de programación fetal por andrógenos en roedores utilizan dicho periodo (días 16 a 19 de gestación) para el desarrollo del modelo que permite emular las características del SOP. Estos modelos de exceso androgénico prenatal utilizan esteroides libres (ya sea T o DHT) debido a la corta vida que presentan y a que son metabolizados rápidamente, limitando sus efectos a esos días del desarrollo (Foecking et al., 2008) (Fig. 1.5).

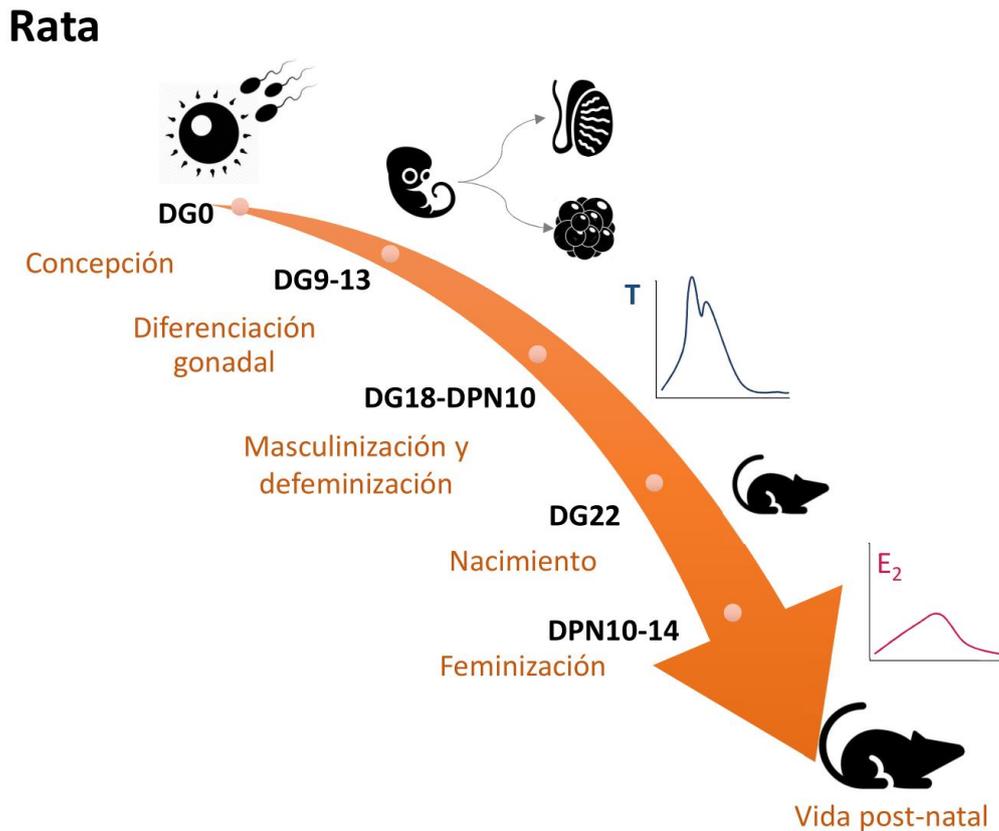


Figura 1.5: Esquema representativo del proceso de diferenciación sexual en la rata luego de la concepción y hasta la vida post-natal.

Referencias: DG= día de gestación; DPN=día post-natal.

El útero

El útero es el órgano reproductor femenino de la mayoría de los mamíferos en el cual se produce la gestación. Se encarga de recibir al óvulo fecundado y su principal función es albergar y nutrir al embrión durante la gestación hasta el momento del parto.

En los humanos los conductos paramesonéfricos, de donde proviene el útero, se encuentran fusionados casi por completo, dando lugar a una matriz en la parte

fusionada y a las trompas uterinas en la parte no fusionada. Para el caso de los roedores, estos conductos se fusionan muy caudalmente poco antes de conectar con la vagina, originándose así un útero bicorne (Fig. 1.6).

El útero se compone de tres estratos: el endometrio, el miometrio, y el perimetrio. El endometrio es una mucosa que rodea la cavidad uterina, la cual se compone por un epitelio y un estroma. En su capa externa, se rodea de musculatura lisa, el miometrio, que representa la mayor parte del espesor de la pared uterina y, por último, el perimetrio que conforma la capa uterina peritoneal (Fig. 1.7).

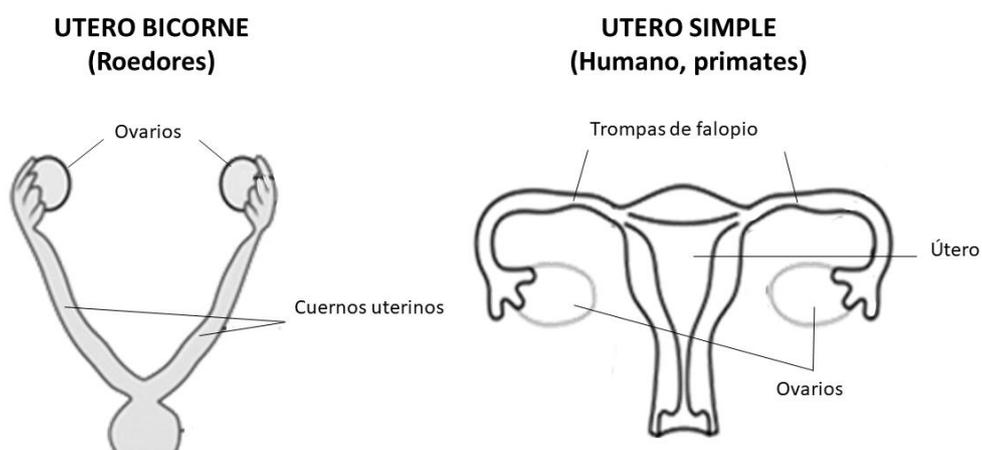


Figura 1.6: Figuras representativas de la anatomía uterina en roedores y en humanos y primates.

El endometrio

El endometrio es la porción más interna del útero, compuesto por una capa funcional y una capa basal. La capa funcional, morfológicamente, está constituida por el epitelio luminal, el glandular, el estroma y los compartimentos vasculares. Funcionalmente es la encargada de la proliferación, secreción y degeneración tisular, mientras que la capa basal le confiere al endometrio la capacidad regenerativa (Fig. 1.7).

En ausencia de estímulo esteroideo el endometrio tiene un grosor mínimo, formado por un estroma denso, entre el que existen pequeñas invasiones epiteliales glandulares, con células cuboidales. Los fenómenos que ocurren en la fase proliferativa endometrial, que coincide con la fase folicular del ovario están regidos por los estrógenos, quienes inducen el crecimiento progresivo en grosor de esta mucosa, mediante el estímulo de la mitosis tanto de las células del estroma como del epitelio. Los efectos de los estrógenos

sobre la proliferación celular pueden ser directos (activando la transcripción de genes específicos) o el resultado de interacciones paracrinas entre células epiteliales y estromales (Lessey et al., 1988, 1996; Press et al., 1988). Más aún, los estrógenos son reguladores de la vascularización endometrial (Critchley et al., 2001). Por otro lado, la fase secretora del endometrio que coincide con la fase periovulatoria y lútea del ciclo ovárico se inicia con la secreción de P₄, quien produce cambios en las células del estroma y del epitelio, la disminución progresiva de la mitosis, y la aparición de la secreción glandular. La progresión de este estímulo provoca la decidualización del estroma y la aparición perivascular de linfocitos granulares, células *natural killers* (NK).

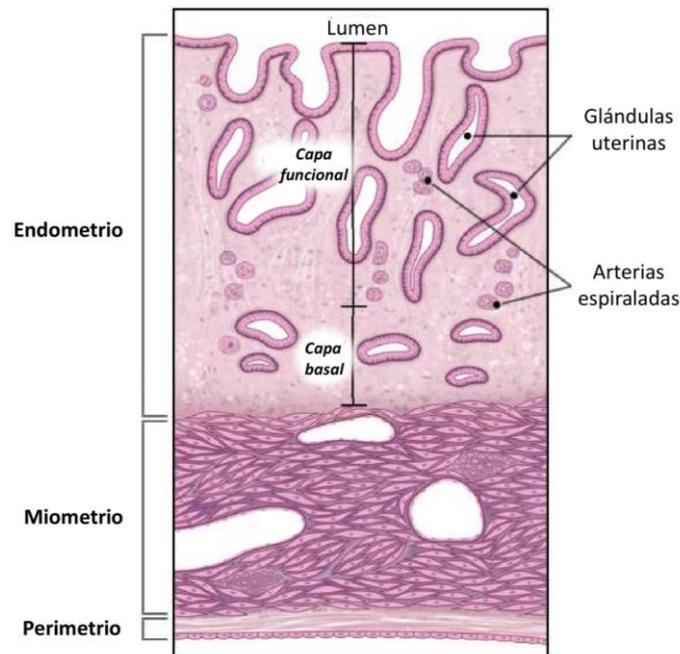


Figura 1.7: Figura representativa de la histomorfología uterina y su estructura. Modificado del libro "Anatomy and Physiology in Context" de John Redden & Joe Crivello.(Anón)

Hormonas ováricas y su influencia en el ciclo endometrial

La morfología y la función de las células endometriales están influenciadas por los cambios cíclicos dados por la síntesis de esteroides sexuales en el ovario. Tanto los estrógenos como la P₄ son hormonas ováricas que controlan la ciclicidad endometrial (Lebovic et al., 2000) y producen cambios determinados en la arquitectura endometrial. Según se ha establecido, existen una serie de criterios que permiten determinar el día del ciclo en el cual se encuentra el tejido endometrial (Noyes et al., 1975). A partir de

esto, es posible establecer dos etapas principales del endometrio a través del ciclo: la fase proliferativa y la fase secretora.

Durante la fase proliferativa, el E₂ producido por los folículos ováricos en desarrollo induce la proliferación celular en el endometrio (Ferenczy y Guralnick, 1983). Esto hace que el lumen de las glándulas se ensanche y adquiera un contorno ondulado.

En la fase secretora, por acción de la P₄ producida por el cuerpo lúteo, las células estromales son inducidas a diferenciarse, aumentan de tamaño, se redondean y secretan péptidos. Además, las glándulas endometriales se hacen progresivamente tortuosas y el estroma es cada vez más edematoso. Las células glandulares se vacuolizan, y las vesículas de glicógeno que presentan migran desde la parte subcelular hacia la zona apical, para luego secretar glucoproteínas y péptidos (Ferenczy y Bergeron, 1991) (Fig. 1.8).

Dado que el endometrio es uno de los tejidos cuya función es principalmente regulada por los esteroides circulantes de origen ovárico, en situaciones endocrino-metabólicas asociadas a anomalías en la concentración sanguínea de algunas hormonas y proteínas, como es el caso del SOP, los procesos que ocurren en el endometrio y la forma como las células responden a los estímulos biológicos alterados, pueden verse afectados.

De manera similar a la de otros miembros de la familia de hormonas esteroideas, los andrógenos, promueven sus efectos genómicos vía receptores nucleares. Progesterona y andrógenos se encuentran principalmente unidos a la proteína ligante de esteroides sexuales (SHBG: "sex-steroid-binding globulin"), y solo la fracción libre de estas hormonas es responsable de sus efectos hormonales.

Cabe destacar que, los efectos hormonales pueden ser modulados de forma local por factores de crecimiento (Irwin et al., 1991; Möller et al., 2001).

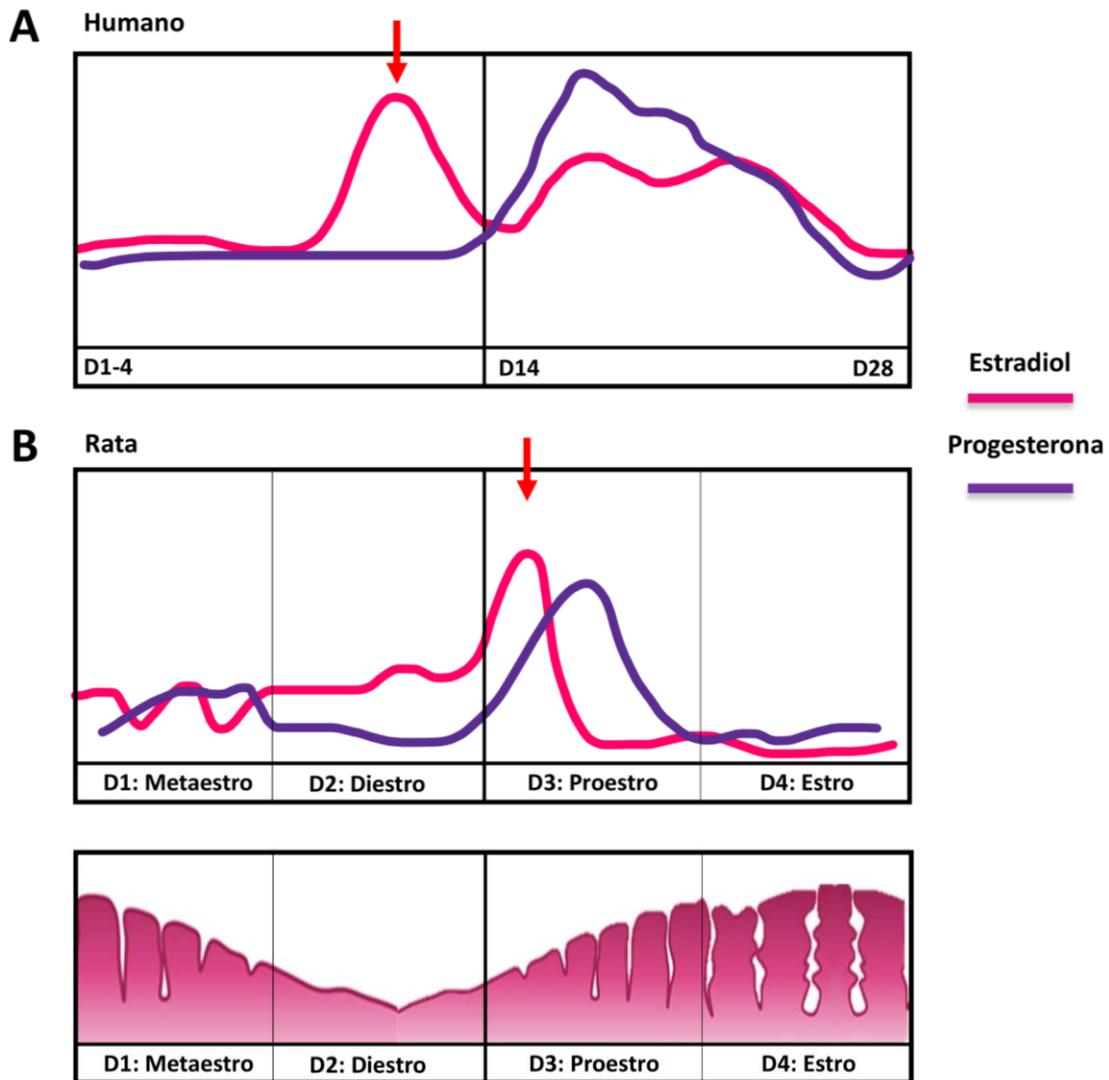


Figura 1.8: Esquema comparativo entre los niveles de E_2 y P_4 , en humano y rata. Niveles hormonales a lo largo del ciclo menstrual humano (A). Niveles hormonales y variación del grosor endometrial a lo largo del ciclo estral de la rata (B).

Receptores hormonales

En los tejidos como el endometrio, las acciones de las hormonas esteroideas se encuentran mediadas por receptores específicos, constituyendo así factores de transcripción importantes para numerosos genes, entre los que destacan aquellos relacionados con la proliferación celular y el control del ciclo celular (Conneely et al., 2002; Eyster, 2016). La expresión de los receptores se encuentra regulada por las hormonas presentes en circulación (Fig. 1.9), por lo que cualquier alteración en su concentración plasmática puede llevar a una desregulación de la expresión endometrial

de estos receptores, lo que podría generar consecuencias negativas sobre la implantación y/o viabilidad y diferenciación de las células endometriales.

Por otra parte, se conoce también que la transcripción mediada por los receptores de estrógenos puede ser estimulada por mecanismos independientes de los ligandos y que involucran vías de segundos mensajeros, como las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK); éstas estimulan la fosforilaciones en residuos serina del receptor, las cuales pueden ser tejido-específicas (Björnström y Sjöberg, 2005; Liu et al., 2019a).

Receptores de estrógenos en el endometrio

El efecto de los estrógenos sobre el tejido endometrial es mediado por receptores específicos, y su expresión se encuentra regulada por la disponibilidad de esteroides presentes. Los RE pertenecen a una clase de factores de transcripción dependientes de ligandos que influyen en el crecimiento y la diferenciación celular a través de los efectos sobre la expresión génica. Existen dos isoformas conocidas para el receptor de estrógenos: el RE alfa (REa) y el RE beta (REb), quienes difieren en sus funciones fisiológicas (Critchley et al., 2001). El RE a es la isoforma predominantemente expresada en el útero y quien media la sensibilidad al estrógeno en el endometrio. El RE a es regulado positivamente por E₂, y alcanza su máxima expresión en el endometrio durante la fase proliferativa tardía, tanto en el epitelio como en el estroma. En la fase secretora su expresión en el epitelio y en el estroma es inhibida en respuesta a P₄. Por otro lado, el RE b se expresa principalmente en el epitelio endometrial, aunque su función no se ha dilucidado por completo (Weihua et al., 2000; Lecce et al., 2001; Hapangama et al., 2015) (Fig. 1.9).

Receptores de progesterona en el endometrio

El RP pertenece a la misma familia de receptores que el RE y se expresa en dos isoformas, RP A y RP B, que provienen de un solo gen. La acción de la progesterona es compleja, con expresión diferencial de RP A y RP B durante el ciclo. La progesterona tiene la doble función de estimular la expresión de factores paracrinos en el estroma endometrial, mientras inhibe la expresión de RE y RP. Por lo tanto, es un regulador fisiológico negativo de la acción del estrógeno en el endometrio.

Al igual que para los receptores de estrógenos, la unión de la P₄ a las diferentes formas de su receptor puede provocar respuestas antagónicas, lo que es tejido dependiente. En este contexto, es importante considerar que la concentración relativa de cada una de las isoformas puede ser importante para evaluar con mayor precisión la acción esteroidea en estos tejidos (Wagley y Hardiman, 2007).

La acción estrogénica en la fase proliferativa induce un aumento de la concentración tisular de la isoforma B del RP, siendo por lo tanto mayor su expresión. Con respecto a esto, en cánceres endometriales dependientes de estrógenos se ha observado un predominio del mRNA para la isoforma B del RP (Kastner et al., 1990). Por otra parte, la isoforma A del RP predomina durante la fase secretora media, sugiriendo una acción sobre la transcripción de genes involucrados en el proceso de implantación. Según se ha descrito, en los endometrios de SOP se ha observado que la presencia del RP es similar a la de los endometrios normales (Maliqueo et al., 2003) (Fig. 1.9).

Receptores de andrógenos en el endometrio

Los andrógenos tienen una importante acción en la fisiología endometrial, aunque su papel en el desarrollo y la función endometrial durante el ciclo ovárico sigue siendo poco conocido (Rodríguez Paris y Bertoldo, 2019). Se ha detectado su expresión en secciones de tejido mediante inmunohistoquímica y se ha descrito su localización en núcleos en células estromales, epiteliales, endoteliales y miometriales del útero humano y decidua (Horie et al., 1992; Mertens et al., 1996, 2001).

Se sabe que el RA es regulado positivamente por E₂ en la fase proliferativa (Lovely et al., 2000) y negativamente por P₄ en fase secretora (Slayden et al., 2001). Se ha demostrado que tanto el mRNA como la proteína del RA experimentan cambios cíclicos durante el ciclo ovárico (Mertens et al., 1996), siendo mayor la expresión durante la fase proliferativa, disminuyendo significativamente en la fase secretora (Vienonen et al., 2004) (Fig. 1.9).

Los andrógenos también aumentan la expresión de los RA endometriales, lo que sugiere un efecto sinérgico con los estrógenos en la regulación del receptor (Apparao et al., 2002). Iwai y col. (Iwai et al., 1995) encontraron que los andrógenos inhiben la expresión de RE y RP; sin embargo, en el SOP se cree que los efectos estimulantes del estrógeno en la expresión de RE y RP superan la inhibición androgénica. La sobreexpresión de los

RA endometriales en el SOP, como resultado de la exposición estrogénica y androgénica, proporciona evidencia que permite vincular el medio hormonal anormal que presenta el SOP con la disfunción endometrial (Gregory et al., 2002).

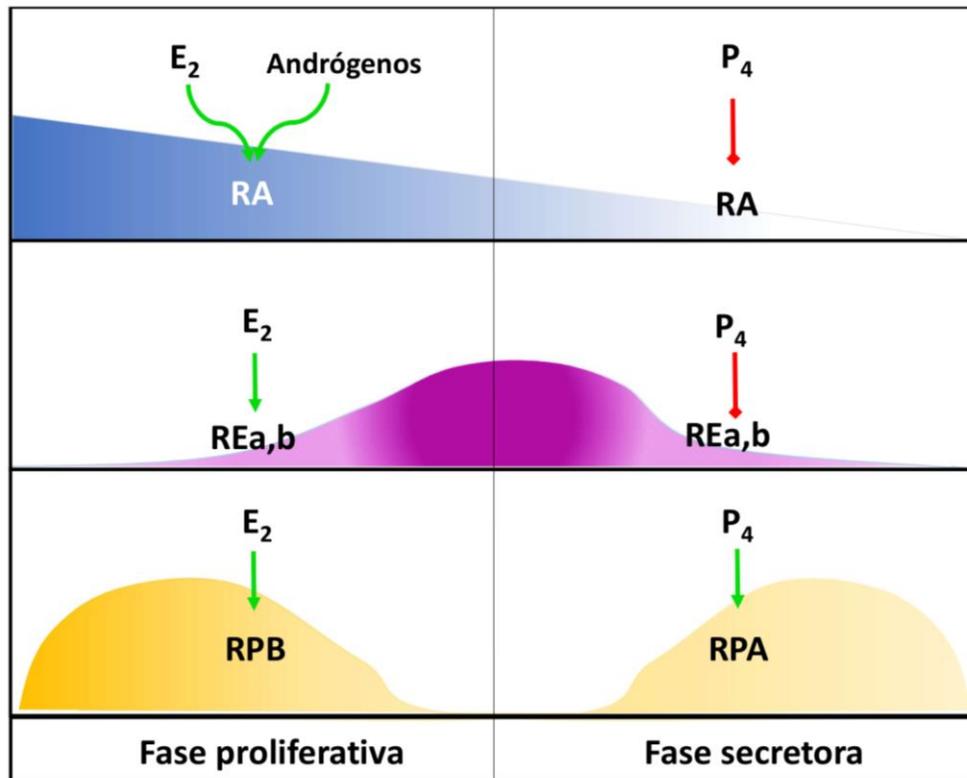


Figura 1.9: Esquema representativo de la expresión de receptores hormonales en el endometrio y predominio los mismos a lo largo del ciclo ovárico en el endometrio.

Endometrio y exceso androgénico

Evidencias recientes sugieren que el endometrio también expresa enzimas capaces de convertir precursores esteroidales en T y DHT y, por lo tanto, debe considerarse la regulación de andrógenos intracrina. Cada vez hay más reportes que demuestran que los andrógenos pueden afectar la proliferación endometrial, la diferenciación durante el establecimiento del embarazo, y la reparación de tejidos durante la menstruación en humanos. No es sorprendente que la desregulación de la acción androgénica en el endometrio esté asociada a patologías endometriales, como la endometriosis y el cáncer de endometrio, y que también podría desempeñar un papel importante en la infertilidad debido a disfunción endometrial.

Varios estudios recientes han demostrado que los niveles elevados de andrógenos en plasma están asociados con resultados reproductivos adversos, incluida la infertilidad y

una mayor incidencia de aborto espontáneo (Homburg et al., 1990; Tulppala et al., 1993; Okon et al., 1998; Bussen et al., 1999). Sin embargo, no está claro si la relación es causal u casual. Una especulación anterior fue que los altos niveles de LH, como los observados en la enfermedad de ovario poliquístico (y a menudo asociados con hiperandrogenemia), pueden afectar negativamente la maduración y calidad de los ovocitos (Tulppala et al., 1993). Una hipótesis más reciente es que los niveles altos de andrógenos afectan directa y negativamente la función endometrial y la implantación, lo que a su vez conduce a la subfertilidad y al aborto espontáneo recurrente (Tuckerman et al., 2000).

Homeostasis endometrial

La homeostasis tisular depende de una adecuada relación entre los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular que permiten que el tejido cumpla correctamente su función (King y Cidlowski, 1998). Dado que el endometrio se encuentra fundamentalmente bajo el control de hormonas esteroideas, su homeostasis se encuentra regulada por las mismas durante la progresión del ciclo. De esta manera, el endometrio está sujeto a procesos de remodelación, proliferación y diferenciación de las células endometriales, y es un balance específico entre proliferación y apoptosis, tanto en el epitelio como en el estroma, lo que permite un correcto desarrollo y función del mismo durante el ciclo (Chabbert Buffet et al., 1998).

Proliferación

Los órganos reproductivos femeninos, ovario y endometrio, experimentan el proceso de proliferación de manera cíclica, dado que se encuentran expuestas a las hormonas FSH y E2, responsables de estimular dicha proliferación (Speroff y Fritz, 2005).

La proliferación del epitelio endometrial llega a su máximo durante la fase folicular, y se detiene luego de la ovulación (Koikeguchi et al., 1992). El estrato basal del endometrio presenta una proliferación baja pero constante a través del ciclo menstrual, y es el estrato funcional del endometrio el que experimenta principalmente los cambios cíclicos (Ferenczy et al., 1979).

La proliferación de las células endometriales comienza con la unión del E₂ a su receptor nuclear, y la consecuente activación de los elementos de respuesta a E₂. Esto activa la transcripción de algunos genes específicos para factores de crecimiento, entre otros, que actúan de manera paracrina y/o autocrina en la expresión de proto-oncogenes (Odom et al., 1989). Cabe resaltar que, según se ha reportado en experimentos *in vitro*, las células aisladas del epitelio endometrial presentan una baja respuesta proliferativa a E₂, por lo que se considera indispensable la presencia de las células del estroma en la respuesta mitogénica de las células glandulares en la fase proliferativa. Por otro lado, es la P₄ quien contrarresta el efecto del E₂ ya que produce una disminución en los receptores para estrógenos y un aumento en el metabolismo de E₂ a conjugados no activos (Ferenczy et al., 1979).

Por otra parte, los andrógenos han sido descritos con efectos tanto proliferativos como apoptóticos en otros tejidos reproductivos, pero aún no se ha dilucidado por completo su acción en la fisiología o fisiopatología endometrial (Simitsidellis et al., 2017). Se ha reportado que, en células estromales estimuladas por andrógenos, muestran un aumento en la expresión de receptores de factores de crecimiento (Watson et al., 1998; Cloke y Christian, 2012). Debido a estos antecedentes es posible pensar que los andrógenos pueden tener alguna función particular durante el ciclo endometrial. Según estudios realizados en células del epitelio endometrial se ha mostrado que los andrógenos provocan una disminución de la proliferación celular y de la secreción de glicodelina, proteína que sirve como marcador de la función endometrial (Tuckerman et al., 2000). Además, se ha propuesto que la mayor concentración de andrógenos plasmáticos se correlacionaría con una disminución de proteínas marcadoras de la función endometrial, así como, con un aumento de la frecuencia de abortos recurrentes (Sagle et al., 1988; Okon et al., 1998).

El estudio de los factores que permiten regular la proliferación, y la medición de su capacidad proliferativa resulta de interés debido a que la proliferación es un proceso que se encuentra asociado al desarrollo de cáncer endometrial (Kurman et al., 1985; Tuckerman et al., 2000).

Durante el ciclo celular (Fig. 1.10), las células que proliferan atraviesan las siguientes fases:

- Fase G1: representa el periodo entre la mitosis (M) y la fase de síntesis de DNA (S). La mayoría de las funciones especializadas de las células se realizan en esta fase y en G0, y el contenido de DNA de las células diploides normales es equivalente a un doble set de cromosomas. Las células están bajo la influencia de factores de crecimiento, que pueden hacer proseguir a las células hacia la fase S del ciclo celular o entrar en arresto celular, también llamado período G0. Antes de entrar en la fase S, existe un punto de restricción, bajo el control de un gen supresor de tumores, retinoblastoma, que es capaz de detener la proliferación de células genéticamente defectuosas y conducir las a G0 para ser reparadas o entrar en apoptosis.

- Fase S: es el periodo durante el cual el DNA se sintetiza.

- Fase G2: en este periodo las células presentan un contenido de DNA duplicado y se preparan para la mitosis.

- En la fase M, se produce la división celular, y la subsiguiente condensación de la cromatina y distribución de los cromosomas entre las células hijas.

La proliferación celular normal está regulada por la interacción entre ciclinas, quinasas dependientes de ciclinas (Cdks), CKIs (inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas), y productos de proto-oncogenes y de genes supresores de tumores (Nurse, 1994; Sherr y Roberts, 1995). Durante la fase G1, los complejos Ciclina/Cdk se unen a la proteína del retinoblastoma (Rb, regulador negativo de la progresión del ciclo celular) inactivándola mediante fosforilación. Lo anterior conduce a la liberación de la proteína E2F y a la progresión a la fase S del ciclo celular (Weinberg, 1995). La proteína Rb en su forma no fosforilada, se expresa normalmente en el endometrio de fase proliferativa y en endometrio con hiperplasia, disminuyendo progresivamente su expresión en cáncer endometrial (Ruhul Quddus et al., 2002).

Por otro lado, se sabe que la capacidad de los complejos Ciclina/Cdk para fosforilar Rb es inhibida por inhibidores CKIs, entre los que se destacan las proteínas p15, p16, p21 y p27, las cuales suprimen la actividad quinasa de los complejos Ciclina/Cdk conduciendo al arresto del ciclo celular (Sherr y Roberts, 1999; Besson et al., 2008). Por otra parte, la proteína p53, estimula la síntesis de p21 y p27 regulando el ciclo celular y además regula la apoptosis por activación de la transcripción del gen bax (Abukhdeir y Park, 2008; Abbas y Dutta, 2009).

Los cambios en el balance entre apoptosis y proliferación pueden ser fisiológicos, como son aquellos que suceden durante el ciclo endometrial, donde durante las fases de proliferación y diferenciación, se produce un balance específico entre los procesos de apoptosis y proliferación, tanto en el epitelio como en el estroma. Sin embargo, resulta interesante investigar que sucede con el balance homeostático uterino en condiciones patológicas como lo es SOP, cáncer o hiperplasia endometrial (Avellaira et al., 2006), como así también en situaciones donde la concepción embrionaria no sucede por fallas en la implantación (Lessey y Young, 2014).

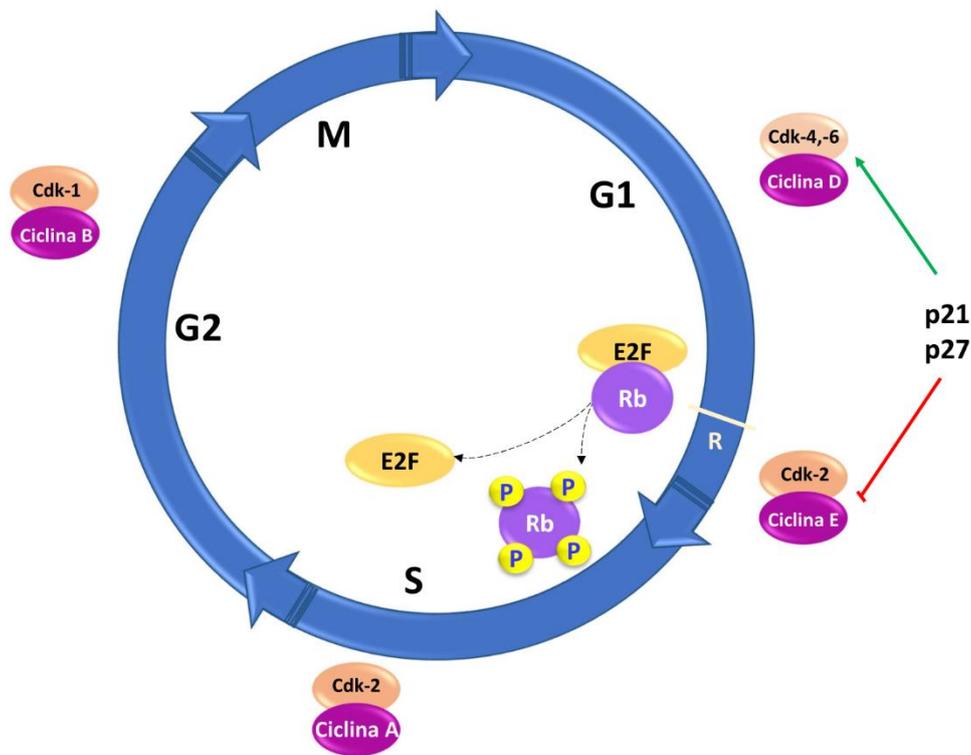


Figura 1.10: Representación esquemática del ciclo celular.

Apoptosis

La apoptosis es el mecanismo fisiológico de muerte celular programada a través del cual los organismos multicelulares eliminan las células no necesarias o potencialmente perjudiciales (Kerr et al., 1972; Lockshin y Zakeri, 2001; Renehan et al., 2001).

La muerte apoptótica puede desencadenarse por diversos estímulos y señales que pueden ser fisiológicas, fisiopatológicas o exógenas provenientes del ambiente, en

donde las células se “suicidan” bajo la acción de controles internos y externos (Allen et al., 1998).

Los cambios morfológicos de la apoptosis comienzan con la condensación temprana de la cromatina y desintegración de la envoltura nuclear, que lleva a la formación de masas de cromatina perinuclear y a la disminución del tamaño nuclear. Uno de los marcadores más característicos de apoptosis es la fragmentación del DNA en segmentos de 180- 200 pb (Hale et al., 1996). A nivel citoplasmático, la característica morfológica más importante es la fragmentación de la célula en los llamados cuerpos apoptóticos. La membrana plasmática también presenta alteraciones, las cuales se manifiestan por separación de las células apoptóticas de sus vecinas (por pérdida de las uniones intercelulares), la exposición de marcadores de superficie y cambios en la composición de los lípidos de membrana, entre ellos el fosfolípido fosfatidilserina que se transloca desde la cara citoplasmática de la membrana celular a la superficie externa de la célula. Este desensamblaje apoptótico ordenado y secuencial es silencioso, y lleva a que estas células pasen desapercibidas por el sistema de respuesta inflamatoria, y sean solamente reconocidas por los macrófagos, que finalmente fagocitan los cuerpos apoptóticos (Hale et al., 1996). De igual manera ocurre la fragmentación intranuclear del ADN y la pérdida sistemática de sustratos vitales por efecto de proteasas específicas denominadas caspasas (Elmore, 2007). Las caspasas son una subfamilia de 13 cistein-proteasas que son sintetizadas de manera inactiva (zimógenos) y son activadas por corte proteolítico. Las caspasas en la apoptosis se pueden clasificar en dos grupos: las iniciadoras (de señalización o que activan a otras caspasas) como las 2, 8, 9 y 10; y las efectoras o ejecutoras como las 3, 6 y 7 que hidrolizan sustratos selectivos (Kiraz et al., 2016). Todo esto lleva a la fragmentación de la célula, formándose pequeñas vesículas llamadas cuerpos apoptóticos aún rodeados de membrana; la cual cambia de composición dándose una translocación de la fosfatidilserina a su superficie la cual sirve de señal de reconocimiento para macrófagos y así los cuerpos son rápidamente fagocitados (Golstein et al., 2003). Existen dos principales rutas de señalización mediante las cuales una célula se vuelve apoptótica: La **vía extrínseca**, la cual se inicia por la unión de ligandos específicos a ciertos receptores de la superficie celular llamados receptores de muerte. Esta interacción lleva a la activación de la caspasa 8, lo que conlleva al comienzo de una cascada de activación de otras moléculas que conduce a la muerte celular; por

otro lado, existe la **vía intrínseca**, la cual está controlada por el desbalance entre proteínas pro- y anti-apoptóticas de la familia Bcl-2, y que se inicia a nivel mitocondrial y que lleva a la conformación del apoptosoma, un complejo de proteínas que genera la activación de la caspasa 9 quien inicia la cascada que llevará a la muerte por apoptosis. Ambas vías convergen en la activación de las caspasas 3, 6 y 7, siendo la principal la caspasa-3 (Fig. 1.11) (Kaczanowski, 2016).

Los agentes que inducen apoptosis lo hacen sobre tejidos específicos. En particular, en el endometrio humano normal, la apoptosis ha sido observada a través de la fase lútea, la menstruación, en la fase folicular temprana (Verma, 1983; Tabibzadeh, 1996) y más aun localmente en el sitio de implantación (Finn, 1977). Además, el ciclo endometrial involucra un proceso apoptótico, lo que sugiere que existe una regulación hormonal del mismo durante la remodelación endometrial (Rango et al., 1998).

Por otro lado, ciertos autores han descrito la presencia de Bcl-2 (proteína anti-apoptótica) en el endometrio humano (Gompel et al., 1994). Según estos autores se ha demostrado una variación en la expresión de Bcl-2 durante el ciclo endometrial en la capa funcional, y extendiéndose por todas las glándulas durante la fase proliferativa, y desapareciendo hacia la fase secretora. En tanto, en el estroma la expresión de Bcl-2 se hace coincidente con la diferenciación de las células. Estos resultados sugieren que la expresión de Bcl-2 en las glándulas es inhibida a medida que aumenta la concentración de P₄. Según se ha descrito existen otras proteínas de la familia Bcl-2, tales como Bax, Bak, Bcl-Xs y Bcl-XL, que tendrían variaciones cíclicas en su expresión en el endometrio humano, siendo Bax (proteína pro-apoptótica) mayormente expresada en el endometrio secretor (Tao et al., 1997, 1998; Ma et al., 2010). Se conoce que Bax ejerce su efecto pro-apoptótico a través de la liberación de citocromo-c mitocondrial, lo cual activa a las caspasas, enzimas efectoras del proceso apoptótico. Del mismo modo, Bak, otra proteína pro-apoptótica, ha sido escasamente detectada en fase proliferativa, pero aumenta en fase secretora donde estaría confinada casi exclusivamente al epitelio glandular (Tao et al., 1998). Por su parte, en el endometrio humano de fase proliferativa, es factible observar algunas células con una fuerte tinción para Bax y una débil tinción para Bcl-2 sin ser apoptóticas, lo que indica que existirían factores involucrados en la regulación de la apoptosis en las células endometriales (no mediante la vía intrínseca) (Tao et al., 1997). Es por ello que se ha sugerido que la acción de las

proteínas de la familia Bcl-2, debe estudiarse en relación a otras proteínas reguladoras de la apoptosis durante el ciclo endometrial.

Por último, la survivina, una proteína perteneciente a la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis, se expresa generalmente en tumores y en células que también se encuentran proliferando (Jaiswal et al., 2015). Inicialmente, la survivina ha sido descrita como una inhibidora de la caspasa 9, sin embargo, se ha demostrado que también actúa como reguladora clave del ciclo celular (Mita et al., 2008).

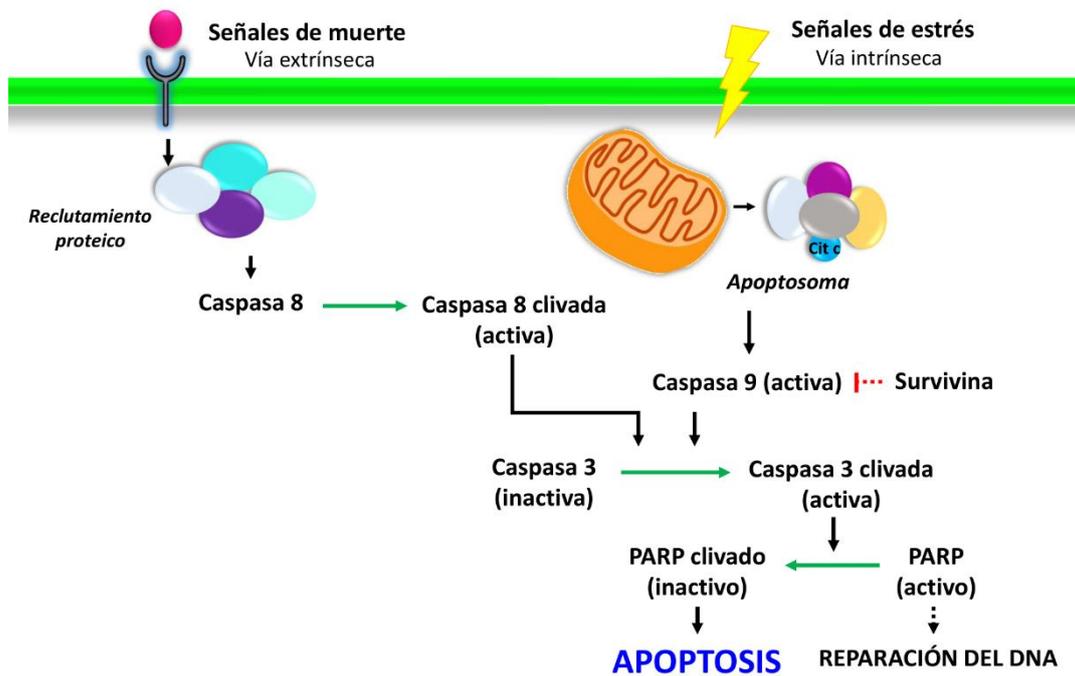


Figura 1.11: Esquema representativo del proceso apoptótico: vías intrínseca y extrínseca.

Receptores activados por proliferadores peroxisomales

Los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR) son factores de transcripción activados por ligandos (naturales o sintéticos) y que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares, los cuales, como sensores energéticos, juegan un papel importante en la regulación del metabolismo de los lípidos y de la glucosa formando así una conexión directa entre las señales extracelulares y la expresión de genes (Issemann y Green, 1990; Dreyer et al., 1992; Kliewer et al., 1994).

Se ha descrito que existen tres isoformas de PPAR: PPAR alfa, delta, y gama (PPARs) (Tyagi et al., 2011) cada uno de los cuales actúa en distintos tejidos, desempeñando

roles específicos en cada uno (Lehrke y Lazar, 2005). Las 3 isoformas de PPARs están codificados en diferentes genes y de cada uno de ellos existen variantes por producto de *splicing* alternativo y del uso de distintos promotores (Komar, 2005). Se identificó la presencia de PPARs en diversas especies, incluyendo la rata y el humano (Huang, 2008).

Estructura y mecanismos de regulación de los PPARs

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

Los PPARs se unen específicamente al DNA como heterodímeros junto al receptor de ácido 9-cisretinoico (RXR). La unión del ligando al heterodímero provoca un cambio conformacional en la estructura llevando a la disociación de proteínas correpressoras y al reclutamiento de co-activadores, los cuales habilitan la unión del complejo a las secuencias PPRE del DNA (Puigserver et al., 1998; Finck, 2006); esto permite la activación de la transcripción de genes blancos (Fig. 1.12) (Vélez et al., 2013) que intervienen y modulan procesos de proliferación, inflamación y diferenciación celular (Müller et al., 2008). Por otra parte, en ausencia de ligandos, se reclutan correpresores, quienes regulan negativamente la actividad transcripcional de los PPARs (Yu et al., 2005; Cohen, 2006).

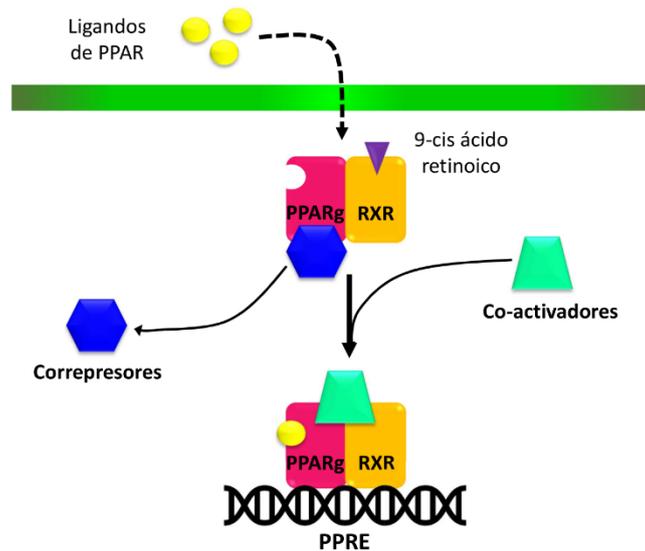


Figura 1.12: Esquema que representa el mecanismo clásico de acción de los PPARs. El heterodímero PPAR-RXR se une a las regiones PPRE localizadas en el promotor de genes blanco. La unión del ligando induce un cambio conformacional en los PPARs que permite su disociación de factores correpresores y el reclutamiento de factores co-activadores que activan la transcripción génica.

PPARs y su función en el útero

Según se ha reportado, el sistema PPAR regula las funciones uterinas (Bogacka et al., 2015; Vitti et al., 2016). La expresión de todas las isoformas de PPAR se ha demostrado en tejidos endometriales humanos, bovinos, ovinos, porcinos y roedores (Cammass et al., 2006; MacLaren et al., 2006; Nishimura et al., 2011). Los PPARs modulan la función uterina, regulando la expresión de varios genes (Dunn-Albanese et al., 2004; Latini et al., 2006; Coyne et al., 2008; Falchi y Scaramuzzi, 2013). En roedores, PPAR delta se expresa durante la decidualización y regula la implantación (Lim y Dey, 2000). La activación de PPAR gama aumenta el grosor uterino, estimula la proliferación, y conduce a cambios morfogénicos en el tejido uterino (Gunin, 2004; Froment et al., 2006). Además, su activación desencadena efectos antiinflamatorios y antiangiogénicos, lo que conduce a la inhibición del crecimiento celular e induce la apoptosis (Lebovic et al., 2004; Demirturk et al., 2006; Aytan et al., 2007; Martin, 2010; Kadam et al., 2015; Velez et al., 2018). Más aún la delección del gen de PPAR gama provoca subfertilidad (Cui et al., 2002). Los ratones *knockout* para PPAR alfa muestran una fertilidad normal pero altas tasas de aborto materno (Yessoufou et al., 2006; Yang et al., 2008). Como se ha descrito mayormente, PPAR está implicado en numerosas funciones uterinas bajo condiciones

fisiológicas, sin embargo, poco se sabe acerca de si el sistema PPAR se ve afectado durante una afección patológica. En cáncer de endometrio, la expresión génica de todas las isoformas de PPAR se ha encontrado disminuida (Knapp et al., 2012) pero poco se conoce acerca de su expresión en el contexto hiperandrogénico en el cual se enmarca el SOP donde la función endometrial se ve afectada (Toth et al., 2007; Tyagi et al., 2011).

PPAR gama, estrés oxidativo e inflamación

Se ha informado que los PPAR regulan la expresión y la actividad de ciclooxigenasa-2 (COX-2), la enzima limitante de la síntesis de prostaglandinas (PG) (Sheldrick et al., 2007). La activación de PPAR estimula la síntesis de PG. Más aún, se ha demostrado que existe un patrón de expresión diferencial de PPAR en respuesta a los niveles hormonales durante el ciclo estral en diferentes especies (Bogacka et al., 2015; Socha et al., 2017). Todas las isoformas de PPAR regulan la producción y degradación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés *reactive oxygen species*). Los tres tipos principales de ROS son: el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el hidroxilo ($\cdot OH$). Las ROS no solo desempeñan un papel importante como mensajeros secundarios en muchas cascadas de señalización intracelular, sino que también ejercen efectos indispensables en procesos patológicos que implican la generación excesiva de ROS. Los altos niveles de ROS podrían causar cambios genéticos al alterar el DNA (Zuo et al., 2016), lo que puede inducir una proliferación celular descontrolada (Bartsch y Nair, 2006; Ziech et al., 2011). Además, las ROS podrían ser uno de los principales inductores subyacentes que aumentan el riesgo de cánceres ginecológicos en pacientes con SOP (Sheehan, 2004). Como defensa frente a las ROS, existen mecanismos que intentan revertir la oxidación, entre ellos se encuentran las enzimas: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR), que pertenecen al mecanismo de defensa primario. SOD (a veces unido a cobre o zinc) cataliza la dismutación del anión superóxido para producir H_2O_2 y O_2 . CAT es la enzima que se encarga de eliminar el H_2O_2 de la célula cuando esta última se encuentra en altas concentraciones. GPx es una enzima que cataliza la reducción de H_2O_2 e hidroperóxidos libres orgánicos que requieren glutatión como co-sustrato. La GR es una proteína citosólica con una distribución tisular similar a la de GPx. La enzima reduce el glutatión

oxidado, utilizando el NADPH que fue generado por varios sistemas (Figura 1.13)(Lu et al., 2018).

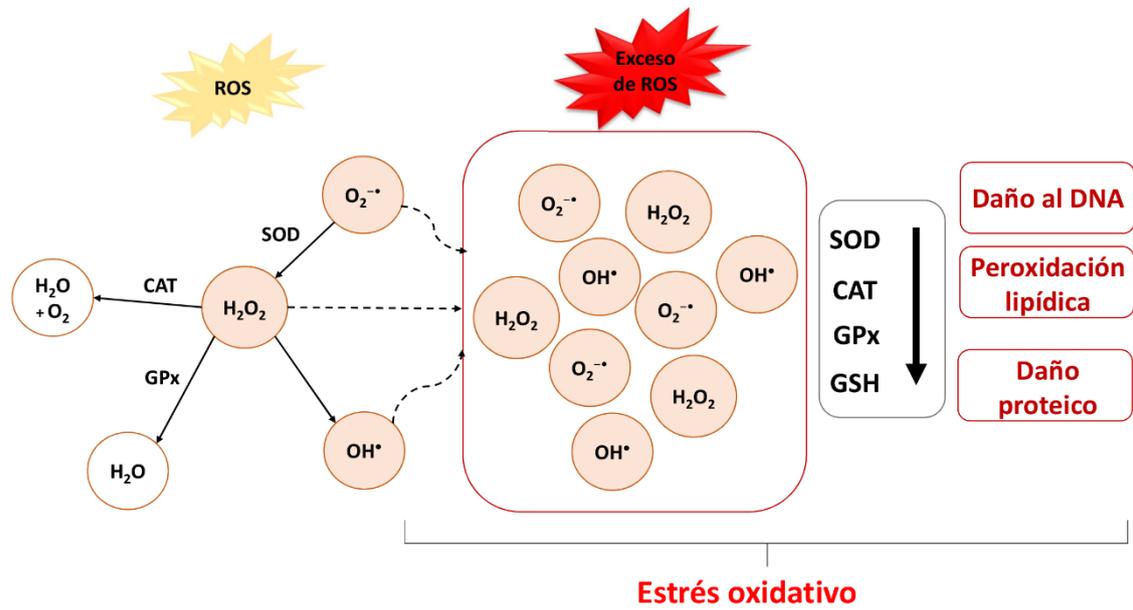


Figura 1.13: Esquema representativo de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y mecanismos de defensa.

II. Hipótesis y objetivos

Hipótesis

La hiperandrogenización prenatal induce reprogramación fetal que afecta las vías de señalización responsables de la homeostasis tisular en el endometrio. Como consecuencia de estas desregulaciones, se altera la funcionalidad uterina.

Objetivo general

Evaluar cómo se ve afectada la fisiología uterina por programación fetal como consecuencia del hiperandrogenismo prenatal.

Nos proponemos establecer cuáles son los mecanismos moleculares que se ven afectados por la hiperandrogenización prenatal en el tejido uterino.

Objetivos específicos

1. Analizar el efecto de la hiperandrogenización prenatal mediante el estudio histológico y morfométrico de las estructuras presentes en el tejido uterino (glándulas, epitelio estromal y glandular, estroma y miometrio).
2. Estudiar la expresión proteica de los receptores esteroideos presentes en el tejido uterino.
3. Evaluar el efecto de la hiperandrogenización prenatal sobre las vías que regulan el ciclo celular y el estado apoptótico del tejido uterino.
4. Analizar el efecto de la hiperandrogenización prenatal sobre el balance oxidativo y el estado pro-inflamatorio en el tejido uterino.
5. Estudiar la expresión del receptor activado por proliferadores peroxisomales gama (PPAR γ) y co-represor.
6. Analizar el efecto de la hiperandrogenización prenatal sobre la fertilidad, mediante estudios de apareo, fertilidad y cuidado materno.

III. Materiales y métodos

Modelo experimental animal

Se utilizaron ratas de la cepa Sprague-Dawley, las cuales tuvieron acceso *ad libitum* a alimento (Cooperación, SRL) y agua, con un fotoperíodo de 12 hs de luz, 12 hs de oscuridad a 22°C. Todos los experimentos y protocolos fueron realizados siguiendo las normas del *Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio* de la *Facultad de Medicina* de la *Universidad de Buenos Aires*, y la “*Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio*” “U.S. National Research Council”, 1996.

Como modelo que permite emular las características del SOP, utilizamos un modelo murino de hiperandrogenización prenatal. Se pusieron en apareo hembras vírgenes, de 3 meses de edad, con machos de la misma cepa (4 hembras por macho en cada jaula). La aparición de espermatozoides en el extendido vaginal fue considerada el día 0 de preñez, en ese momento las hembras preñadas se separaron y se colocaron una hembra por jaula y se asignó el grupo al que pertenece (control o tratamiento). Entre los días 16 y 19 de preñez, al grupo tratado se le administró en forma subcutánea una dosis diaria de 1 mg de testosterona libre (Testoviron Depot 250, Bayer) disuelta en 100 µl de aceite de maíz. El grupo control solo recibió el mismo volumen de aceite (vehículo). Este tratamiento no induce reabsorción embrionaria, disminución de crías por camada, relación hembra/macho, ni extensión de la preñez. A los 21 días de gestación se produjo el nacimiento de las crías (Fig. 3.1). Entre los 22 y 25 días de edad se separaron las crías hembras. Se designaron a los grupos como **hiperandrogenizado prenatalmente (PH)** y **control (C)**. Este procedimiento fue realizado 3 veces, en distintas ocasiones, con el objetivo de obtener un n=25 por grupo.

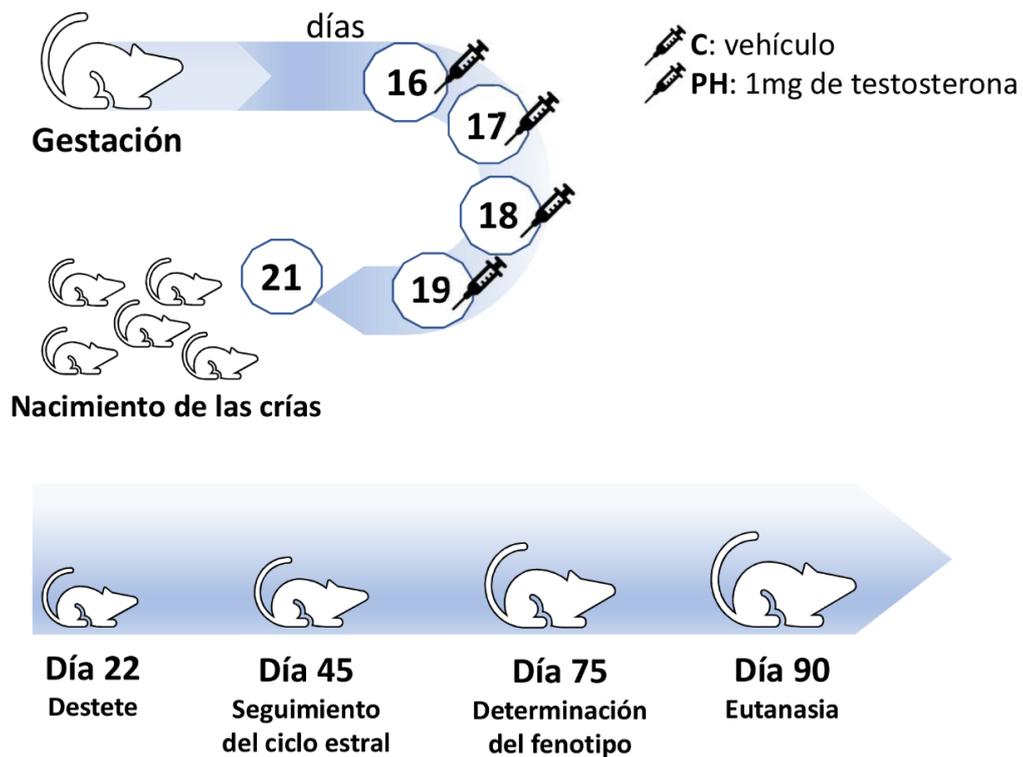


Figura 3.1: Esquema del modelo animal utilizado. Durante la gestación, entre los días 16 a 19 los animales reciben una dosis diaria de testosterona (grupo PH) o vehículo (grupo C). La cronología de la vida post-natal de las crías muestra los procedimientos realizados durante el manejo de los animales.

Seguimiento animal y determinaciones experimentales

Desde los 21 días y hasta la adultez los animales fueron pesados, con el objetivo de construir la curva de crecimiento y ganancia de peso. Se realizó un seguimiento del ciclo estral desde la pubertad hasta los 90 días de vida (etapa adulta), momento en el cual los animales fueron sacrificados (Fig. 3.1). A continuación, se detallan los estudios realizados (Fig. 3.2).

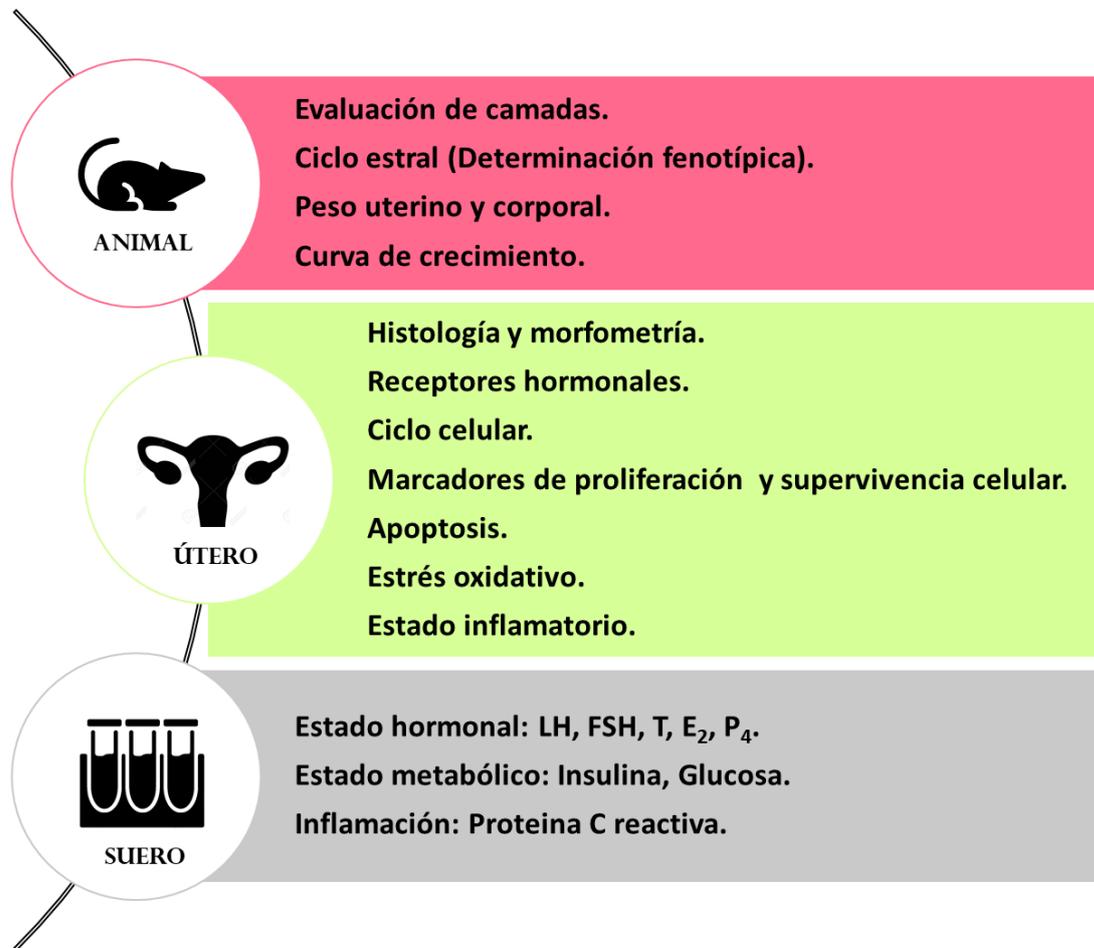


Figura 3.2: Resumen del seguimiento de animales y de las determinaciones experimentales realizadas.

Estudio del ciclo estral

Desde los 45 días de edad se realizó el seguimiento diario del ciclo estral de los animales mediante observación microscópica de los extendidos vaginales. El ciclo estral de la rata posee 4 estadios (Fig. 3.3), y se encuentra determinado respecto del tipo de células presentes en dicha muestra, teniendo en cuenta los siguientes parámetros:

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

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

El estadio **Metaestro** presenta predominio de células de tipo leucocitaria y pocas células epiteliales cornificadas.

En el estadio **Diestro** se observan principalmente leucocitos, muy pocas células queratinizadas y, a veces, células nucleadas.

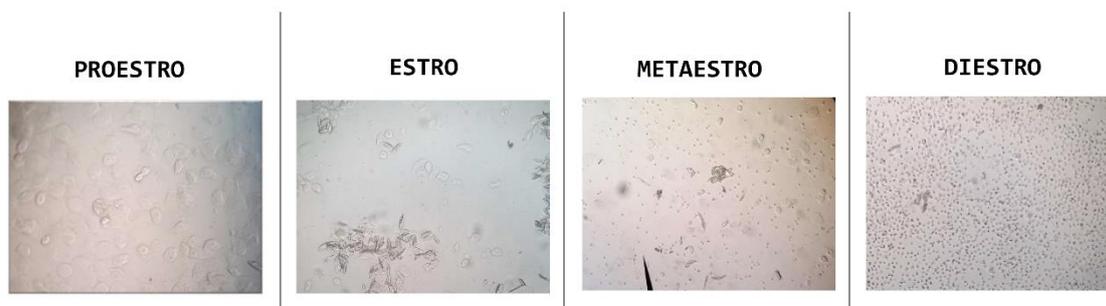


Figura 3.3: Microfotografías representativas de los tipos celulares presentes en los estadios del ciclo estral. (Escala: 25x)

Determinación fenotípica

Mediante el estudio del ciclo estral, que nos permitió un seguimiento individual de cada animal, fue posible definir su fenotipo (ovulatorio regular, ovulatorio irregular o anovulatorio), basado en la progresión del ciclo estral (Fig. 3.4).

Los animales fueron clasificados según la regularidad o no del ciclo (Karim et al., 2003):

- **Animales ovulatorios regulares:** el ciclo estral tiene una duración entre 4 y 6 días, donde se ve una correcta progresión de Proestro, Estro, Metaestro y Diestro. Se puede observar el pasaje de dos estros consecutivos a lo largo del período evaluado de 15 días.
- **Animales ovulatorios irregulares:** El ciclo estral tiene una duración mayor a 6 días y/o no se observa una correcta progresión a lo largo del mismo de Proestro, Estro, Metaestro, Diestro. Se puede observar el pasaje de dos estros consecutivos a lo largo del período evaluado de 15 días.
- **Animales anovulatorios:** Los animales permanecen en los estadios de Metaestro y/o Diestro o una combinación de estos donde se ven los tres tipos celulares (3TC), sin poder observarse una progresión del ciclo ni pasaje por Estro.

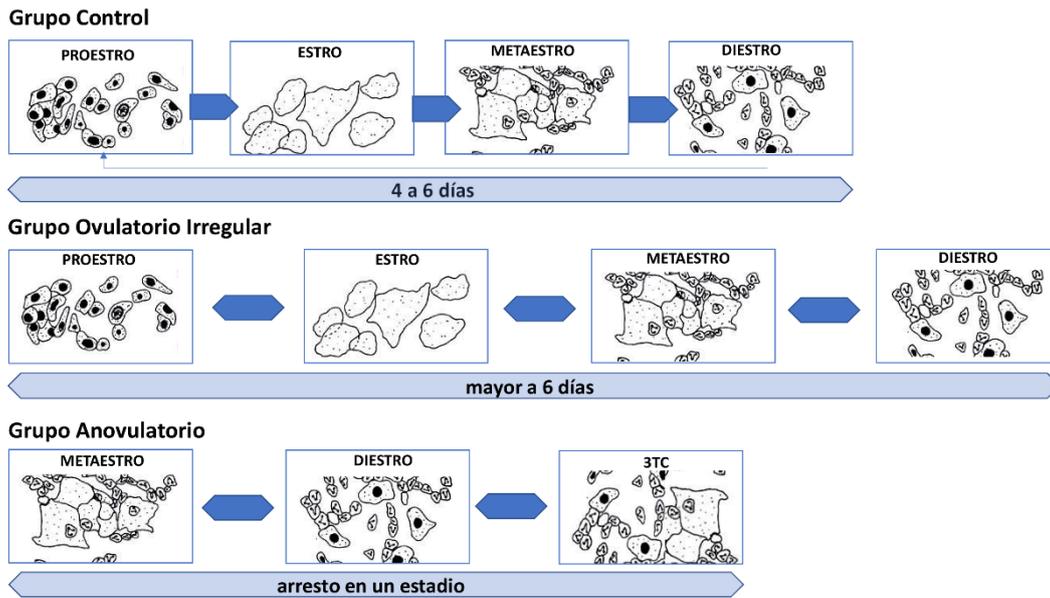


Figura 3.4: Esquema representativo de los tipos de ciclos estrales encontrados y criterios utilizados para la determinación de los fenotipos. El grupo control posee un ciclo estral regular con duración de 4 a 6 días. El grupo ovulatorio irregular puede presentar una duración mayor a 6 días o una incorrecta progresión de los estadios. El grupo anovulatorio se mantiene arrestado en metaestro y/o diestro.

Modificado de: biologydiscussion.com

Obtención de tejidos

Los animales en el primer diestro a partir de los 90 días de edad fueron anestesiados en una cámara saturada de dióxido de carbono (CO₂) y posteriormente decapitados. Se colectó la sangre y se aisló el suero por centrifugación a 1000 g durante 15 minutos, fraccionado y conservado a -80°C hasta su utilización. Se extrajo útero que también fue almacenado a -80°C hasta su utilización, a excepción de ciertas muestras por grupo del cual un cuerno uterino fue inmediatamente colocado luego de la disección en una solución de paraformaldehído al 4% (v/v).

Estudios histológicos y morfométricos

Morfología del tejido por técnica de Hematoxilina-Eosina

Para los análisis de la morfología ovárica 5 úteros de cada grupo experimental previamente fijados en paraformaldehído al 4% (v/v), se deshidrataron e incluyeron en parafina. Brevemente, los tejidos se sumergieron en etanol al 70%, 3 veces por 10 minutos, luego en etanol 90% 2 veces por 20 minutos y en etanol 100% 3 veces por 30

minutos. Luego, se sumergieron en xileno 3 veces por 20 minutos. Posteriormente fueron embebidos en parafina a 58°C. A continuación, las muestras en parafina fueron cortadas consecutivamente (5 µm de espesor) y colocadas en portavidrios positivados (Termo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Los cortes fueron desparafinizados y rehidratados. Posteriormente, los mismos fueron coloreados con hematoxilina y eosina para poder determinar las diferentes estructuras uterinas. Las muestras coloreadas con hematoxilina y eosina fueron observadas al microscopio (Amscope MU1000) y fotografiadas mediante la utilización del software AmScope 3.7 (United Scope LLC). Se realizó un conteo glandular y clasificación según agrupamiento de estas. A su vez, se realizó el estudio morfométrico de todas las estructuras presentes en el útero, como así de su grosor total a través de la utilización de las herramientas de medición del software AmScope 3.7 (United Scope LLC).

Inmunohistoquímica

Para la inmunolocalización de proteínas en el tejido uterino los cortes fueron desparafinados y rehidratados a través de soluciones de alcohol. Luego, los portavidrios se sumergieron en buffer sodio citrato (citrato de sodio 10 mM, pH 6.0) a 95°C por 40 minutos para la recuperación antigénica (IHC WORLD, Woodstock, MD, USA). Los portavidrios fueron sumergidos en 0.5% de Triton X-100 para permeabilizar el tejido.

Luego, las muestras se bloquearon con 5% de suero normal de caballo (normal horse serum, NHS 2.5% ImmPRESS, Vector Laboratories) por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó la incubación con el anticuerpo diluido en NHS (Tabla 3.1) toda la noche (ON) a 4°C o 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda, según el caso. Luego, se retiró el anticuerpo, se realizaron lavados en buffer fosfato salino (PBS) y buffer fosfato salino conteniendo 0.1% de Tween 20 (PBST) y se bloqueó la actividad de peroxidasa endógena en una solución 3% (v/v) de peróxido de hidrógeno por 20 minutos. Finalmente, se realizaron lavados en PBST y PBS, y se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario proteína recombinante del rábano (HRP) (ImmPRESS HRP Anti-Mouse IgG Reagent or Anti-Rabbit IgG Reagent, Vector) por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron lavados con PBST y el inmunocomplejo se detectó luego de incubar los cortes con una solución de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (ImmPACT DAB, Vector). Para la realización de los controles

negativos, se utilizó suero normal de caballo (NHS 2.5%, Vector) en lugar de los anticuerpos primarios. Las muestras fueron observadas al microscopio (Amscope MU1000) y fotografiadas mediante la utilización del software AmScope 3.7 (United Scope LLC).

Anticuerpo	Marca	Número de Catálogo	Dilución
Ciclooxigenasa-2	Abcam	Ab15191	1:200
Receptor de Andrógenos	Proteintech	22089-1-AP	1:100
p27 ^{kip1}	BD	610242	1 µg/ml
PCNA (P10)	Santa Cruz	Sc-56	1:400
PPAR γ	Abcam	Ab209350	1:100
Fosfo Histona H3	Millipore	06-570	1:200

Tabla 3.1: Lista de anticuerpos utilizados para inmunohistoquímica.

Evaluación semicuantitativa por HScore

Para la evaluación inmunohistoquímica se eligió el análisis semicuantitativo llamado HScore (HS: histology score) descrito por Lessey (Lessey et al., 1992, 1996). El valor del HScore corresponde a: $\sum Pi (i + 1)$, donde Pi es el porcentaje de células marcadas positivamente e i es la intensidad de esa marca en una escala del 1 al 3 (Siendo 1 =baja intensidad; 2 = mediana intensidad; and 3 = alta intensidad) y el conteo de marca positiva fue realizado en un mínimo de 1000 células por muestra, en diez campos al azar.

Determinación de niveles proteicos

Extracción de proteínas

Se homogeneizó el tejido uterino en buffer de lisis y se preparó para la extracción proteica. El buffer de lisis contenía Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), 150 mM NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA.), 0.5% NP-40 (Sigma), 1 mM PMSF (Sigma), 1 µg/ml pepstatina (Sigma), 2 µg/ml aprotinina (Sigma), 2 µg/ml leupeptina (Sigma), 1 mM DTT, 1 mM ortovanadato de Sodio, (Sigma) y 50 mM NaF (Sigma). Este buffer fue añadido a 50 mg de tejido uterino durante 30 minutos a 4°C y homogeneizado utilizando un homogeneizador manual. Luego, el lisado uterino fue centrifugado a 14000 g por 20 minutos a 4°C. De lo obtenido, el pellet fue descartado y el sobrenadante fue extraído y

utilizado para la cuantificación proteica, mediante el método del ácido bicinónico (BCA; Pierce, Rockford, IL, USA). Las muestras fueron fraccionadas y almacenadas a -20°C hasta su utilización en la técnica de Western Blotting (WB).

Corrida electroforética

Las muestras fraccionadas se disolvieron en solución desnaturizante (buffer de carga y DTT) y se calentaron a baño maría a 95°C durante 5 min. Se sembraron 20 µg de proteína por cada muestra en un gel de poliacrilamida al 12% o 10% (TGX-stain free™ FastCast™, Bio-Rad). La electroforesis se realizó a voltaje constante (200 Volts) por 40 minutos. Además de las muestras de interés se sembró un marcador de peso molecular de proteínas (Precision Plus Protein™ Standards, 10-250 kDa, Bio-Rad). Luego de la corrida electroforética, los geles TGX stain-free se activaron mediante luz ultravioleta en el sistema ChemiDoc™ MP Imaging (Bio-Rad).

Transferencia

Las proteínas separadas luego de la corrida electroforética se transfirieron a membranas de PVDF (Bio-Rad) previa activación con etanol 95% durante un minuto, mediante transferencia semi-seca, durante 7 minutos, utilizando el sistema Trans-Blot® turbo™ (Bio-Rad) y siguiendo las instrucciones del proveedor. Luego de la transferencia, se obtuvo una imagen de la membrana la cual representa la carga total de proteínas, que se utiliza posteriormente para la cuantificación. Además, para verificar que la transferencia haya sido correcta, se obtuvo una imagen del gel post-transferencia.

Inmunodetección de proteínas de interés

Las membranas fueron incubadas por 60 minutos en TBST (buffer tris salino TBS, tween 20 0.1% v/v,) conteniendo leche descremada al 5% (p/v) a temperatura ambiente con agitación suave para bloquear las uniones inespecíficas. Luego, se realizaron lavados con TBST a fin de eliminar el exceso de leche. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario de interés (Tabla 3.2) diluido en TBST con leche descremada 5% (p/v). Para el caso de proteínas fosforiladas, los anticuerpos fueron diluidos en 5 % p/v de seroalbúmina bovina (BSA), durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, las membranas fueron lavadas con TBST, 5 veces por 5 minutos, seguido de una incubación

con anticuerpo secundario (Tabla 3.2) IgG de cabra anti-conejo (Bio-Rad) o conejo anti-ratón (Jackson Laboratories), según anticuerpo primario utilizado ligado a HRP por 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Luego, el exceso de anticuerpo fue retirado de las membranas mediante lavados con TBST y, a continuación, se las incubó con reactivos de detección de quimioluminiscencia (ECL) (Clarity™ Western ECL Substrate, Bio-Rad). Las bandas inmunoreactivas se determinaron usando un analizador de imágenes ChemiDoc™ MP Imaging (Bio-Rad). La intensidad de las bandas fue analizada empleando el programa Image Laboratory™ Software (Versión 6.0, Bio-Rad). Al cuantificar, la intensidad de banda de cada proteína fue normalizada al total de proteínas corridas en cada muestra para, de esta manera, ajustar los cálculos en caso de carga de volumen desigual o errores de transferencia.

Anticuerpo	Marca	Número de Catálogo	Dilución
Akt 1/2/3	Cell Signaling	2920	1:2000
Receptor de Andrógenos	Proteintech	22089-1-AP	1:1000
Aromatasa	Santa Cruz	sc-30086	1:500
Bax	Santa Cruz	sc-20067	1:500
Bcl-2	Santa Cruz	sc-5509	1:500
Caspasa 3	Cell Signaling	9662	1:1000
Ciclina-D1	Santa Cruz	sc-450	1:500
Ciclina-E	Santa Cruz	sc-247	1:500
Ciclooxigenasa-2	Abcam	Ab15191	1:2000
Receptor de Estrogenos- α	Santa Cruz	SC542	1:1000
ERK 44/42	Cell Signaling	4370	1:1000
Receptor de Estrogenos- β (H-150)	Santa Cruz	sc-8974	1:1000
p21 ^{waf/cip}	Cell Signaling	2946	1:3000
p27 ^{kip1}	BD	610242	1:4000
PARP	Cell Signaling	9542	1:1000
PPAR γ	Abcam	Ab209350	1:1000
NFKB	Cell Signaling	8242	1:1000
Fosfo Akt Ser (473)	Cell Signaling	4058	1:1000
Fosfo Akt Thr (308)	Cell Signaling	4056	1:1000
Fosfo CDK-2	Cell Signaling	2561	1:1000
Fosfo ERK 44/42	Cell Signaling	9106	1:2000
Receptor de Progesterona (H190)	Santa Cruz	sc-7208	1:1000
Survivina	Santa Cruz	sc-17779	1:500
Goat Anti-Rabbit IgG-HRP	Bio-Rad	170-6515	1:10000
Goat Anti-Mouse IgG-HRP	Jackson	115-035-003	1:8000

Tabla 3.2: Lista de anticuerpos utilizados para WB.

Determinaciones séricas

Se realizó la medición en suero a 90 días de edad, de las siguientes hormonas: hormona luteinizante (LH), hormona folículo estimulante (FSH), testosterona, estradiol y progesterona, como así también de los niveles de glucosa e insulina, calculándose el índice HOMA-IR (índice homeostático de IR).

Determinación de LH y FSH por radioinmunoensayo (RIA)

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

Análisis de T por RIA

Los niveles de T fueron determinados por RIA específico, según se describió previamente en el laboratorio (Amalfi et al., 2012). Brevemente, muestras séricas de 6 ratas de cada grupo se extrajeron con el mismo volumen de dietil éter por 3 veces. Los extractos fueron colectados y evaporados en una bomba de vacío y almacenados a -80°C hasta la realización del RIA. Luego, los reactivos y las muestras se reconstituyen en el buffer de RIA (Tris HCl 0.05 M, NaCl 0.1 M, gelatina 0.1 %, azida sódica 0.1 %, pH=8). Tanto las muestras patrones como las muestras a ensayar (100 µl) se incubaron a 4°C ON con 200 µl del anticuerpo anti-T y 100 µl del metabolito marcado con tritio-[2,4,6,7,16,17-3H] T, 250 µCi, (Amersham Corporation, Arlington Heights, USA.). Se utilizó para separar las uniones específicas una suspensión de carbón activado-dextrán (carbón 1%, dextrán 0.1 % en buffer RIA) y centrifugación a 2000 g por 15 minutos a 4°C en centrífuga refrigerada (Sorvall RC-5B). El sobrenadante de centrifugación fue recogido en viales conteniendo líquido de centelleo, y la radioactividad se cuantificó en un contador de centelleo líquido beta. La sensibilidad del anticuerpo para E₂ fue de entre 5–10 pg/tubo, y entre 2–5 ml de suero. Las variaciones intra e inter-ensayo fueron de 5.0 y 10.0 %, respectivamente. El rango de utilidad del ensayo de la T fue de 25–1600 pg. Las variaciones intra e inter-ensayo fueron de 7.5 y 15.1 respectivamente, y la reacción cruzada entre T y DHEA fue < 0.01 pg. Los resultados se expresaron como pg T/ml suero.

Análisis de estradiol por ELISA

Los niveles séricos de estradiol fueron cuantificados por un inmunoensayo COBASE realizando un ensayo de inmunolectroluminiscencia (ECLIA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los coeficientes intra e inter-ensayo fueron de 3.93 % y 7.08 %, respectivamente. Los resultados se expresaron en ng E₂/ml.

Análisis de progesterona por RIA

Los niveles de progesterona en suero fueron cuantificados por radioinmunoensayo (Martinez Calejman et al., 2011). Muestras séricas se extrajeron 2 veces con ciclohexano. En cada extracción se separó la fase orgánica y se llevó a evaporación con calor. Los esteroides se resuspendieron en 100 µl de PBS. Se agregaron a las muestras 100 µl de la progesterona marcada con tritio y 100 µl de la dilución apropiada del anticuerpo anti-progesterona. Las muestras se incubaron a 4°C durante toda la noche, luego se agregó 200 µl de carbón/dextrano y se centrifugaron a 3200 rpm durante 15 minutos. Una alícuota del sobrenadante fue contada en un contador de centelleo líquido. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron de 10.9 % y 12.8 %, respectivamente. Los valores se expresaron en ng de progesterona /ml de suero.

Análisis de insulina por ELISA

Los niveles basales de insulina sérica se evaluaron mediante un kit de ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante (Abcam Insulin Human ELISA Kit). Los coeficientes de variación intra. e inter-ensayo fueron 10 y 12 %, respectivamente.

Análisis de glucosa basal

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

Análisis de Proteína C reactiva

Los niveles basales de proteína C reactiva sérica fueron medidos en placa. La proteína se detecta en suero por reacción con un anticuerpo específico adsorbido sobre un soporte inerte de látex. Ésta se une a los anticuerpos adsorbidos produciendo la

aglutinación de las partículas de látex. La realización de este se produjo siguiendo las instrucciones del fabricante (Wiener lab Kit PCR-látex directo).

Determinación de RNA mensajero en tejidos

Aislamiento de RNA

El contenido total de RNA mensajero de los úteros de ratas de los distintos tratamientos se aisló mediante la utilización de RNAzol RT (Molecular Research Center, Inc. Cincinnati, OH, USA.) siguiendo el protocolo correspondiente. Brevemente, el 100 mg de tejido se homogeneizó en 1 ml de RNAzol con homogeneizador eléctrico. Al homogenato se le agregaron 400 µl de agua libre de RNAsas, se agitó durante 15 segundos y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000 *g* durante 15 minutos; la fase acuosa obtenida contiene el RNA solubilizado.

El sobrenadante (fase acuosa) se transfirió a un nuevo tubo para precipitar el RNA con 400 µl de etanol 75 % centrifugando a 12000 *g* durante 8 minutos. A continuación, se lavó por duplicado con etanol 75% el precipitado, centrifugando en cada paso a 8000 *g* durante 3 minutos. El RNA obtenido en el pellet se re suspendió en 30 µl de agua libre de RNAsas. Se cuantificaron las muestras en NanoDrop (Thermo Fisher), el cual mide la absorbancia a 260 nm y evalúa la pureza por la relación de absorbancias 260/280 nm. Posteriormente, las muestras fueron fraccionadas y almacenadas a -70 °C para posterior utilización.

Obtención de DNAC

A partir del mRNA total obtenido de los úteros de los grupos experimentales se obtuvo el DNAC correspondiente mediante su retrotranscripción utilizando *random primers* y Transcriptasa Reversa del Virus de Leucemia Murina Moloney (MMLV RT, Promega), siguiendo las especificaciones del productor. Brevemente, se colocó en un tubo de pcr 500 ng de ARN, y 2 µg de *random primers* (B070-40 Byodinamics) en un volumen final no superior a 14 µl. Se llevo la mezcla de RNA y *random primers* a 70°C durante 5 minutos y luego se cortó la reacción llevándolo a 4°C. Luego se aplicó un spin de manera de colectar toda la muestra en el fondo del tubo. Posteriormente se adicionaron los siguientes reactivos en el orden indicado: 5 µl de Buffer RT-MMLV 5X (Tris-HCl 250 mM; KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM y DTT 50 mM), 5 µl de una mezcla dNTPs (dATP 10 mM; dGTP

10 mM, dGTP 10 mM, dTTP 10 mM), RT-MMLV 200U y agua bidestilada hasta completar los 25 μ L. Se mezcló delicadamente y se incubó por 60 minutos a 37°C, con un paso final de 5 minutos a 4°C. Las muestras de DNAc sintetizadas se guardaron a -70°C hasta la realización de la PCR correspondiente.

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

A partir de una dilución 1:3 del DNAc sintetizado se realizaron los análisis por Real time PCR utilizando 2.5 μ L de DNAc junto con 10 μ L de solución conteniendo un mix de desoxirribonucleotidos (dNTPS) 20 mM, GoTaq Polimerasa (Promega, Wisconsin, USA.), Eva Green 20x (Biotium Hayward, CA) y primers específicos (Tabla 3.3) en un volumen total de reacción de 12.5 μ L. Los ensayos se realizaron por duplicado y se incluyó el control negativo de la PCR en tiempo real (en el que se omitió el DNAc molde). Los productos amplificados se cuantificaron por fluorescencia en un Rotor Gene 6000 Corbette. El programa de amplificación estándar utilizado involucró los siguientes pasos: 1) Activación: 95°C por 4 minutos; 2) Desnaturalización: 95°C por 30 segundos; 3) Hibridación: temperatura específica para cada par de primers (Tabla 3.3) por 25 segundos; 4) Extensión y lectura de datos: 72°C por 25 segundos. Los pasos 2 a 4 se repitieron 50 veces.

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

Dónde:

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

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

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

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

Gen	Secuencia De Primers Utilizada	Temperatura De Pegado (°C)
<i>L32 F</i>	TGGTCCACAATGTCAAGG	58
<i>L32 R</i>	CAAAACAGGCACACAAGC	
<i>Ncor1 F</i>	TATCGGAGCCATCTCCCAC	60
<i>Ncor1 R</i>	ACTTGGGTATCCTGGGGTTG	
<i>Cuznsod F</i>	GTCGTCTCCTTGCTTTTTGC	62
<i>Cuznsod R</i>	TGCTCGCCTTCAGTTAATCC	
<i>Tnfa F</i>	GATCGGTCCCAACAAGGAGG	62
<i>Tnfa R</i>	CTTGGTGGTTTGCTACGACG	
<i>Il10 F</i>	TGAAAAATTGAACCACCCGGC	62
<i>Il10 R</i>	CCAAGGAGTTGCTCCCGTTAG	
<i>Nfkb F</i>	GAAGAGGATGTGGGGTTTCA	62
<i>Nfkb R</i>	CTGAGCATGAAGGTGGATGA	
<i>Pparg F</i>	TTTTCAAGGGTGCCAGTTTC	60
<i>Pparg R</i>	GAGGCCAGCATGGTGTAGAT	
<i>Cox-2 F</i>	ATCCTGCCAGCCAGCTCCACCG	62
<i>Cox-2 R</i>	TGGTCAAATCCTGTGCTCATACAT	

Tabla 3.3: Primers utilizados para PCR.

Evaluación del balance oxidante/antioxidante

Índice de peroxidación lipídica por cuantificación de malondialdehído (MDA)

Los radicales libres producidos en las células actúan provocando la ruptura de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares. Este tipo de reacciones tienen entre

sus subproductos al malondialdehído (MDA). Es así, que la concentración de este compuesto puede ser tomada como un indicador de peroxidación lipídica (Buege y Aust, 1978). El MDA es capaz de combinarse con el ácido tiobarbitúrico (TBA) formando un reactivo de color que puede cuantificarse a 535 nm en espectrofotómetro, permitiendo estimar de esta manera la concentración de MDA.

Se evaluó la concentración de MDA en tejido hepático. El tejido uterino (50mg) fue homogeneizado en ácido tricloroacético (TCA) 0.5% (p/v) con un homogeneizador UltraTurrax a 4°C. El homogenato fue centrifugado a 10000 g durante 10 min a 4°C. Se recogió el sobrenadante y se lo fraccionó. Se realizó una curva de calibración de MDA, cuyo rango de concentración varió desde 0.0125 – 24 mM. Luego, se incubaron 350 µl de las distintas concentraciones de la curva o las muestras, con 650 µl de TBA 0.67% p/v (TCA 15% p/v, TBA 0.375% p/v, HCl 0.25 N) por 20 minutos a 100°C. La reacción se detuvo por inmersión en hielo, leyéndose la absorbancia a 535 nm dentro de los siguientes 5 minutos. Se realizó una curva patrón de MDA, y los resultados se expresaron como µmoles de MDA/mg de tejido.

Determinación del contenido total del metabolito antioxidante glutatión (GSH)

El método utilizado aquí para la determinación del contenido de GSH (Tietze, 1969) se basa en la reacción de reducción del ácido 5,5,-ditiobis-2 nitro benzoico (DTNB), llevada a cabo por el glutatión reducido (GSH), en medio reductor (Fig. 3.5). Al reducirse, el DTNB forma un compuesto coloreado, el 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB) que es posible cuantificar a 412 nm. Para medir el glutatión total, se agrega glutatión reductasa (GR) al medio, enzima que cataliza el pasaje de glutatión oxidado (GSSG) a su forma reducida. Se midió la concentración de GSH en tejido hepático. Brevemente, el tejido uterino (50mg) fue homogeneizado en TCA 0.5% (p/v) con un homogeneizador UltraTurrax a 4°C y posteriormente el homogenato fue centrifugado a 10000 g por 10 min a 4°C en centrífuga Sorvall. Luego, se colocaron 900 µl de buffer fosfato 50 mM, 100 µl de muestra, 50 µl de NADPH, 20 µl del reactivo de Ellman (DTNB) y, en último lugar, 20 µl de GR. Considerando la linealidad de la reacción, se registró la absorbancia a cada minuto, durante los primeros 6 minutos a fin de determinar la pendiente de la reacción. Con el objetivo de cuantificar el contenido de GSH, se comparó con la pendiente de una

reacción que se incubó con una concentración de GSH conocida. Los resultados se expresaron como μ moles de GSH/mg de tejido.

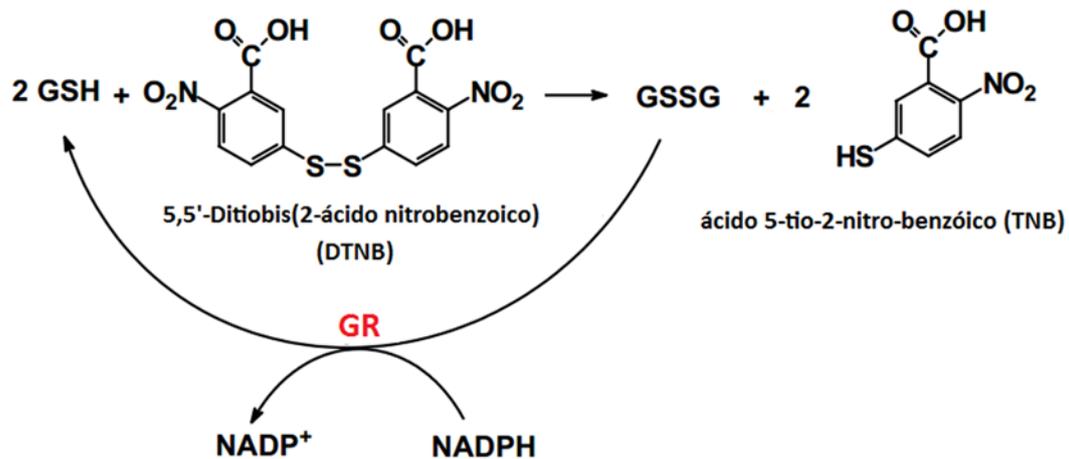


Figura 3.5: Reacción de reciclaje del GSH-GSSG en presencia de DTNB. Dos moléculas de GSH se oxidan a una molécula de GSSG y en la misma reacción se reduce el DTNB y forma TNB (compuestos coloreados amarillo). Mientras que se encuentren en exceso la enzima y el NADPH la reacción continúa. La tasa de producción de TNB se relaciona directamente con la cantidad de GSH total presente en el sistema.

Método colorimétrico de detección de la apoptosis (TUNEL)

El estudio de la fragmentación del DNA fue realizado mediante el sistema DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System (Promega, WI, USA). Este consiste en la incorporación de nucleótidos marcados con HRP al extremo 3' OH de la molécula de DNA mediante la enzima deoxinucleotidil transferasa (TdT), con lo cual se puede detectar la presencia de fragmentación del DNA. Brevemente, secciones de tejido uterino fueron desparafinadas en xileno y rehidratadas gradualmente con etanol (100, 95, 85, 70 and 50 %). Luego, los cortes fueron lavados con una solución de NaCl 0.85 % (p/v) y fijados en 4 % de paraformaldehído por 15 minutos. Posteriormente a los lavados de PBS, los cortes histológicos fueron tratados con proteinasa K (20 μ g/ml) por 5 minutos, lavados en PBS por 5 minutos y vueltos a fijar en 4 % de paraformaldehído. Luego, fueron incubados a 37°C por 30 minutos en cámara húmeda, con la mezcla de la enzima TdT, y nucleótidos biotinilados. La reacción fue finalizada al sumergir los cortes histológicos en buffer 2X SSC (SSC: Saline sodium citrate buffer) por 15 minutos. Posteriormente, los cortes fueron lavados en PBS por 5 minutos a temperatura ambiente para luego ser bloqueados con 3% de peróxido de hidrógeno por 20 minutos a temperatura ambiente. Luego, de tres

lavados con PBS, las muestras fueron incubadas con estreptavidina conjugada con HRP por 30 minutos a temperatura ambiente. Los controles negativos fueron incubados con una solución sin TdT. Luego se visualizó el complejo de estreptavidina-HRP unido al extremo 3' incubando con diaminobencidina de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Finalmente, se montaron las secciones y se analizaron con un microscopio óptico.

Estudios de apareo, fertilidad y capacidad materna

Se estudió la fertilidad por vía natural en hembras adultas de 90 días de edad, pertenecientes a los grupos PH y control. Las hembras fueron colocadas con un macho adulto. Durante la mañana subsiguiente de haber colocado a la hembra con un macho adulto, se determinó la receptividad de las hembras al apareo mediante la observación de la presencia del tapón vaginal y de la toma de extendidos vaginales y posterior observación al microscopio (con el objetivo de visualizar la presencia de espermatozoide).

El **índice de apareo** se calculó como el número de hembras con tapón vaginal o presencia de espermatozoides en el extendido vaginal en relación al total de hembras analizadas en cada experimento. También se calculó el **tiempo de apareo** que se determinó como el tiempo que tardan las hembras en presentar el tapón vaginal o presencia de espermatozoides en el extendido vaginal.

Se determinó la fertilidad de las hembras mediante corroboración de la preñez y nacimiento de crías vivas a los 21 días posteriores a la presencia del tapón vaginal. El **índice de fertilidad** se calculó como el número de hembras que lograron parir crías vivas en relación al total de hembras analizadas en cada experimento.

Los animales fueron mantenidos en apareo durante una semana. Ante la presencia de espermatozoides en el extendido vaginal o la observación del tapón vaginal, la hembra se separó en una jaula individual y se le registró el peso y la glucosa en los días 0, 7, 14 y 20 de gestación.

Del total de hembras preñadas, a día 14 de gestación, un grupo de hembras preñadas pertenecientes a los grupos control y PH, fueron sacrificadas. Posterior a la disección, se registró la cantidad de sitios de implantación con embriones implantados y sitios reabsorbidos. El otro grupo de hembras C y PH, dio a luz y se registró la cantidad de crías

nacidas. Se determinó la **capacidad materna** sobre el cuidado de sus crías en el postparto mediante la verificación de la supervivencia de las mismas durante las 96 horas posteriores al nacimiento. Además, se midió el peso de las crías al nacer, a día 3 y a día 6, donde también fueron sexadas mediante observación de la papila genital y la medición de la distancia anogenital.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa InfoStat (<http://www.infostat.com.ar>) e InStat program (GraphPad software, San Diego, CA, EE. UU.). Se aplicó la prueba de Shapiro-Wilks para testear la distribución normal de las muestras y la prueba de Levene para analizar la homogeneidad de varianza. En los casos en que alguno de los supuestos no se cumplió, los datos se transformaron a Log10 y se analizaron de dicha forma (previa corroboración de normalidad y homocedasticidad de la variable a analizar). En dichos casos, las variables volvieron a re-transformarse a la variable original para realizar los gráficos. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) con test post-hoc de Tukey para comparar entre los tres fenotipos o análisis por test de t-Student, en el caso de comparaciones entre dos grupos. Los porcentajes fueron analizados por Prueba de Chi-cuadrado (χ^2), como fue el caso de las etapas del ciclo estral. Para el caso de las proteínas clivadas, se realizó un ANOVA de dos factores con test post-hoc de Bonferroni. Para el análisis de los estudios de fertilidad, los índices de apareo y fertilidad fueron analizados como datos categorizados, mediante el uso de tablas de contingencia y posteriormente analizados por la Prueba de Chi-cuadrado (χ^2). En la leyenda de cada figura, de la sección resultados, se indican las pruebas estadísticas utilizadas. Los resultados fueron expresados como las medias \pm la desviación estándar (D.E.) o error estándar (S.E.M).

IV. Resultados

Capítulo 1: Caracterización del modelo murino de hiperandrogenización prenatal

Caracterización del modelo animal

Para la caracterización del modelo de hiperandrogenización prenatal nos propusimos realizar un seguimiento de los animales desde la gestación hasta la adultez, teniendo en cuenta y evaluando diferentes parámetros, considerando las posibles alteraciones que pueden presentarse en su crecimiento y hasta su adultez ya sean metabólicas, hormonales o morfológicas.

Resultados

Evaluación de camadas

A las madres en gestación se les realizó un seguimiento hasta el nacimiento de sus crías. Se evaluaron los siguientes parámetros: duración de la gestación, cantidad de crías totales y, dentro de ésta, la proporción de machos y hembras por camada.

De los resultados obtenidos no se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el hiperandrogenizado prenatalmente (PH), respecto de la duración de la gestación de la madre, el tamaño de la camada obtenida, ni en relación con la cantidad de crías hembras y machos nacidos por camada (Tabla 4.1).

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

Tabla 4.1: Duración de la gestación y numero de crías promedio por camada de los grupos control e hiperandrogenizado prenatalmente (PH). n=19 camadas por tratamiento. No se detectaron diferencias significativas; $p>0.05$ para todos los casos estudiados por test de *t-student*.

Las crías hembras fueron seleccionadas, desde el día 45 se estudió su ciclo estral y a partir de la evaluación de éste fueron clasificadas por fenotipo tanto en el comienzo como en la etapa adulta (Tabla 4.2). Estos resultados demuestran que el efecto de la

hiperandrogenización prenatal sobre el ciclo estral genera irregularidades en el mismo desde el inicio de la adultez (60 días) que permanecen hasta los 90 días. El análisis por Chi cuadrado de Pearson demostró que existe una relación entre la edad y la proporción de fenotipos presentados en el grupo PH ($p=0,0425$).

Edad	Fenotipo grupo control	Fenotipo grupo PH		
	ovulatorio regular	PH ovulatorio regular	PH ovulatorio irregular	PH anovulatorio
60 días	100 %	10-30 %	43-51%	27-39 %
90 días	100 %	8-11 %	49-50%	38-43 %

Tabla 4.2: Clasificación fenotípica de acuerdo con el ciclo estral. Porcentaje obtenido en los grupos control e hiperandrogenizado prenatalmente (PH) a 60 y 90 días. Los experimentos para la evaluación de la frecuencia de fenotipos se repitieron en tres ocasiones distintas, cada uno con camadas de $n=25$ madres. Los resultados son presentados como la media y el rango (mín.-máx.).

El grupo control, presentó un ciclo estral normal, siendo su fenotipo ovulatorio regular. El grupo PH, cuyo ciclo estral demostró ser ovulatorio regular, y que se encuentra representado por un bajo porcentaje de animales, no fue considerado para los análisis posteriores, ya que dicho grupo no presenta alteraciones en el ciclo estral, siendo ésta una de las características esperadas en los modelos SOP de animales de laboratorio.

De aquí en adelante utilizaremos la siguiente nomenclatura al mencionar al grupo PH ovulatorio irregular: **PH ov**, mientras que el grupo PH anovulatorio será mencionado como **PH anov**.

Curva de crecimiento

Se construyó la curva de crecimiento para todas las crías hembras clasificadas según el fenotipo que presentan en el estadio adulto. Los resultados obtenidos muestran que no se ve alterado el patrón de ganancia de peso desde el momento del destete hasta los 90 días de edad (Fig. 4.1).

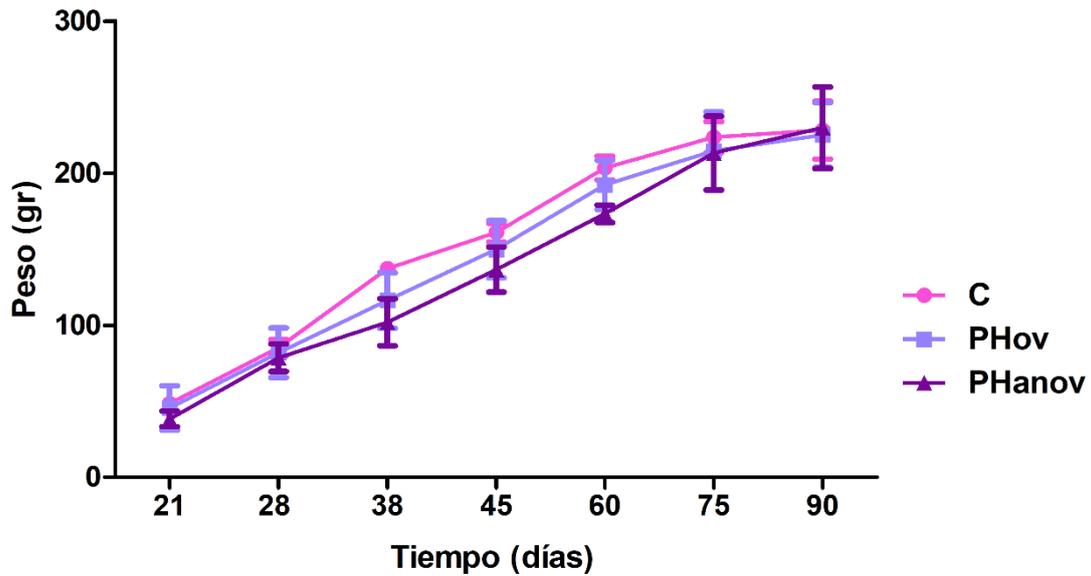


Figura 4.1: Curva de crecimiento de los distintos grupos desde los 21 días hasta los 90 días. ANOVA de medidas repetidas, $p > 0.05$ entre tratamientos para cada tiempo analizado $n = 30$ ratas por grupo.

Relación peso uterino sobre peso corporal

Para evaluar si el exceso androgénico tendría efectos sobre el peso uterino, se determinó la relación entre el peso uterino y el peso corporal (Fig. 4.2).

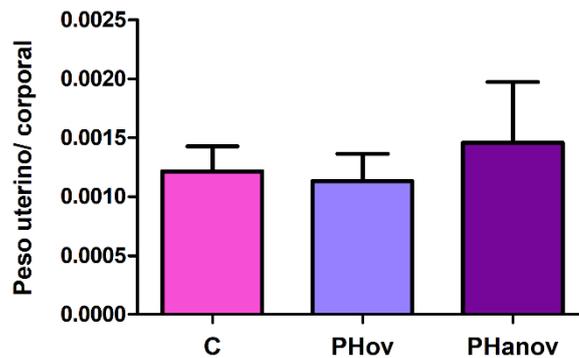


Figura 4.2: Peso uterino relativo a peso corporal a los 90 días. Cada columna representa la media \pm D.E. de grupos control e hiperandrogenizado prenatalmente (PH) $n = 10$ animales por grupo; a vs b $p < 0.05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey.

Estado metabólico

Para evaluar y determinar cómo es el estado metabólico durante la etapa adulta (90 días), se midieron parámetros relacionados con el metabolismo de la glucosa y la insulina.

Los niveles de insulina se encontraron alterados en ambos grupos PH (Fig. 4.3, A). La glucemia basal se encontró aumentada en el grupo PH ov y aún más elevada en el fenotipo PH anov (Fig. 4.3, B). Asimismo, el índice HOMA-IR se encontró elevado en ambos fenotipos PH (Fig. 4.3, C).

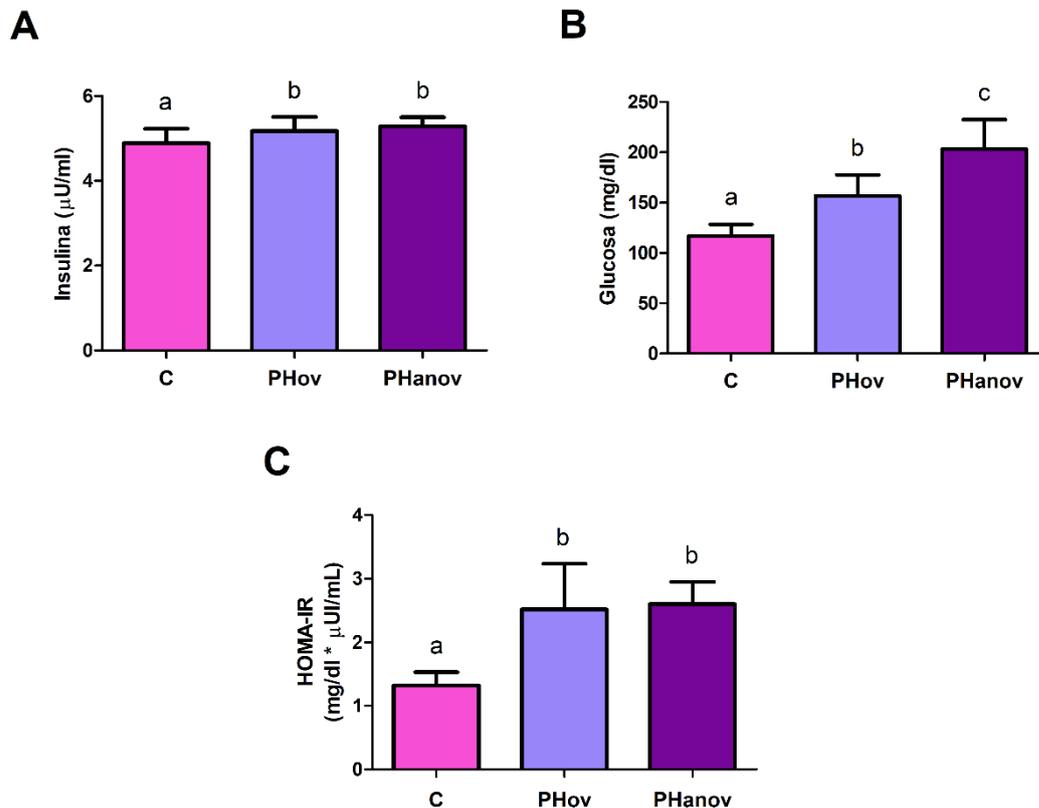


Figura 4.3: Parámetros de insulina y glucosa a los 90 días. Insulina basal (A), Glucosa basal (B) e Índice HOMA-IR (C). Cada columna representa la media \pm D.E. de grupos control e hiperandrogenizado prenatalmente (PH) de n=10 animales por grupo; a vs b $p < 0.05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey.

Estado hormonal sistémico

En lo que respecta a las gonadotropinas LH y FSH (Fig. 4.4, A y B, respectivamente) no se encontraron diferencias entre los grupos bajo estudio. El índice LH/FSH tampoco se vio afectado entre los fenotipos (Fig. 4.4, C).

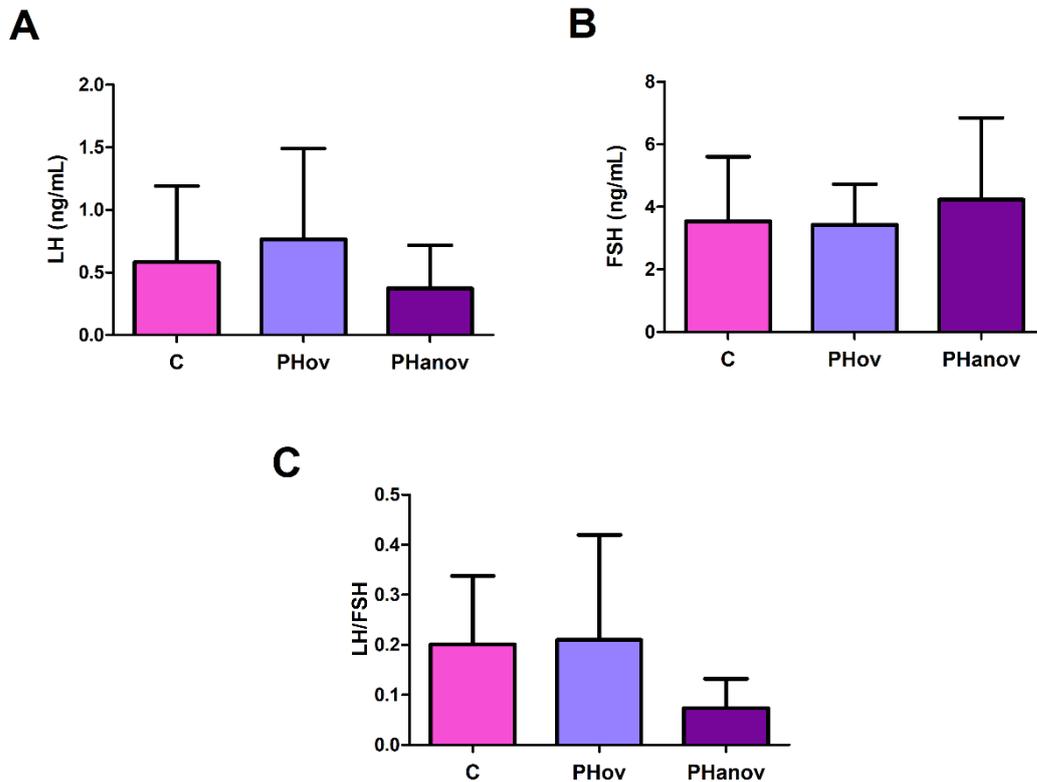


Figura 4.4: Niveles séricos de gonadotropinas séricas medidas en diestro a 90 días de edad. A) niveles de LH, B) niveles de FSH, C) índice LH/FSH. Cada columna representa la media \pm D.E. de grupos control e hiperandrogenizado prenatalmente (PH) en 7 muestras por grupo; a vs b $p < 0.05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey.

Por otro lado, se evaluó el estado de las hormonas esteroideas en suero. Los resultados mostraron que los niveles de testosterona séricos se encontraron incrementados sólo en el grupo PH anov (Fig. 4.5, A). Para el caso del estradiol, los niveles del mismo se encontraron disminuidos en ambos grupos PH (Fig. 4.5, B) y con respecto a los niveles de progesterona no se observaron diferencias entre los grupos bajo estudio (Fig. 4.5, C). Estos resultados indican la presencia de hiperandrogenismo bioquímico, medida por los niveles de testosterona, en el grupo PH anov. Por último, la relación E/P nos permitió

determinar el predominio hormonal, de E o P, al cual se encontraban expuestos los grupos bajo estudio, sin encontrarse diferencia entre los mismos (Fig. 4.5 D).

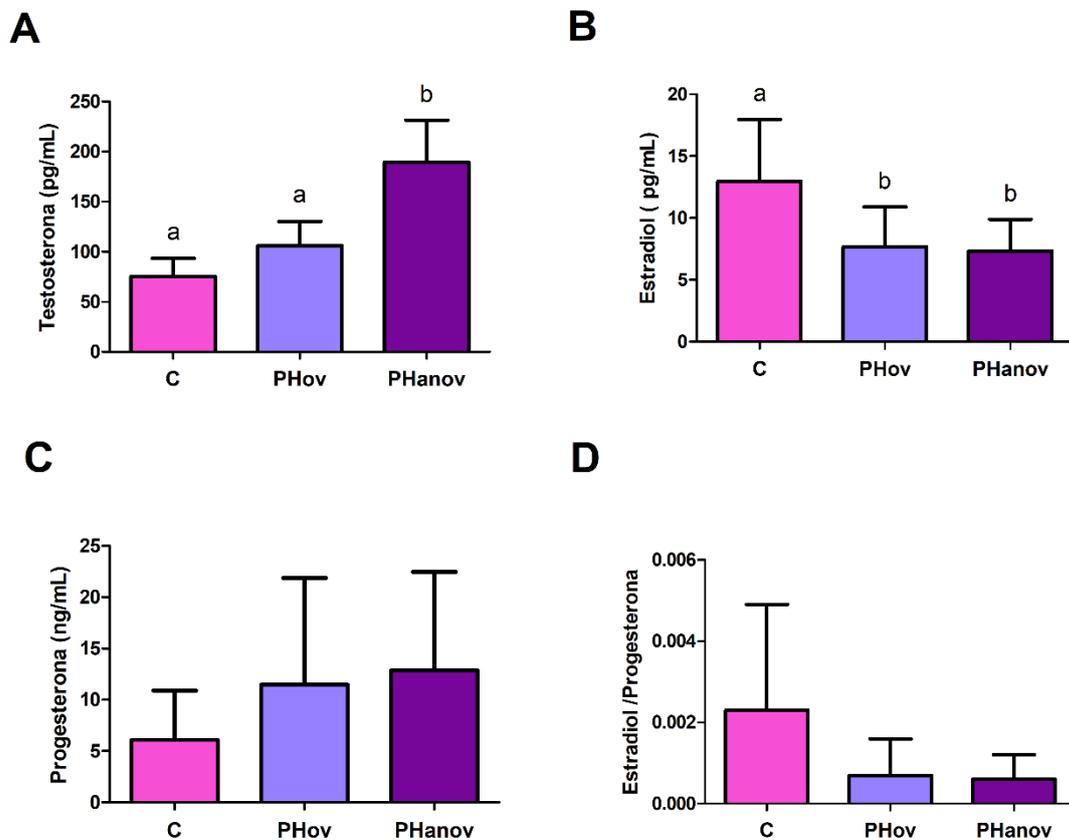


Figura 4.5: Niveles séricos de las principales hormonas esteroides gonadales medidas en diestro a 90 días de edad. Testosterona (A), Estradiol (B) Progesterona (C) e índice Estradiol/Progesterona (D). Cada columna representa la media \pm D.E. de grupos control e hiperandrogenizado prenatalmente (PH) en 7 muestras por grupo; a vs b $p < 0.05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey.

Discusión

La exposición prenatal debido a andrógenos produce programación fetal. Este fenómeno fue definido por Lucas (Lucas, 1991) como el re-ajuste fisiológico por efecto de un estímulo, en una ventana sensible del desarrollo intrauterino. Esta exposición, no solo afecta al feto en desarrollo, sino que también genera consecuencias funcionales adversas en la vida post-natal, predisponiendo así al desarrollo de patologías en la adultez (Sir-Petermann et al., 2005). Con el objetivo de emular las características del SOP, el cual se considera tiene un origen fetal, se han utilizado diferentes modelos

experimentales de exceso androgénico. En el modelo de hiperandrogenización prenatal, utilizado en este trabajo, el estímulo androgénico se inició antes de completarse la diferenciación ovárica y por ende resultó en alteraciones permanentes a largo plazo (Padmanabhan et al., 2014). Teniendo en cuenta que en trabajos previamente realizados en nuestro laboratorio (Amalfi et al., 2012) se ha demostrado que las consecuencias del efecto androgénico dependen de la dosis utilizada, para el presente trabajo, hemos utilizado la dosis de 1 mg de testosterona, que ha sido utilizada por otros autores (Wolf et al., 2002) y que como demostramos en este capítulo, conlleva a alteraciones apreciables sin afectar la capacidad materna respecto al cuidado de las crías, la proporción de crías hembra:macho, ni el desarrollo de la gestación.

A partir del seguimiento del ciclo estral iniciado desde la pubertad, observamos que debido al efecto de la hiperandrogenización prenatal los animales presentaban dos fenotipos, los cuales fueron clasificados en dos grupos. Por un lado, un porcentaje de animales presentó alteraciones en su ciclo estral, y fue denominado como ovulatorio irregular. Y, por otra parte, un menor porcentaje de animales permaneció arrestado en los estadios metaestro y/o diestro, y fue denominado como anovulatorio. Para explicar por qué bajo la misma dosis de testosterona se generan dos fenotipos diferentes en la misma camada de animales, cabe mencionar el fenómeno de plasticidad fenotípica, aunque también podría deberse a la posición intrauterina, que pueden afectar tanto a los fetos como a la placenta. El fenómeno de posición intrauterina genera variación fenotípica entre individuos adultos del mismo sexo, y se debe a la contigüidad de un animal respecto a sus hermanos/as del mismo sexo o del sexo opuesto durante el desarrollo intrauterino (vom Saal, 1981; Nonneman et al., 1992). Entre los estudios realizados sobre este fenómeno se ha reportado que un feto hembra que posee contiguamente dos fetos macho, tiene un ambiente hormonal diferente al de un feto hembra que tiene otras dos hembras adyacentes (Zielinski et al., 1991). Con respecto a la disfunción placentaria, se ha demostrado que el exceso androgénico prenatal puede alterar los niveles de enzimas esteroidogénicas expresadas por la placenta y de esta forma, condicionar el medio hormonal al que se encuentran expuestos los fetos en desarrollo (Sun et al., 2012).

Como consecuencia de la programación fetal y dado que las hormonas regulan el crecimiento fetal y el desarrollo de tejidos específicos, nos propusimos evaluar el crecimiento de los animales y analizar la curva de crecimiento corporal desde los 21 días hasta la etapa adulta (90 días); si bien estos resultados no mostraron diferencias, es decir, que la ganancia de peso no se vio modificada por un efecto de programación fetal, cabe resaltar que el estímulo androgénico podría estar afectando la diferenciación del tejido uterino *in útero*.

Teniendo en cuenta que el SOP es considerado una patología no solo de índole reproductiva sino también endocrino-metabólica, y sabiendo que el endometrio es un tejido cíclico que se encuentra bajo la acción regulatoria de las hormonas esteroidales, resulta de interés estudiar cómo podrían verse afectados los procesos de remodelación endometriales, ante alteraciones en la concentración de ciertas hormonas y proteínas.

Debido a ello, también nos focalizamos en el estudio del metabolismo de la glucosa y la insulina en la etapa adulta. Nuestros resultados revelaron que ambos fenotipos del grupo PH presentan hiperinsulinemia, hiperglucemia e insulino resistencia. Y si bien el estado metabólico se encuentra alterado, éste es independiente de la presencia de sobrepeso u obesidad ya que ambos fenotipos PH no presentan diferencias en el peso corporal respecto del grupo control (Heber et al., 2019). En este punto, cabe resaltar que nuestros resultados están en concordancia con Dunaif y colaboradores (Dunaif y Graf, 1989; Dunaif, 1997), quienes demostraron que el estado de IR es intrínseco de la programación fetal por exceso de andrógenos y no se debe a un aumento en el tejido adiposo (Kahn y Flier, 2000; Tewari et al., 2015; Jeanes y Reeves, 2017b).

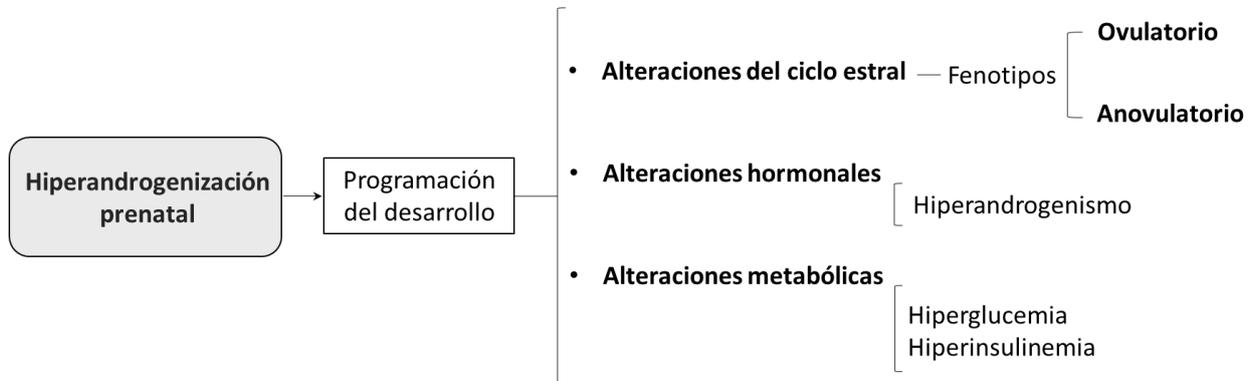
Las variaciones hormonales durante el ciclo estral se traducen en remodelaciones del tejido endometrial las cuales se producen de manera cíclica. De esta forma, durante la fase folicular ovárica el estradiol estimula el desarrollo del endometrio y por ende su proliferación celular. Posterior a la ovulación, se produce la diferenciación de las células endometriales promovida por la progesterona secretada por los cuerpos lúteos. En nuestro trabajo encontramos que si bien los niveles de las gonadotrofinas, LH y FSH, no se hallan alterados, en lo que respecta a las hormonas sexuales los grupos PH presentaron un perfil hormonal alterado. El grupo PH anov presentó altos niveles de testosterona sérica y ambos grupos PH presentaron bajos niveles de estradiol sérico.

Cabe destacar que no se encontraron diferencias en la relación sérica E/P, por lo tanto, en lo que refiere a la exposición hormonal, y ante la ausencia de un ambiente hiperestrogénico, es posible sugerir que los cambios en el tejido uterino pueden deberse a andrógenos o a una combinación entre andrógenos y estrógenos.

Por último, se ha correlacionado a la hiperinsulinemia con el hiperandrogenismo, y se ha visto que éstas se modulan entre sí generando un círculo vicioso de regulación (Barbieri y Hornstein, 1988).

De los resultados expuestos anteriormente, podemos sugerir que la hiperandrogenización prenatal trae consecuencias a nivel endocrino, reproductivo y metabólico en la vida adulta cuyo alcance trae aparejado alteraciones en la funcionalidad de varios tejidos. Si bien el presente trabajo de tesis se ha focalizado en el estudio de la fisiología uterina, cabe destacar que en nuestro laboratorio y bajo el mismo modelo animal de hiperandrogenización prenatal, se analizaron ciertos tejidos clave en el contexto de SOP, como lo son el ovario y el hígado. De estos estudios, podemos destacar que las consecuencias del hiperandrogenismo prenatal en el tejido hepático conducen a estrés oxidativo y a alteraciones en la lipogénesis, mientras que en el ovario llevan a alteraciones tanto de la foliculogénesis como de la esteroidogénesis, afectándose así la funcionalidad ovárica (Abruzzese et al., 2016, 2019). Esto resulta de importancia al momento de poner en contexto la fisiología uterina, ya que ésta se ve influenciada tanto por las hormonas ováricas como por el estado metabólico sistémico.

Resumen visual del capítulo I



Capítulo 2: Caracterización morfológica del tejido uterino

Caracterización morfológica del tejido uterino

Resultados

Análisis histomorfológico

Con el objetivo de determinar si la hiperandrogenización prenatal genera alteraciones en el estado histomorfológico uterino, se realizó, en los cortes histológicos coloreados con hematoxilina eosina, la observación y reconocimiento, de la estructura general del útero (Fig. 5.1, A-C) como así también de cada compartimento que lo conforma: lumen epitelial, glándulas, estroma y miometrio.

En particular, al observar el epitelio luminal (Fig. 5.1, D-F) que se caracteriza por conformarse de un epitelio semicolumnar, observamos en los grupos PH ov y PH anov, la presencia de múltiples capas celulares. En cuanto a la morfología celular del epitelio luminal éste presentó diferentes formas celulares desde cuboidales hasta redondeadas.

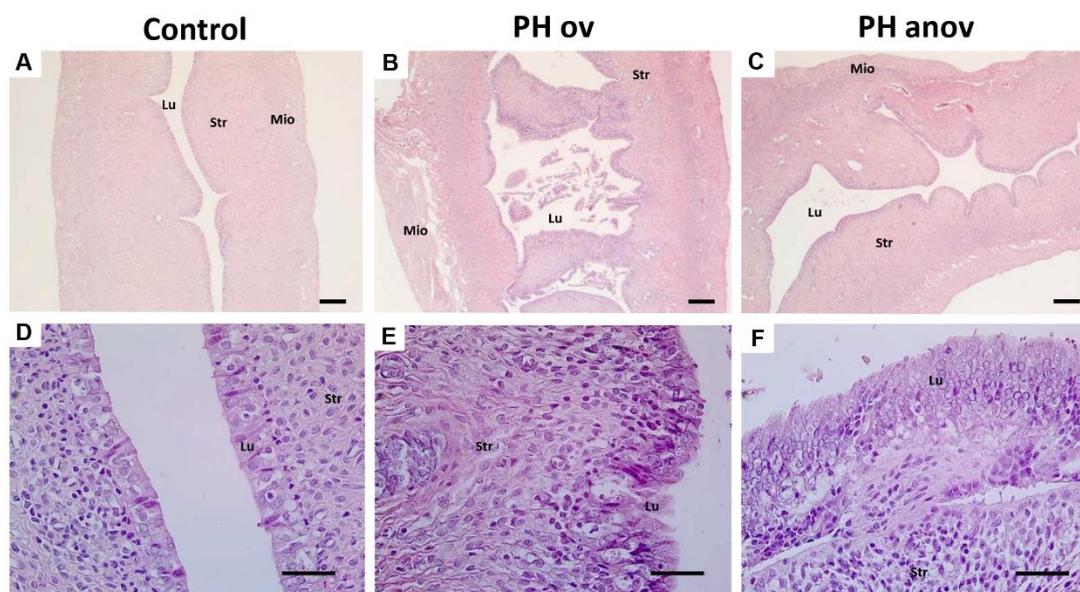


Figura 5.1: Microfotografías representativas de secciones longitudinales de tejido uterino en diestro, estructura general (A, B, C) y detalle de epitelio luminal (D, E, F) coloreadas con hematoxilina y eosina, pertenecientes a los grupos control (A, D) PH ov (B, E) y PH anov (C, F). La barra de escala representa 200 μ m. Lu, lumen epitelial; Gl, glándula; Str, estroma; Mio, miometrio.

Cabe destacar la presencia de mayor cantidad de glándulas (Fig. 5.2, B, C) y de agrupaciones glandulares (conglomerados glandulares) (Fig. 5.2, B-C, G-I) en los grupos PH ov y PH anov. Si bien no se encontró atipia celular, la presencia de glándulas quísticas dilatadas, (Fig. 5.2, E) conteniendo fluido secretorio fue encontrada en los grupos PH a diferencia del grupo control (Fig. 5.2, A, D, F).

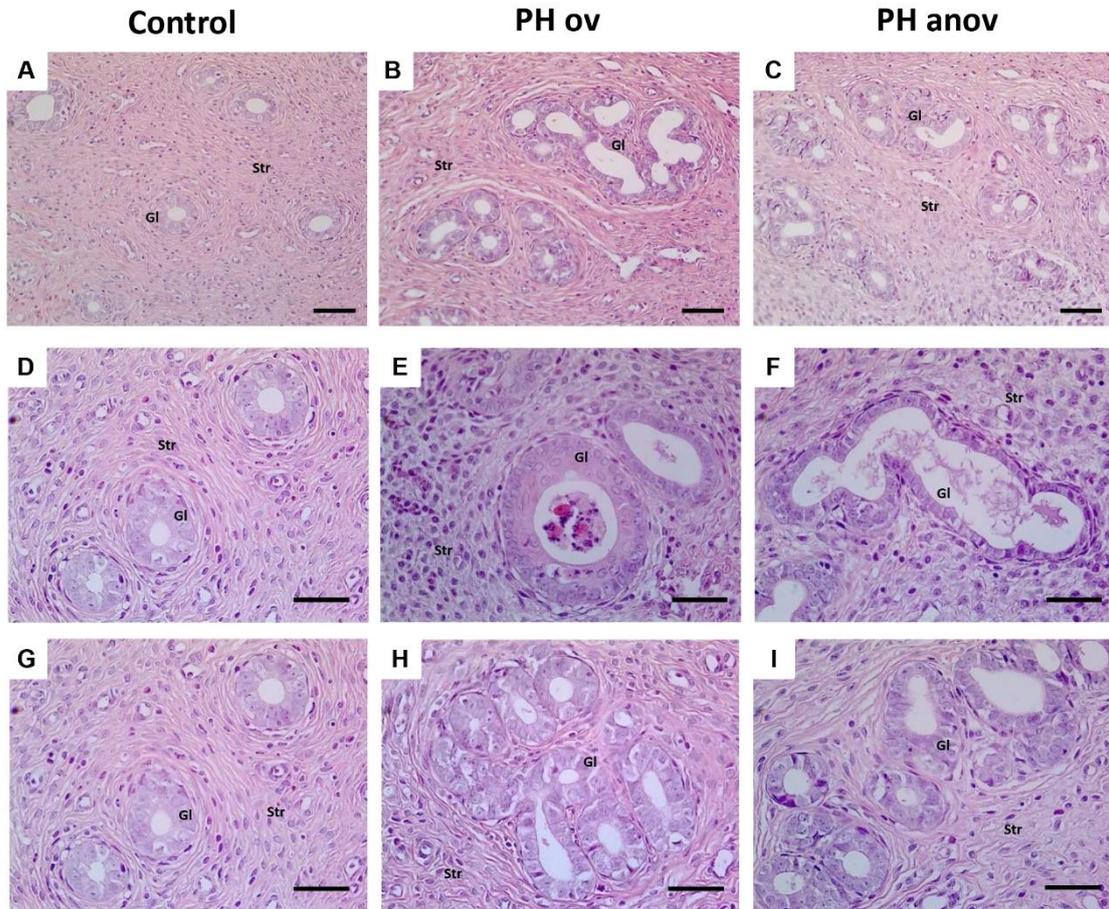


Figura 5.2: Microfotografías representativas de secciones longitudinales de tejido uterino en diestro, coloreadas con hematoxilina eosina. Detalle de estructuras glandulares pertenecientes a los grupos control (A, D, G), PH ov (B, E, H) y PH anov (C, F, I). La barra de escala representa 200 μ m (A-C) y 50 μ m (D-I). Lu, lumen epitelial; Gl, glándula; Str, estroma; Mio, miometrio.

En primer lugar, luego de su cuantificación se determinó que la cantidad de glándulas presentes en los grupos PH se encuentra incrementada (Fig. 5.3, A). Más aún, la presencia de conglomerados glandulares en los grupos PH es mayor (Fig. 5.3, B), sin embargo, la cantidad promedio de glándulas por conglomerado no difiere entre todos los grupos estudiados (Fig. 5.3, C).

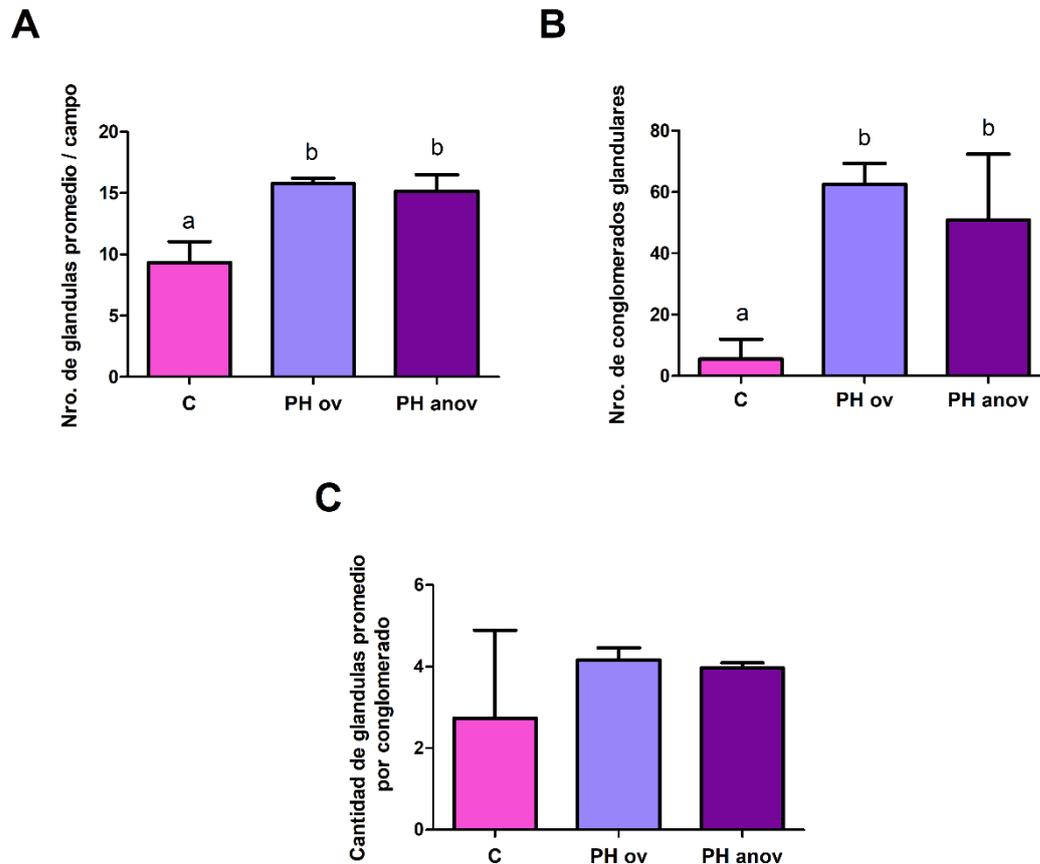


Figura 5.3: Cuantificación de estructuras glandulares en el tejido uterino en diestro. Promedio de glándulas por campo (A) Cantidad de conglomerados (B) Promedio de glándulas por conglomerado (C). Cada columna representa la media \pm S.E.M de grupos control e hiperandrogenizado prenatalmente (PH) en 10 muestras por grupo; a vs b $p < 0,05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey.

Además, mediante la utilización de las herramientas del software, se realizó la medición del grosor de los compartimentos uterinos como así también del útero en su totalidad. El análisis morfométrico reveló que el grosor uterino total se encuentra incrementado en el grupo PH ov, respecto de los grupos control y PH anov (Fig. 5.4, A). Por otra parte, el grosor del epitelio luminal se encuentra incrementado en los grupos PH ov y PH anov. (Fig. 5.4, B). Con respecto al grosor del epitelio glandular, los grupos bajo estudio no presentaron diferencias (Fig. 5.4, C).

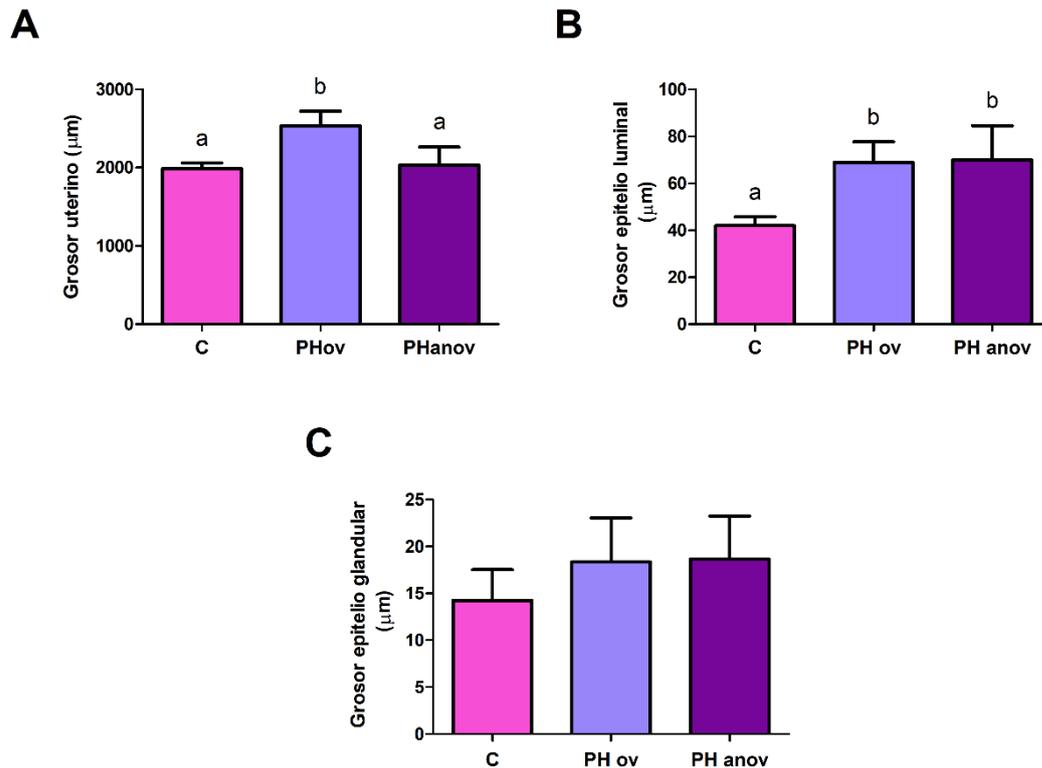


Figura 5.4: Análisis morfométrico del tejido uterino en diestro. Grosor uterino (A) Grosor del epitelio luminal (B) Grosor del epitelio glandular (C). Cada columna representa la media \pm S.E.M de grupos control e hiperandrogenizado prenatalmente (PH) en 10 muestras por grupo; a vs b $p < 0,05$, por ANOVA con test post-hoc de Tukey.

Expresión de receptores hormonales

Para evaluar si la expresión de receptores hormonales en el endometrio se encuentra afectada debido a hiperandrogenización prenatal, se realizó el estudio de la expresión proteica del receptor de andrógenos (RA), receptor de estrógenos (RE) y receptor de progesterona (RP).

El RA fue estudiado por WB e inmunohistoquímica (IHQ). La IHQ mostró que su localización es nuclear y se encuentra confinada al estroma, y epitelios (Fig. 5.5, A-C). La semicuantificación realizada mediante HScore reveló que el grupo PH anov presentaba un incremento en la expresión del RA, tanto en el epitelio glandular como luminal. (Fig. 5.5, D). Más aun, los resultados del WB mostraron que los niveles proteicos del RA se encontraban aumentados en el grupo PH anov, con respecto a los otros grupos (Fig. 5.5, E).

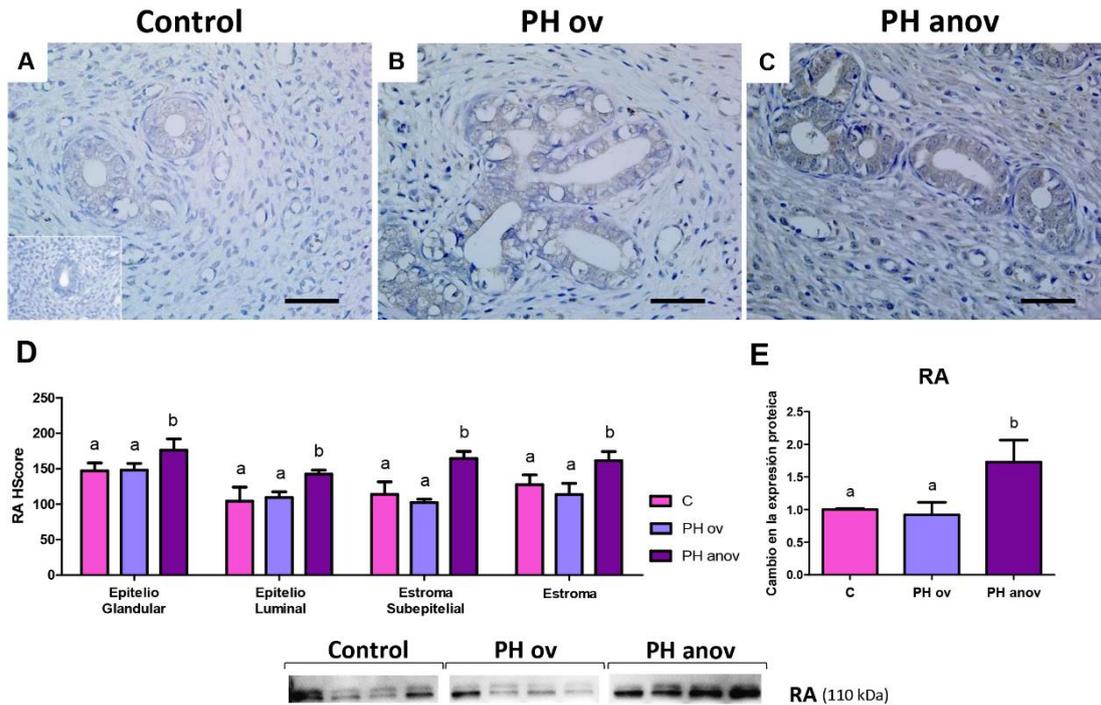


Figura 5.5: Resultados de la inmunohistoquímica del RA en secciones de tejido uterino en diestro, perteneciente a los grupos control (A), PH ov (B) y PH anov (C). La barra de escala representa 50 μm . Evaluación semicuantitativa de la expresión proteica del RA mediante HScore en el compartimento nuclear de cada estructura en todos los grupos (D). En el HScore cada columna representa la media \pm S.E.M para los grupos control e hiperandrogenizado prenatalmente (PH) (n=5 muestras/grupo). Expresión proteica del RA (E) expresado como veces de cambio (media \pm S.E.M) para los grupos control y PH. a vs b $p < 0.05$; por ANOVA con test post-hoc de Tukey (n=8 muestras/grupo).

Para el caso del RE, ambas isoformas, alfa y beta, fueron estudiadas debido a su acción opuesta. Los resultados del WB revelaron que la expresión proteica del RE alfa (Fig. 5.6, A) no presenta diferencias entre grupos, sin embargo, la expresión proteica del RE beta (Fig. 5.6, B) presentó un aumento en los grupos PHov y PHanov, con respecto al grupo control. Por otro lado, un incremento en la expresión de ambas isoformas del RP (Fig. 5.6, C-D), alfa y beta, fue encontrada en el grupo PHov.

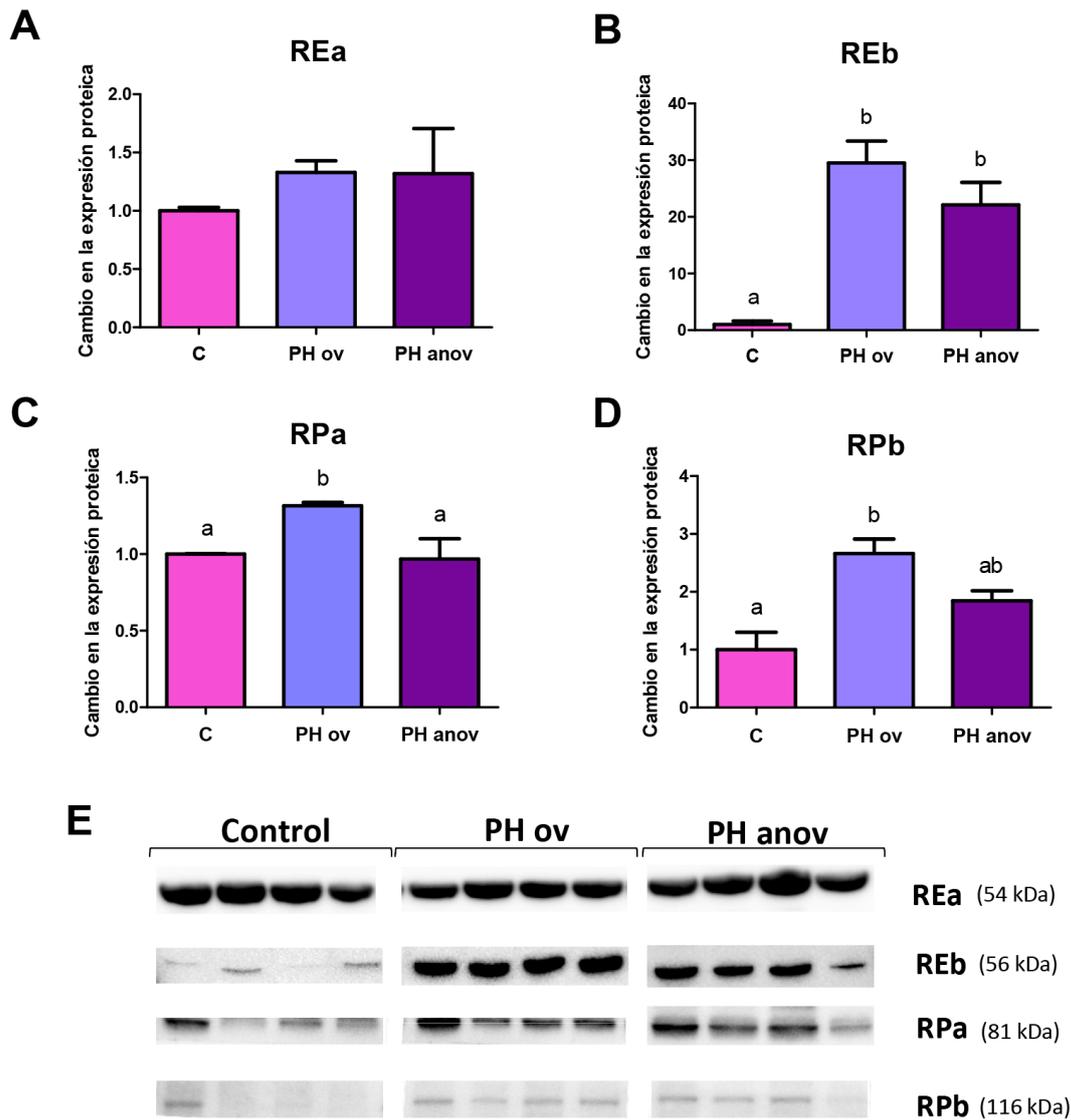


Figura 5.6: Expresión proteica del RE alfa (A), RE beta (B), RP a (C), RP b (D) representado como veces de cambio (media \pm S.E.M) para los grupos control e hiperandrogenizado prenatalmente (PH). a vs b $p < 0.05$; por ANOVA con test post-hoc de Tukey (n=8 muestras/grupo).

Expresión de aromatasa

Con el objetivo de dilucidar si la enzima P450 aromatasa, responsable de la conversión de andrógenos a estrógenos, se expresa a nivel del tejido uterino, estudiamos su expresión proteica mediante WB. Los resultados demostraron que esta enzima se expresa en el tejido uterino pero no se encontraron diferencias en la expresión proteica entre los grupos estudiados (Fig. 5.7).

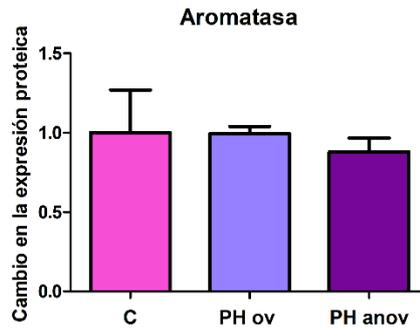


Figura 5.7: Expresión proteica de aromatasa expresada como veces de cambio (media \pm S.E.M) para los grupos control e hiperandrogenizado prenatalmente (PH). a vs b $p < 0.05$; por ANOVA con test post-hoc de Tukey (n=8 muestras/grupo).

Discusión

Como se ha mencionado en el capítulo anterior, la función endometrial está regulada por las hormonas esteroideas. Las hormonas interactúan con los receptores de esteroides, y de esta manera, se desencadenan caminos de señalización en respuesta a dicha interacción. Es por ello que una expresión alterada de receptores en el endometrio podría llevar a cambios en la regulación de la expresión génica y proteica involucradas en procesos clave como lo son la proliferación y la muerte celular, que juegan un papel importante en la remodelación endometrial que tiene lugar durante el ciclo estral.

De todo esto, se desprende la importancia de realizar un estudio que describa en profundidad cuales son las alteraciones presentes a nivel histomorfológico uterino como así también analizar la expresión de receptores hormonales. Por lo tanto, y en primer lugar nos propusimos mostrar el impacto de la hiperandrogenización prenatal sobre del tejido uterino. De los resultados obtenidos es posible resaltar que más allá de la magnitud de la disfunción ovulatoria, es decir, del fenotipo al cual pertenezca, ya sea ovulatorio o anovulatorio, el útero de los grupos PH presenta alteraciones las cuales incluyen cambios histopatológicos y morfología anormal, que se encuentra evidenciada por un incremento en la densidad glandular (hiperplasia glandular), la presencia de múltiples capas celulares formando el epitelio luminal, junto con cambios en la morfología celular y en la distribución glandular.

Para acompañar la observación histomorfológica, se realizaron análisis morfométricos los cuales demostraron que el grosor uterino del grupo PH ov se encontraba

incrementado. Esto podría deberse a un efecto del hiperandrogenismo que, de manera directa o indirecta, genera un incremento en la proliferación celular. Previamente, otros autores han reportado, mediante el uso de otro modelo de programación fetal por exceso androgénico, con una única dosis prenatal, que durante la etapa prepuberal, el tejido uterino no presenta alteraciones en el grosor de los epitelios glandular y luminal (Arriaza et al., 1989).

Estas alteraciones morfológicas encontradas, junto con los desbalances metabólicos y las alteraciones ováricas, impactan en el útero, poniendo en riesgo su funcionamiento normal (Abruzzese et al., 2016; Heber et al., 2019). Más aún, la presencia de un crecimiento del epitelio luminal descontrolado podría estar asociado con falla implantatoria y/o desarrollo de cáncer endometrial (Gao et al., 2014).

La presencia de hiperplasia endometrial es comúnmente encontrada en mujeres con SOP. Las pacientes con SOP presentan un mayor riesgo de desarrollo de hiperplasia endometrial, lo cual puede atribuirse a un desbalance en la relación estrógeno/progesterona.

Los cambios histopatológicos encontrados en el tejido uterino bajo este modelo de hiperandrogenización prenatal fueron también reportados en otros modelos animales y como consecuencia del efecto de disruptores endocrinos, y debido a efectos estrogénicos (Dixon et al., 2012; Demacopulo y Kreimann, 2019). Sin embargo, los andrógenos también son considerados responsables de los cambios en el tejido uterino, aunque su función y la de sus receptores en el tracto reproductivo femenino aún no se han dilucidado completamente. Nuestros resultados revelaron que el grupo PH anov presenta una expresión elevada del RA. Esto puede explicarse por el efecto androgénico que regula positivamente al RA, no contrapuesto por progesterona. Es importante resaltar que estudios de otros autores han demostrado que los parámetros uterinos son independientes de la aromatización de los andrógenos. Como se ha reportado previamente, ratas tratadas con andrógenos no aromatizables como lo son DHT o andrógenos sintéticos, presentan el mismo patrón de alteraciones histomorfológicas como aquellas tratadas con testosterona o dehidroepiandrosterona (DHEA). En concordancia con nuestros resultados, otros autores, mediante un modelo de SOP postnatal con DHEA, han demostrado que los andrógenos generan cambios en la arquitectura histológica del útero e incrementan el grosor del endometrio y miometrio

(Bracho et al., 2019). Estos autores atribuyen los cambios en el grosor uterino a los andrógenos que afectan la expresión de acuaporinas del estroma endometrial.

Teniendo en cuenta que las mujeres con SOP que ovulan poseen alta tasa de aborto espontáneo, una expresión alterada de receptores esteroidales podría contribuir a una baja receptividad uterina y, por ende, a un aborto espontáneo. Según se ha reportado, durante la fase secretora, el endometrio de mujeres fértiles presenta baja expresión de RA, RE y RP epiteliales. (Apparao et al., 2002; Cloke y Christian, 2012; Li et al., 2015). Esto sugiere que un incremento en la expresión del RA, quien media la acción androgénica, puede ser responsable de la falla implantatoria.

Más aún, Guerra y colaboradores (2013) han reportado, mediante un modelo de exceso androgénico perinatal, con una dosis menor, pero de mayor tiempo de exposición al andrógeno, que la administración de 0.2mg/kg de propionato de testosterona mostró un incremento en la expresión del RA en el epitelio uterino durante la etapa puberal y adulta en ratas (Guerra et al., 2013). Nuestros resultados concuerdan con los de estos autores quienes han encontrado un incremento en la expresión del RA sin cambios en la expresión del REa en el epitelio uterino.

Por otro lado, trabajos previos de otros autores han reportado que un incremento en la relación REb/REa, está involucrada en la regulación del crecimiento epitelial (Weihua et al., 2002). Nuestros resultados mostraron un incremento en los niveles de REb en los grupos PH aunque no se observaron diferencias en los niveles de REa. El patrón de expresión de receptores uterinos encontrado concuerda con los reportados por Villavicencio y colaboradores, en mujeres con SOP e hiperplasia endometrial (Villavicencio et al., 2006).

Además de los cambios en la expresión de receptores esteroideos encontrados, y sus potenciales consecuencias en el desarrollo de alteraciones uterinas, como lo es la hiperplasia endometrial, es importante considerar que la disponibilidad de andrógenos y estrógenos en el tejido uterino depende de la expresión y actividad de varias enzimas. En particular, en el presente trabajo de tesis estudiamos la enzima P450 aromatasa, que es la enzima limitante en la conversión de andrógenos a estrógenos. Los resultados obtenidos no revelaron diferencias en su expresión entre los grupos C y PH. Esto nos podría indicar que la biodisponibilidad de estrógenos en el endometrio de los grupos PH no se encuentra aumentada. Cabe destacar que los resultados respecto a la expresión

de aromatasa son controversiales. Por un lado, ciertos autores han reportado que la aromatasa no se expresa en el endometrio normal de mujeres (Sasano y Harada, 1998), como tampoco en mujeres con SOP y con SOP e hiperplasia (Villavicencio et al., 2006); sin embargo, otros autores han demostrado mediante estudios *in vitro* que en un contexto de SOP acompañado de hiperplasia, esta enzima se encuentra aumentada (Zhao et al., 2014).

Resumen visual del capítulo 2

Fenotipos PH		
Ovulatorio		Anovulatorio
↑	Hiperplasia endometrial	↑
↑	Grosor epitelio luminal	↑
↑	Densidad glandular	↑
↑	Conglomerados glandulares	↑
↑	Grosor uterino total	=
=	RA	↑
=	RE alfa	=
↑	RE beta	↑
↑	RP A	=
↑	RP B	≈
=	Aromatasa	=

Capítulo 3: Estudio de la homeostasis del tejido uterino

Estudio de la homeostasis del tejido uterino

Previamente, nos propusimos realizar un análisis histomorfológico del tejido uterino. Demostramos que la programación fetal debido a un exceso androgénico genera consecuencias en el tejido uterino que se evidenciaron por una hiperplasia glandular acompañada de una redistribución glandular (conglomerados), como así también un incremento en el grosor del epitelio luminal. Por lo expuesto anteriormente, en este capítulo nos propusimos analizar el estado homeostático uterino, mediante el estudio del balance entre proliferación y apoptosis, y de esta manera poder dilucidar los mecanismos por los cuales se presenta un incremento en la cantidad de células en el tejido uterino.

Resultados

Expresión de p27

En primer lugar, estudiamos el regulador del ciclo celular, p27, el cual inhibe la progresión del mismo. Encontramos que la expresión de p27 se encontraba incrementada en los grupos PH respecto del grupo control (Fig. 6.1, A-C). Con respecto a la inmunotinción, observamos que su localización se limitaba tanto al núcleo como al citoplasma de células las estromales y epiteliales en todos los grupos de estudio (Fig. 6.1, A-F). Sin embargo, los grupos PH mostraron un incremento significativo en la expresión de p27 citoplasmático en las células estromales y epiteliales (Fig. 6.1, B, C, E, F), mientras que la expresión nuclear de p27 se mostró disminuido en el grupo PH ov con respecto al grupo control (Fig. 6.1, B, E).

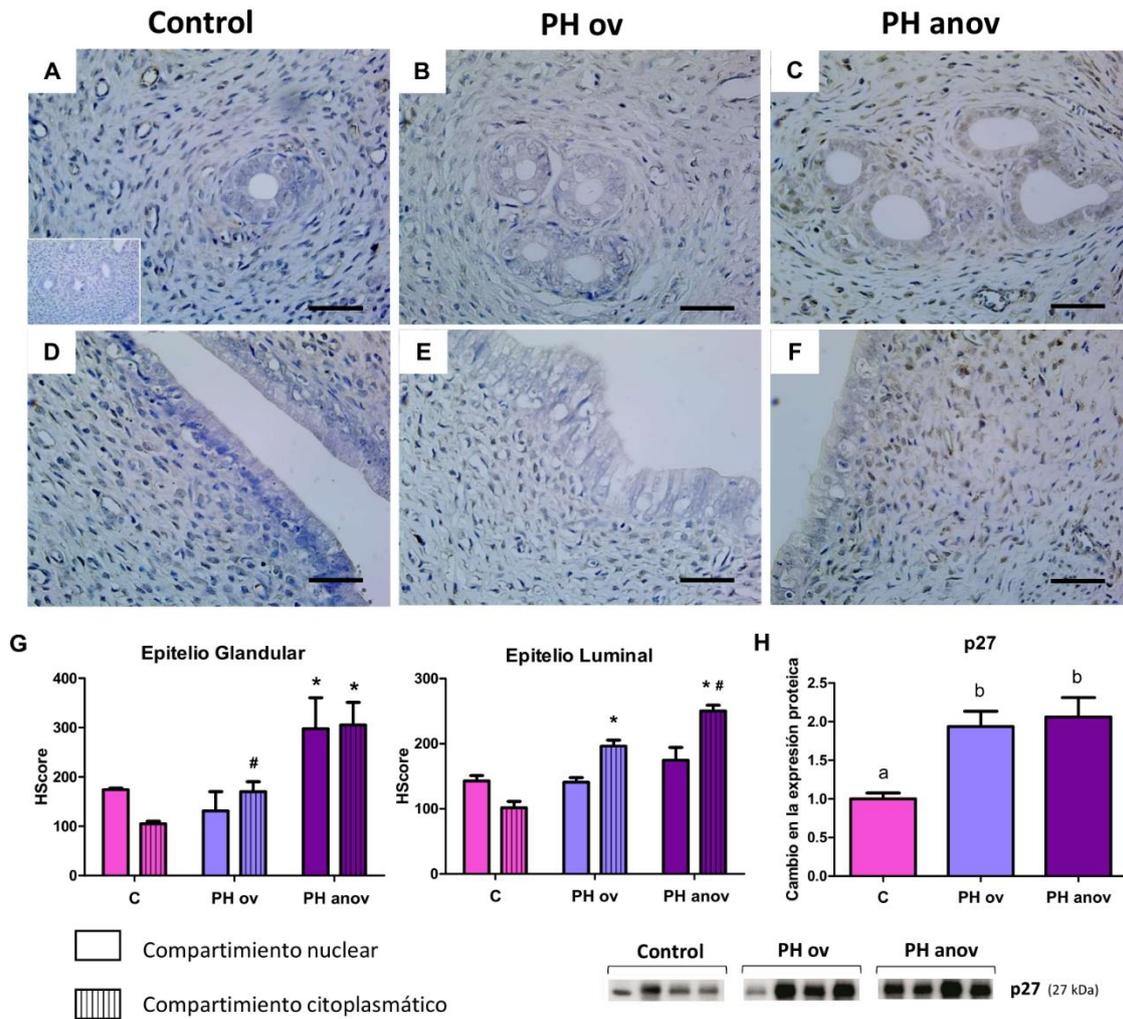


Figura 6.1: Resultados de la inmunohistoquímica de p27 en secciones de tejido uterino en diestro, perteneciente a los grupos control (A, D), PH ov (B, E) y PH anov (C, F) del epitelio glandular (A, B, C) y luminal (D, E, F). La barra de escala representa 50 μ m. Evaluación semicuantitativa de la expresión proteica del p27 mediante HScore en el epitelio glandular y luminal (G). Cada columna representa la media \pm S.E.M de los grupos control y PH (n=5 muestras/grupo). Expresión proteica de p27(H) expresado como veces de cambio (media \pm S.E.M) para los grupos control e hiperandrogenizado prenatalmente (PH). a vs b $p < 0.05$; En G, HScore por ANOVA de dos factores con test post-hoc de Bonferroni y WB por ANOVA con test post-hoc de Tukey (n=8 muestras/grupo). En el epitelio glandular * $p < 0.001$ PH anov vs. PH ov y C; # $p < 0.05$ C vs. PH ov. En el epitelio luminal, * $p < 0.001$ C vs. PH ov y PH anov; # $p < 0.01$ PH ov vs. PH anov.

Expresión proteica de reguladores del ciclo celular

Otros reguladores del ciclo celular cuya expresión proteica fue estudiada fueron: fosfo-CDK-2, p21, ciclina E y ciclina D1. Los resultados revelaron que la expresión proteica de fosfo-CDK-2 se encontraba incrementada en los grupos PH respecto del control (Fig. 6.2,

A). Más aún, los niveles proteicos de p21 se encontraron disminuidos en el grupo PH pero no se encontraron diferencias entre el grupo PH anov y los grupos PH ov y control (Fig. 6.2, B). Por último, no se encontraron diferencias en la expresión de las ciclinas E (Fig. 6.2, C) y D1 (Fig. 6.2, D).

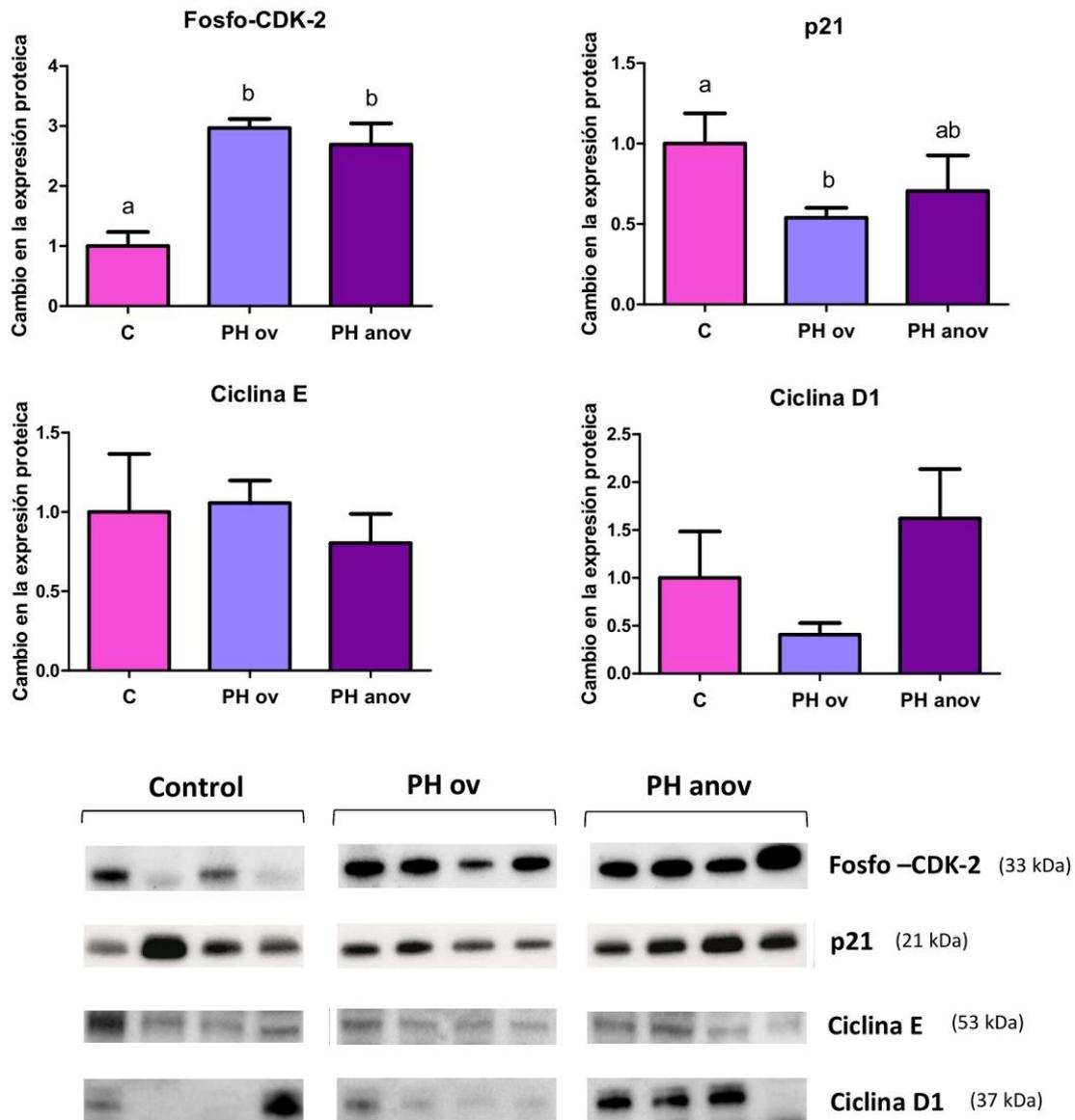


Figura 6.2: Expresión proteica de Fosfo-CDK-2 (A), p21 (B), Ciclina E (C), Ciclina D1 (D) expresado como veces de cambio (media \pm S.E.M) para los grupos control e hiperandrogenizado prenatalmente (PH). a vs b $p < 0.05$; por ANOVA con test post-hoc de Tukey (n=8 muestras/grupo).

Immunolocalización del marcador de proliferación PCNA

Para estudiar la proliferación celular, primero se determinó la expresión de PCNA, un marcador de proliferación (Strzalka y Ziemienowicz, 2011), (por sus siglas en inglés, PCNA: *Proliferating Cell Nuclear Antigen*) en el tejido uterino por inmunohistoquímica. Los resultados mostraron que la expresión de PCNA es nuclear y está confinada principalmente a los epitelios luminal y glandular, aunque se observa en menor medida en el estroma. Una mayor expresión de la inmunomarca de PCNA se observó en el epitelio luminal y glandular de los grupos PH (Fig. 6.3, A-F). Sin embargo, la semicuantificación realizada mediante HScore (Fig. 6.3, G, H), demostró que el epitelio luminal de los grupos PH presentaba un incremento significativo en la expresión de PCNA (Fig. 6.3, G).

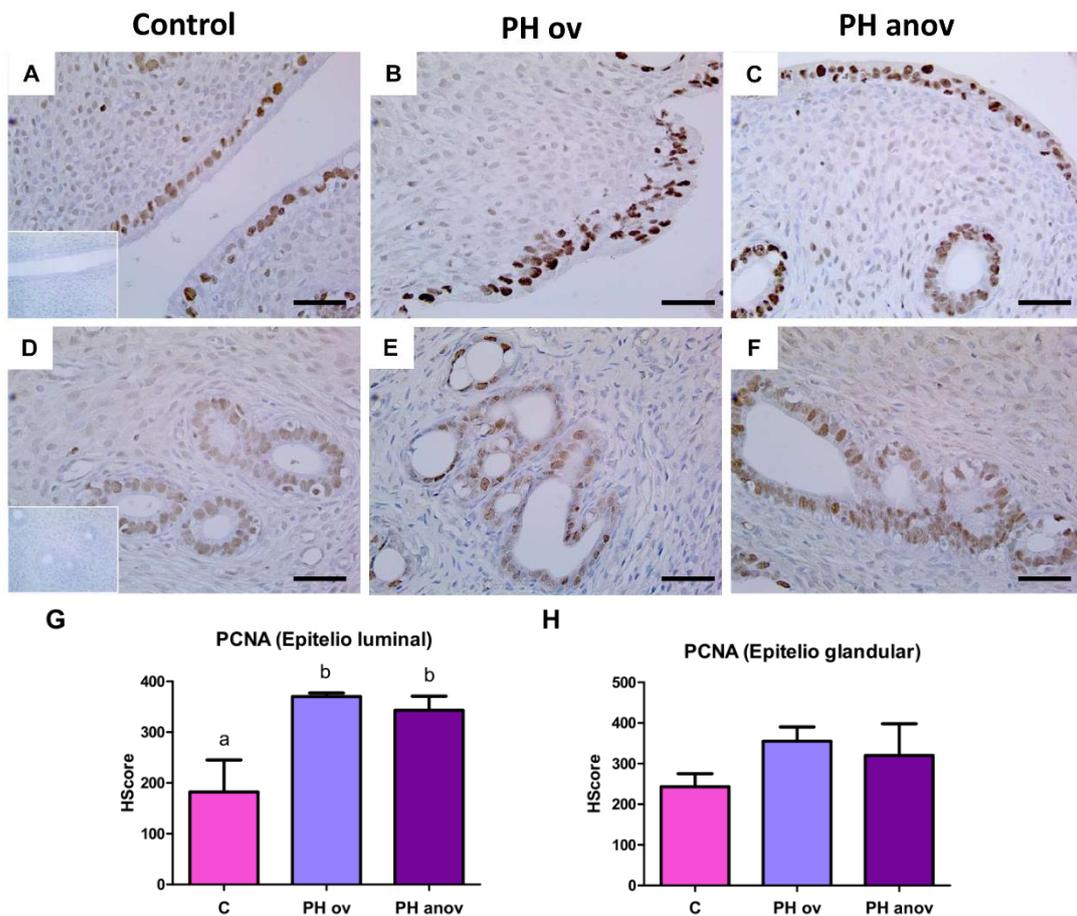


Figura 6.3: Resultados de la inmunohistoquímica de PCNA en secciones de tejido uterino en diestro, perteneciente a los grupos control (A, D), PH ov (B, E) y PH anov (C, F) del epitelio luminal (A, B, C) y glandular (D, E, F). La barra de escala representa 50 μ m. Evaluación semicuantitativa de la expresión proteica de PCNA mediante HScore en el epitelio luminal (G) y glandular (H). Cada columna representa la media \pm S.E.M para los grupos control e hiperandrogenizado prenatalmente (PH). a vs b $p < 0.05$; ANOVA con test post-hoc de Tukey (n=5 muestras/grupo).

Inmunolocalización del marcador mitótico fosfo-histona-H3

La expresión de la fosfo-histona-H3, un marcador de celular transitando la fase M del ciclo celular (Crosio et al., 2002), fue evaluada mediante inmunohistoquímica (Fig. 6.4, A-F) y su análisis fue realizado mediante HScore (Fig. 6.4, G, H). La expresión de la fosfo-histona-H3, en el epitelio luminal, se encontró disminuida de los grupos PH con respecto al control (Fig. 6.4, G). Por otro lado, en el epitelio glandular, no se encontraron diferencias entre los grupos bajo estudio (Fig. 6.4, H).

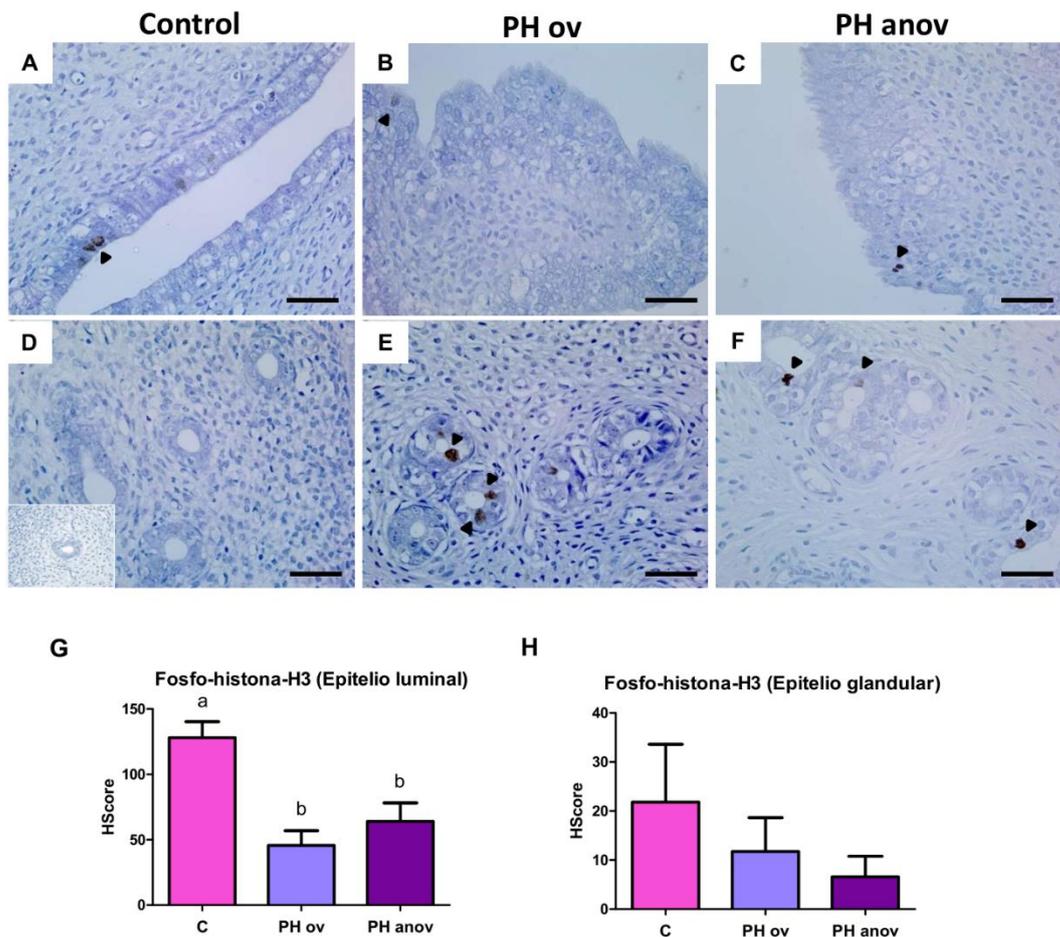


Figura 6.4: Resultados de la inmunohistoquímica de la fosfo-histona-H3 en secciones de tejido uterino en diestro, perteneciente a los grupos control (A, D), PH ov (B, E) y PH anov (C, F) del epitelio luminal (A, B, C) y glandular (D, E, F). La barra de escala representa 50 μ m. Evaluación semicuantitativa de la expresión proteica de la fosfo-histona-H3 mediante HScore en el epitelio luminal (G) y glandular (H). Cada columna representa la media \pm S.E.M para los grupos control e hiperandrogenizado prenatalmente (PH). a vs b $p < 0.05$; ANOVA con test post-hoc de Tukey (n=5 muestras/grupo).

Estudio de la expresión proteica de Akt y ERK

Cuando se encuentra activado, vía fosforilación, Akt actúa como regulador de numerosos procesos como lo son: el ciclo celular, apoptosis, supervivencia y proliferación celular (Chang et al., 2003; Liang y Slingerland, 2003). Debido a ello, nos propusimos determinar la expresión de Akt fosforilado en los residuos Serina 473 (Ser473) y Treonina 308 (Thr308) (Fig. 6.5, A, B). Los resultados del WB demostraron que el grupo PH anov presenta un incremento en la expresión de Akt Ser 473 (Fig. 6.5, A). Más aún, la expresión de ERK fosforilado en los residuos Treonina 202 y Tirosina 204 (Thr202/Tyr204) se encontró incrementada en ambos grupos PH (Fig. 6.5, C).

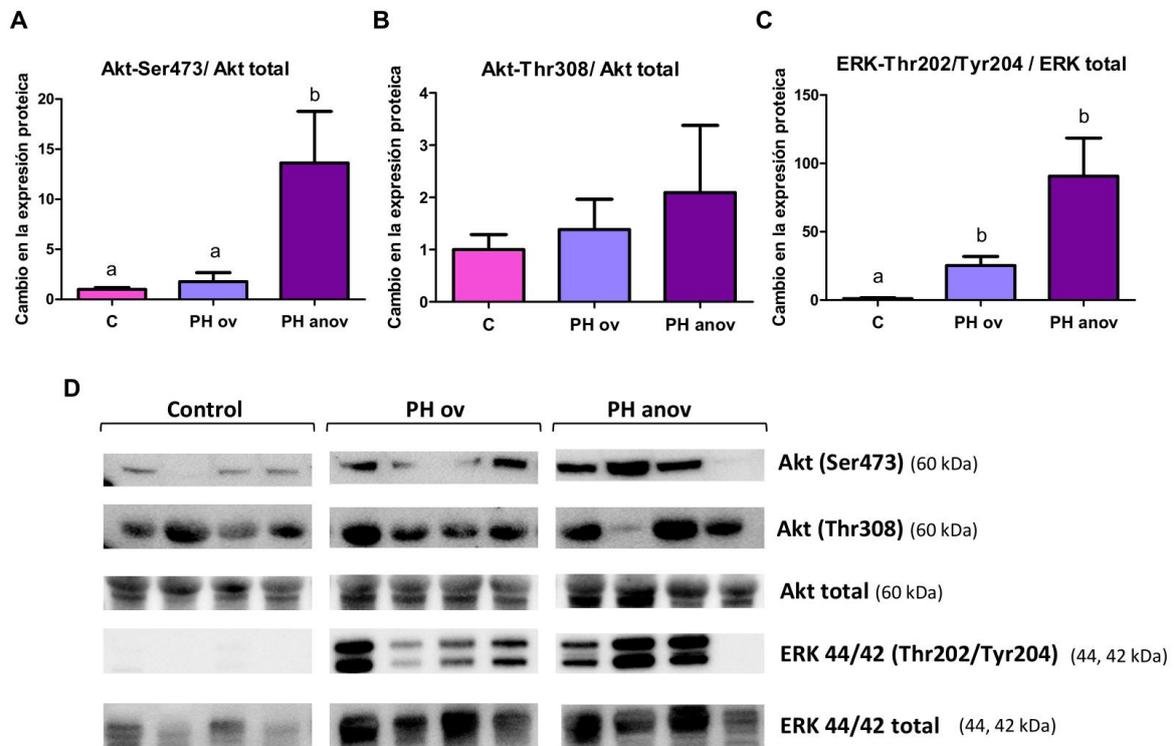


Figura 6.5: Expresión proteica de Akt-Ser473 (A), Akt-Thr308 (B), ERK-Thr202/Tyr204 (C), expresado como veces de cambio (media \pm S.E.M) para los grupos control e hiperandrogenizado prenatalmente (PH). a vs b $p < 0.05$; por ANOVA con test post-hoc de Tukey (n=8 muestras/grupo).

Estado apoptótico

El estado apoptótico fue estudiado mediante WB, a través de la expresión de los marcadores pro y anti-apoptóticos: Bax y Bcl-2, respectivamente, así como también los efectores del proceso de muerte celular: Caspasa 3 y PARP.

Los resultados mostraron que no había diferencias en la relación Bax:Bcl-2, entre los grupos PH y el control (Fig. 6.6, A). Sin embargo, un incremento en la expresión proteica de pro-caspasa 3 y de PARP total fue encontrado en los grupos PH, respecto del control. Cabe destacar, que una mínima o ausente expresión de estas proteínas en su forma clivada (Caspasa 3 y PARP) fue encontrada en todos los grupos bajo estudio (Fig. 6.6, B, C). Por otra parte, un incremento en la expresión de survivina, una proteína inhibidora de la apoptosis, fue encontrada en los grupos PH (Fig. 6.6, D).

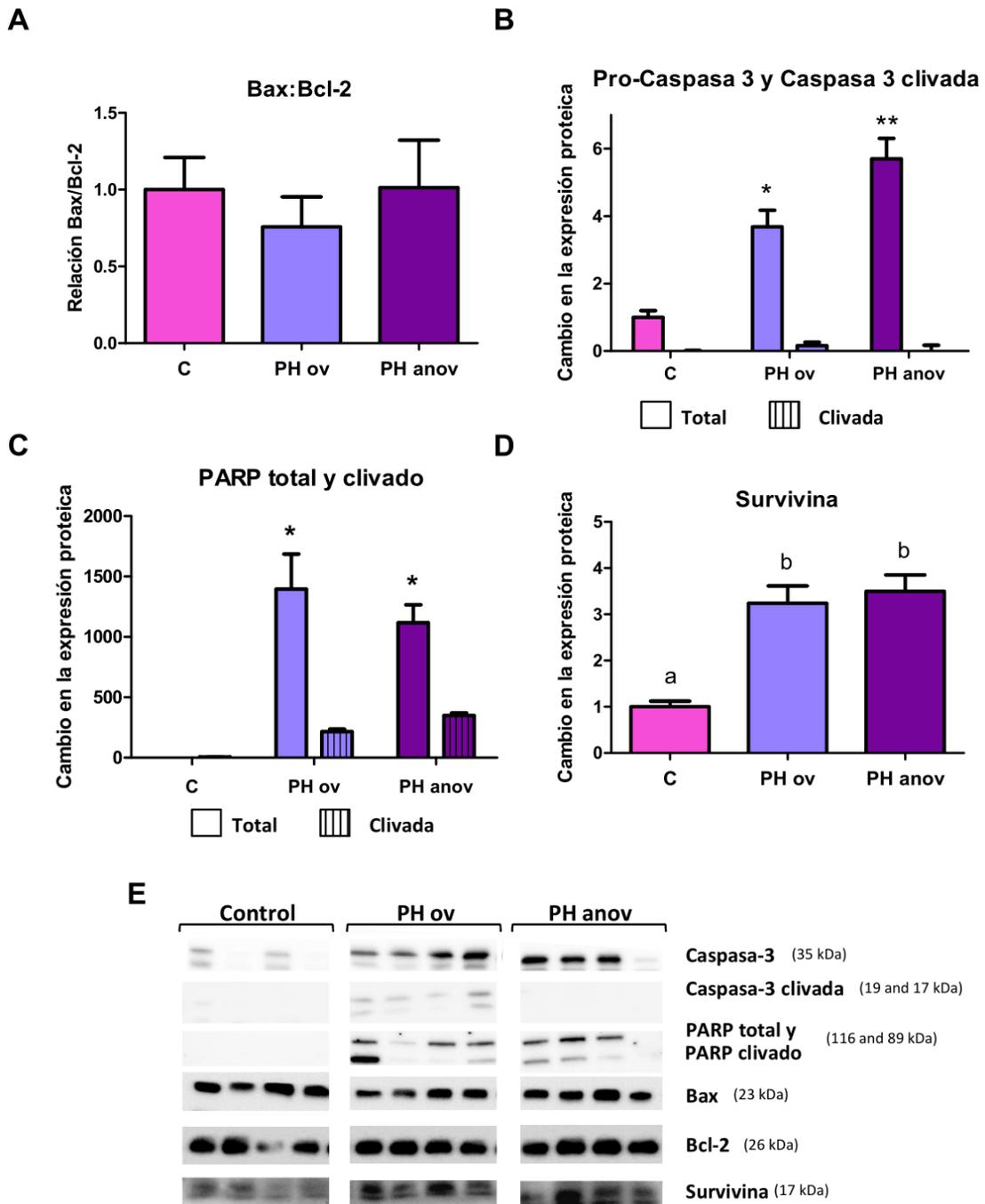


Figura 6.6: Expresión proteica de Bax:Bcl (A), Caspasa 3 total y clivada (B), PARP total y clivado (C), Survivina (D) expresados como veces de cambio (media \pm S.E.M) para los grupos control e hiperandrogenizado prenatalmente (PH). Los datos se analizaron mediante ANOVA con test post-hoc Tukey. a vs. b; $p < 0.05$. (n=8 muestras/grupo). En B, $*p < 0.01$ PH ov vs. PH anov; $**p < 0.001$ C vs. PH ov y PH anov; En C, $*p < 0.001$ C vs. PH ov y PH anov.

Estado apoptótico: Estudio de la fragmentación del DNA por TUNEL

Para evaluar el estado apoptótico *in situ* que nos permitiría hacer un análisis por compartimento, realizamos la técnica de TUNEL. Los resultados de ésta no mostraron diferencias en ninguno de los compartimentos presentes en el tejido uterino entre los grupos bajo estudio (Fig. 6.7, A-C). Los controles positivos se realizaron a través del tratamiento con DNAsa (Fig. 6.7, D) y la utilización de un control de tejido uterino activo (cíclico) de ratón (Fig. 6.7, E).

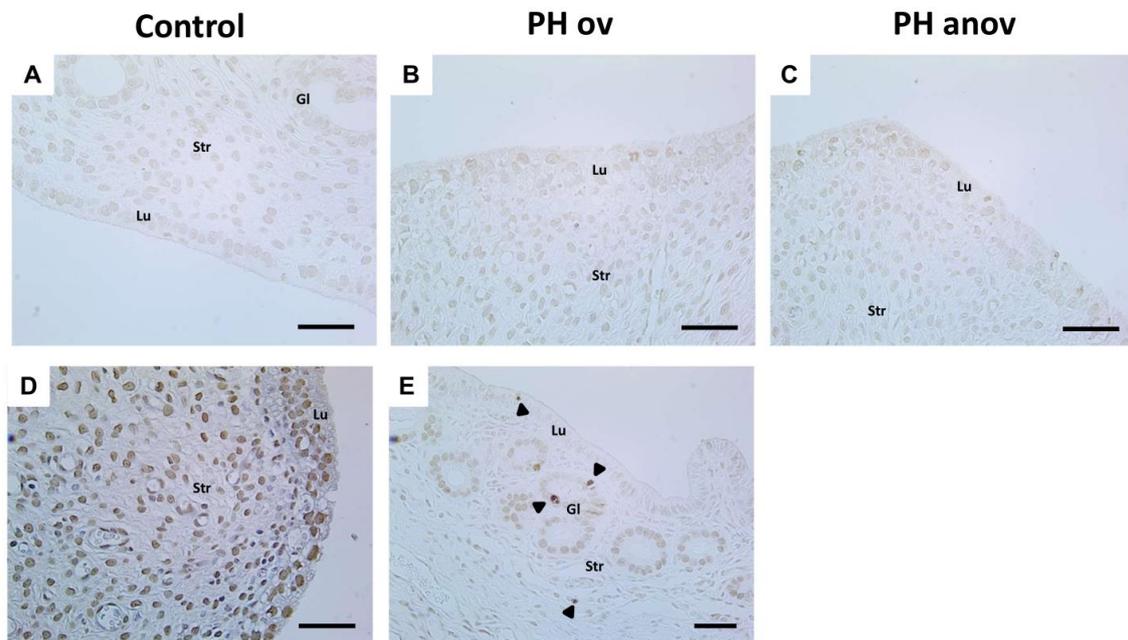


Figura 6.7: Resultados del estudio apoptótico por técnica de TUNEL en secciones de tejido uterino en diestro, perteneciente a los grupos control (A), PH ov (B) y PH anov (C). Control positivo con DNAsa (D). La barra de escala representa 50 μm . Control en tejido uterino de ratón (E) La barra de escala representa 100 μm . Para los grupos control y PH se utilizaron n=5 muestras/grupo.

Discusión

La presencia de SOP, como se ha mencionado anteriormente, aumenta el riesgo de contraer otras patologías. En particular, en el útero existe un mayor riesgo de desarrollo de hiperplasia o de cáncer endometrial el cual podría estar desencadenado por un desbalance entre proliferación y apoptosis, es decir, una homeostasis endometrial alterada. Por ello, nos focalizamos en el estudio de los mecanismos encargados de

mantener el balance homeostático, evaluando los principales reguladores del ciclo celular.

Con el objetivo de establecer si el ciclo celular fue programado por efecto de la hiperandrogenización prenatal, nos propusimos estudiar la expresión de p27, un inhibidor del ciclo celular, que se ha demostrado se encuentra regulado por hormonas (Shiozawa et al., 1998). Además la actividad de p27 depende de su localización, la cual puede explicarse a través de la activación de Akt. Cuando Akt es fosforilado en el residuo Serina 473, Akt se activa y es capaz de fosforilar a p27. Esto permite la relocalización de p27, que pasa del núcleo al citoplasma (Besson et al., 2008; Abbastabar et al., 2018). La presencia de p27 en el núcleo bloquea la proliferación celular mediante la inhibición del complejo Ciclina E/CDK-2 (Chen et al., 2018). Sin embargo, en el citoplasma, p27 inhibe la muerte celular (Philipp-Staheli et al., 2001). En este contexto, evaluamos la expresión proteica de p27 y encontramos que la misma se encontraba incrementada los grupos PH. Pero debido a la importancia de su localización, mediante inmunohistoquímica estudiamos su localización y observamos un patrón diferencial de expresión entre los epitelios glandular y luminal. En el epitelio glandular, un aumento en la expresión de p27 citoplasmático fue encontrado en ambos grupos PH, mientras que solo el grupo PH anov presentó un incremento en la expresión de p27 nuclear. Por otra parte, en lo que respecta al epitelio luminal, un incremento en la expresión de p27 citoplasmático fue encontrado en los grupos PH, lo cual podría prevenir la apoptosis. Por lo tanto, un incremento en los niveles de Akt fosforilado (Ser473) podría explicar, en parte, la localización citoplasmática de p27 y su contribución a la supervivencia celular presente en el tejido uterino de los grupos PH.

Estudios en mujeres con SOP y con SOP acompañado de hiperplasia endometrial, mostraron que la actividad de CDK-2 en el endometrio no se encuentra alterada (Villavicencio et al., 2009). En este sentido, los altos niveles de fosfo-CDK-2, presumiblemente activo, que fue encontrado en los grupos PH, podría estar asociado a los bajos niveles de p21 encontrados en el grupo PH ov, en el cual el estado proliferativo se encuentra más exacerbado como puede evidenciarse a través del grosor uterino y del epitelio luminal, particularmente por la presencia de múltiples capas celulares. Se sabe que p21 inhibe la síntesis del DNA al suprimir la actividad de CDK o al unirse a PCNA (Waga et al., 1994; Lu et al., 1998). Más aún, Toki y colaboradores sugirieron que la

apoptosis y el p21 actúan de manera cooperativa, aunque independiente, pudiendo jugar un rol negativo en la regulación de la proliferación endometrial (Toki et al., 1998). Los procesos de apoptosis y proliferación dentro del útero mantienen un balance a lo largo del ciclo estral. Sin embargo, si el ciclo estral no progresa correctamente y los caminos de señalización se encuentran desregulados debido a una alterada expresión de las hormonas esteroideas, el desarrollo de un estado desbalanceado puede llevar al deterioro de la función uterina.

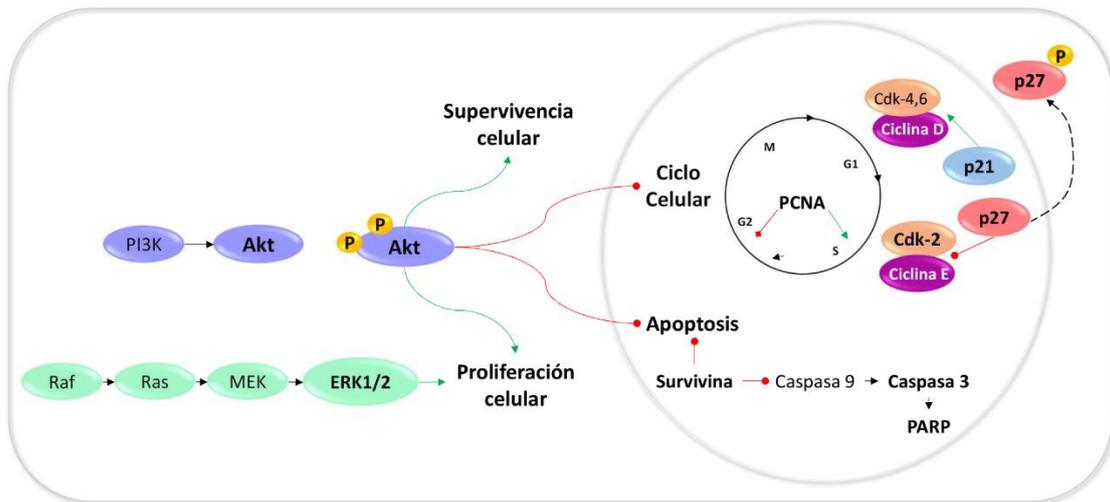
Al evaluar los efectores del proceso apoptótico a través de la medición de los productos clivados de caspasa 3 y PARP, encontramos que éstos se encontraban disminuidos en los grupos PH, demostrando que no hay apoptosis dentro del tejido que compense el estado proliferativo. Más aún, durante la fase secretoria del ciclo estral, p27 aumenta y los marcadores de proliferación celular disminuyen en el útero, favoreciendo así la implantación. Además, encontramos que el marcador de proliferación celular, PCNA, se encontraba incrementado en el epitelio luminal de los grupos PH, esto junto con el aumento de fosfo-ERK, nos sugiere una activación de la vía mitogénica.

La presencia de proliferación celular en el epitelio, junto con un incremento en la supervivencia celular (reflejado por Akt activado y un aumento en la expresión de survivina), aparentemente no compensada por un incremento en la muerte celular en el epitelio luminal en los animales hiperandrogenizados prenatalmente, podría estar asociado con baja receptividad, falla implantatoria, y/o desarrollo de cáncer como fue descrito en mujeres con SOP (Plaza-Parrochia et al., 2017).

Cabe mencionar que, dado que el SOP es una patología multifactorial que se caracteriza por hiperandrogenismo e hiperinsulinemia, resulta interesante considerar además de la posible acción androgénica, la acción de la insulina sobre el tejido endometrial. Con respecto esto, mediante estudios *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado que la insulina estimula el crecimiento endometrial y junto con estrógenos, de manera sinérgica, promueven el desarrollo de cáncer endometrial (Tian et al., 2019). Más aún, estos autores han demostrado que la insulina es un agente mitogénico y anti-apoptótico que actúa sobre células endometriales cancerosas a través del RE alfa. Insulina y estradiol actúan sinérgicamente y activan las vías de señalización PI3K y MAPK (Tian et al., 2019). En resumen, estos resultados demuestran que la programación fetal a través de un exceso androgénico afecta el mantenimiento de la homeostasis y nos permite concluir

que el útero hiperandrogenizado prenatalmente se encuentra bajo un estado proliferativo activo.

Resumen visual del capítulo 3



Capítulo 4: Balance oxidativo, estado pro-inflamatorio y niveles de PPAR γ

Balance oxidativo, estado pro-inflamatorio y niveles de PPARg

En los capítulos previos, hemos demostrado cómo la programación fetal debido a hiperandrogenización prenatal genera consecuencias en el tejido uterino en diferentes vías de señalización y estas desregulaciones generan alteraciones en el histomorfología del útero, lo que podría condicionar su funcionamiento.

En el contexto hiperandrogénico de SOP, que a su vez se encuentra asociado a otras patologías, es posible encontrar un desbalance oxidativo y/o un estado pro-inflamatorio los cuales podrían incrementar el riesgo de desarrollo de otras patologías, o ser, en parte, consecuencia del estado endocrino-metabólico en el que se encuentra enmarcado el SOP.

Teniendo en cuenta esto, y sabiendo que el sistema PPAR modula numerosos procesos en el tejido uterino durante el proceso de remodelación cíclica, e incluso se ve involucrado durante la implantación, gestación y el parto, resulta de interés estudiar este regulador que cumple un rol relevante en la fisiología uterina. A su vez, y junto con otros factores con los cuales es posible relacionarlos, se puede dilucidar un panorama general del estado uterino, que nos permita inferir si éste se encuentra en estado receptivo para que suceda una implantación efectiva y, más aún, que la misma pueda sostenerse hasta el momento del alumbramiento.

Resultados

Expresión de PPARg

Dado que en condiciones fisiológicas PPAR regula numerosas funciones en el útero, resulta de importancia analizar si PPARg, una de las principales isoformas que se expresa en el útero, se ve afectada por programación fetal debido a exceso androgénico.

Al estudiar la expresión de PPARg en el útero a través de inmunohistoquímica, encontramos que PPARg se localiza principalmente en el epitelio glandular (Fig. 7.1, A, B, C) y luminal (Fig. 7.1, D, E, F). Además, observamos que a nivel proteico no se presentaron diferencias entre el grupo C y PH (Fig. 7.1, G); sin embargo, la expresión

génica se encontraba disminuida solo en el grupo PH anov (Fig. 7.1, H). De igual manera, la expresión génica del correpresor NcOR, se encontraba disminuida únicamente en el grupo PH anov (Fig. 7.1, I).

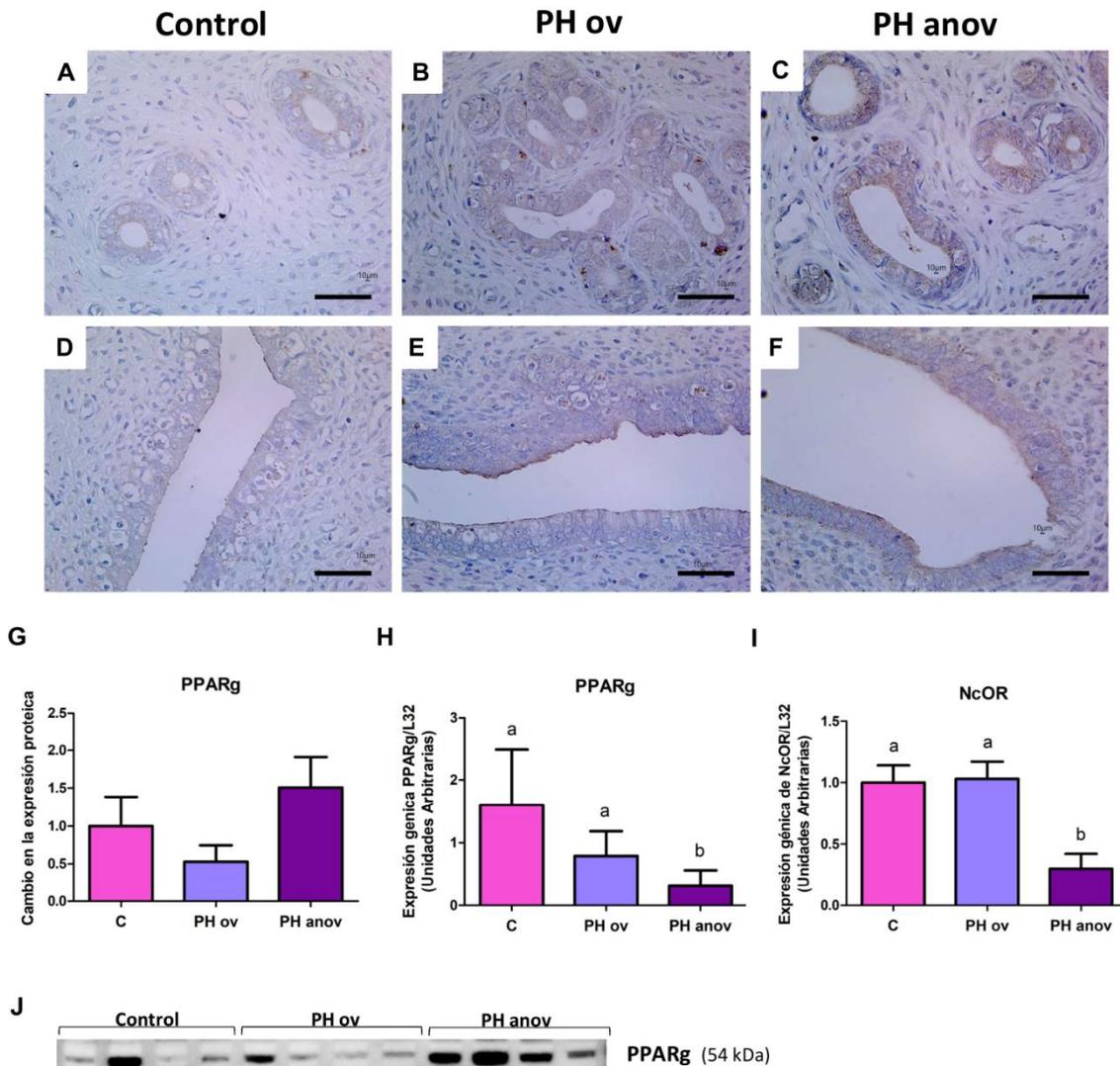


Figura 7.1: Resultados de la inmunohistoquímica de PPAR γ en secciones de tejido uterino en diestro, perteneciente a los grupos control (A, D), PH ov (B, E) y PH anov (C, F) del epitelio glandular (A, B, C) y luminal (D, E, F). La barra de escala representa 50 μ m. Expresión proteica (G, J) y génica de PPAR γ (H); expresión génica de NcOR (I). Cada columna representa la media \pm S.E.M para los grupos control e hiperandrogenizado prenatalmente (PH) en n=8 muestras por grupo. Los datos se analizaron mediante ANOVA con test post-hoc Tukey. a vs. b; $p < 0.05$.

Estado proinflamatorio

Para evaluar si el tejido uterino presentaba un estado proinflamatorio debido a hiperandrogenización prenatal, nos propusimos estudiar distintas moléculas como lo son: (1) la enzima COX-2, que limita la síntesis de prostaglandinas que son marcadores

del estado inflamatorio; y (2) los niveles de NF κ B, cuya activación desencadena una cascada de señalización como respuesta inflamatoria. Además, como marcadores de inflamación estudiamos la expresión de la citoquina pro-inflamatoria, TNF-alfa uterina y de la proteína C reactiva a nivel sérico. Por último, y como citoquina anti-inflamatoria evaluamos los niveles de la IL-10.

Los resultados de la inmunohistoquímica revelaron que la marca de COX-2 se encuentra confinada a los epitelios luminal (Fig. 7.2, A, B, C) y glandular (Fig. 7.2, D, E, F) y, aunque en menor medida, también se observó en el estroma. El análisis inmunohistoquímico nos permitió además observar que la marca de COX-2 se ve incrementada en los grupos PH, mayormente en el epitelio luminal. Por otro lado, analizamos la expresión génica y proteica de COX-2. Los resultados del WB mostraron un incremento en la expresión proteica de COX-2 en los grupos PH (Fig. 7.2, G), sin embargo, a nivel génico solo el grupo PH anov (Fig. 7.2, H) presentó un aumento en la expresión génica del mRNA de COX-2.

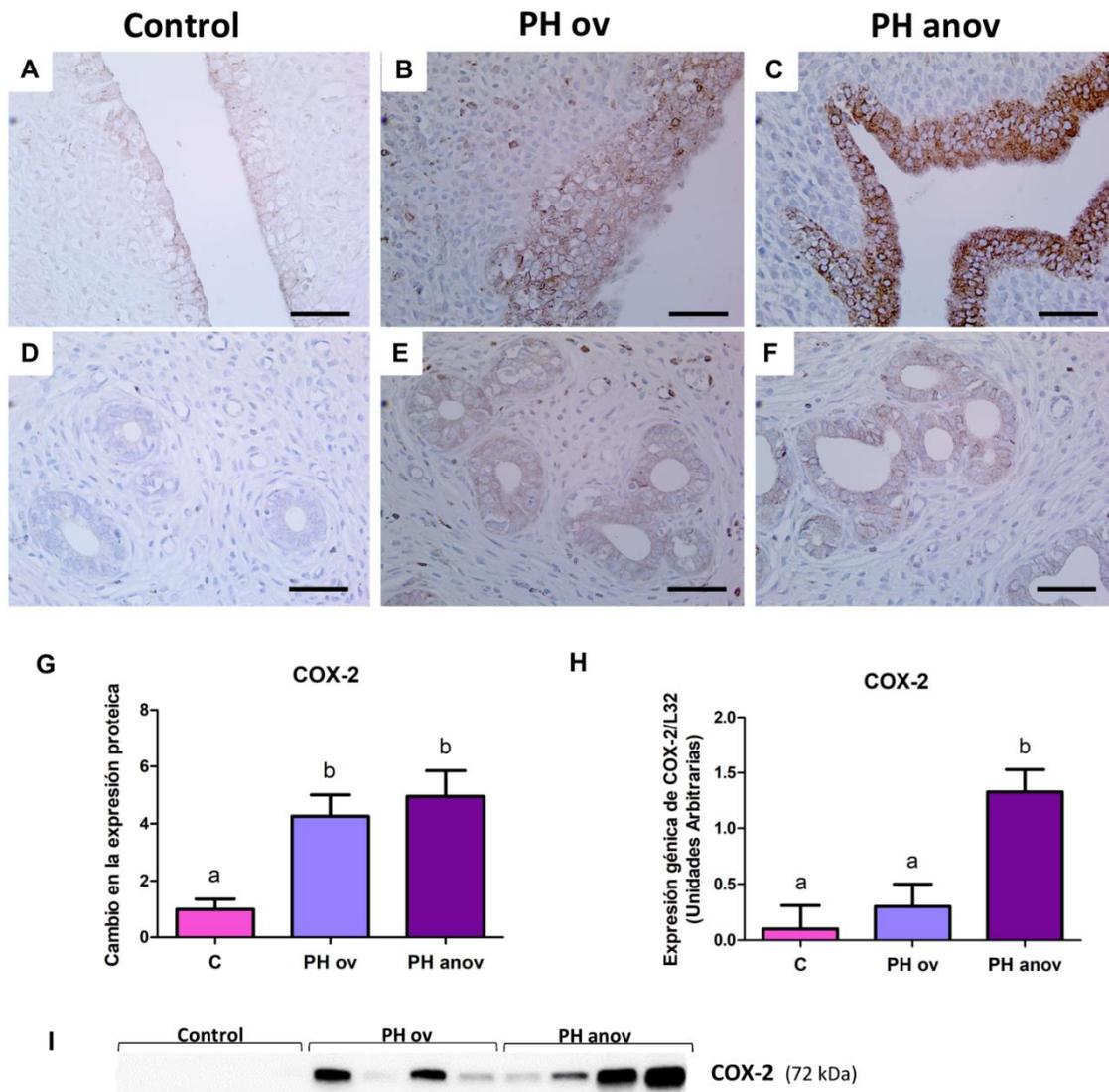


Figura 7.2: Resultados de la inmunohistoquímica de COX-2 en secciones de tejido uterino en diestro, perteneciente a los grupos control (A, D), PH ov (B, E) y PH anov (C, F) del epitelio luminal (A, B, C) y glandular (D, E, F). La barra de escala representa 50 μ m. Expresión proteica (G, I) y génica (H) de COX-2. Cada columna representa la media \pm S.E.M para los grupos control e hiperandrogenizado prenatalmente (PH) en n=8 muestras/grupo. Los datos se analizaron mediante ANOVA con test post-hoc Tukey. a vs. b; $p < 0.05$.

Al estudiar el factor nuclear NF κ B, encontramos que a nivel proteico éste se encontraba incrementado significativamente en el grupo PH ov (Fig. 7.3, A) aunque a nivel génico no encontramos diferencias en su expresión al comparar los grupos PH con el control (Fig. 7.3, B).

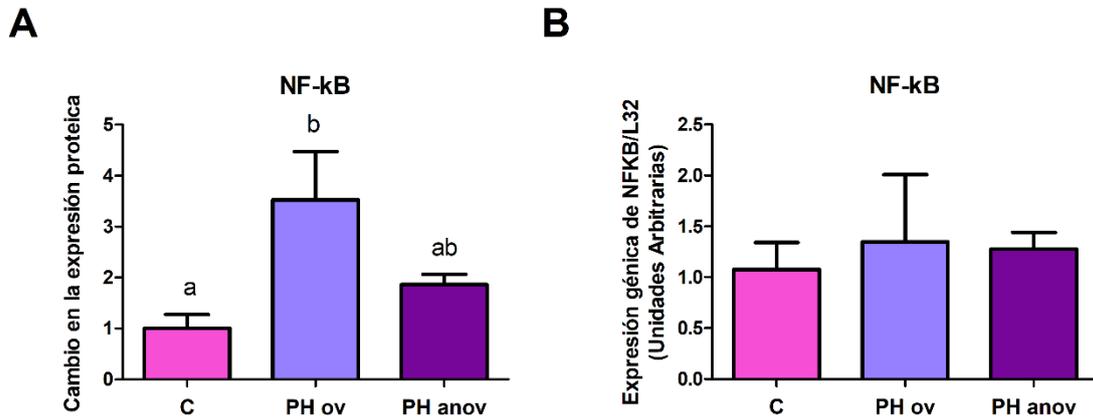


Figura 7.3: Expresión proteica (A) y génica (B) de NFκB de los grupos control e hiperandrogenizado prenatalmente (PH). Cada columna representa la media \pm S.E.M en $n=5$ muestras/grupo. Los datos se analizaron mediante ANOVA con test post-hoc Tukey. a vs. b; $p<0.05$.

Por otro lado, los marcadores de inflamación TNF- α y la proteína C reactiva fueron evaluados. Los resultados mostraron que la expresión génica de TNF- α no se vio afectada, si bien se muestra una tendencia de aumento en los grupos PH (Fig. 7.4, A). Con respecto a la proteína C reactiva, los niveles séricos de la misma se encontraron incrementados significativamente en el grupo PH anov respecto del control (Fig. 7.4, B). Por último, un incremento en la expresión de la citoquina antiinflamatoria IL-10 fue encontrada en el grupo PH ov (Fig. 7.4, C).

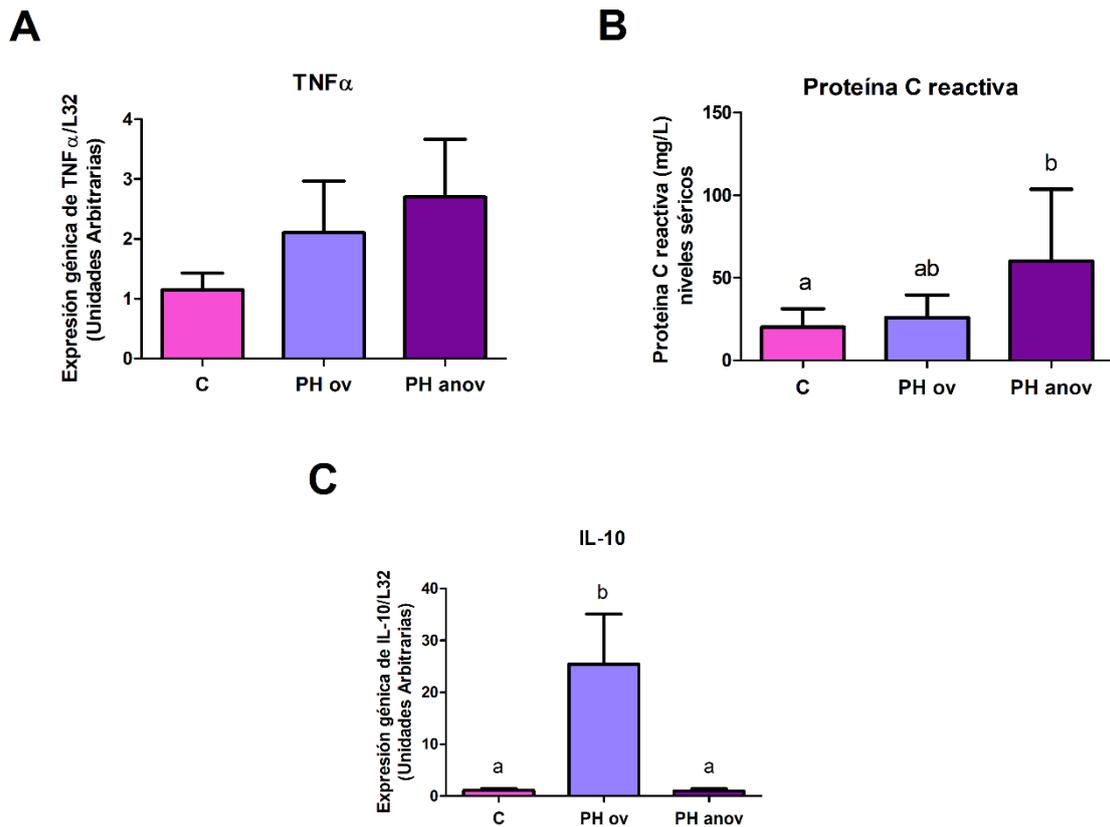


Figura 7.4: Expresión génica de TNF- α uterina (A), niveles proteicos de la Proteína C reactiva en suero (B) y expresión génica de IL-10 uterina (C) de los grupos control e hiperandrogenizado prenatalmente (PH). Cada columna representa la media \pm S.E.M en n=5 muestras/grupo. Los datos se analizaron mediante ANOVA con test post-hoc Tukey. a vs. b; $p < 0.05$.

Balance oxidativo

Para evaluar el efecto de la hiperandrogenización prenatal sobre el balance oxidante/antioxidante en el tejido uterino, se estudiaron ciertas proteínas pertenecientes a la defensa primaria contra los radicales libres de oxígeno, a través del contenido del antioxidante GSH (Fig. 7.5, A) y Cu-SOD (Fig. 7.6). Por otro lado, como marcador de estrés oxidativo se estudió la peroxidación lipídica mediante el método de TBARs (Fig. 7.5, B).

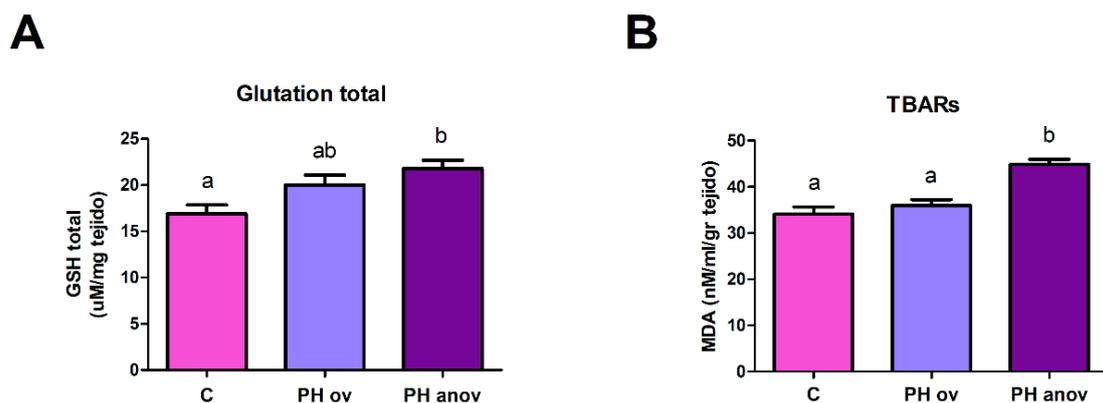


Figura 7.5: Estado oxidativo uterino. Niveles del metabolito antioxidante GSH (A) y contenido de MDA, como indicador de peroxidación lipídica (B), de los grupos control e hiperandrogenizado prenatalmente (PH). Cada columna representa la media \pm S.E.M en $n=7$ muestras/grupo. Los datos se analizaron mediante ANOVA con test post-hoc Tukey. a vs. b; $p<0.05$.

Los resultados nos indican que la hiperandrogenización prenatal únicamente aumentó el índice de peroxidación lipídica en el fenotipo anovulatorio (Fig. 7.5, A). Del mismo modo, el metabolito GSH se encontró incrementado en el grupo PH anov (Fig. 7.5, B). Por otro lado, se estudió la expresión génica de Cu-SOD (Fig. 7.6), otra de las enzimas que interviene en la eliminación de los radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$), la cual se encontró disminuida en ambos grupos PH con respecto al grupo control (Fig. 7.6).

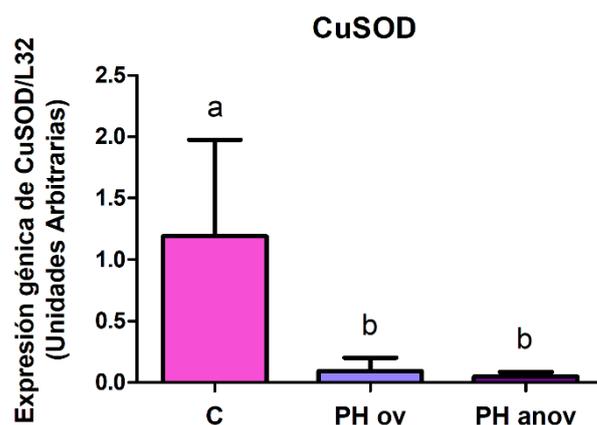


Figura 7.6: Expresión génica de la enzima antioxidante Cu-SOD, de los grupos control e hiperandrogenizado prenatalmente (PH). Cada columna representa la media \pm S.E.M en $n=5$ muestras/grupo. Los datos se analizaron mediante ANOVA con test post-hoc Tukey. a vs. b; $p<0.05$.

Discusión

A lo largo del presente trabajo de tesis, nos propusimos estudiar el alcance de la programación fetal en el tejido uterino debido a un exceso androgénico prenatal. En los capítulos anteriores evaluamos el estado endocrino-metabólico, la histomorfología uterina, y las vías de señalización involucradas en el control de la proliferación, supervivencia y muerte celular.

En este capítulo, nos focalizamos en el estudio de diversas vías que contribuyen al SOP y a sus patologías asociadas. Según se ha sido reportado, PPARg modula los procesos de proliferación, inflamación y diferenciación celular en el útero y además se encuentra involucrado en la funcionalidad lipídica y reproductiva. Es por esto que consideramos que PPARg, como sensor energético-metabólico, podría resultar un buen indicador del estado uterino para el establecimiento y mantenimiento de la preñez.

Teniendo en cuenta que en condiciones fisiológicas el sistema PPAR regula la función uterina, resulta interesante evaluar que sucede en un contexto patológico como lo es el SOP (Ferreira et al., 2019). En este contexto, los resultados obtenidos demostraron que la hiperandrogenización prenatal conlleva a una expresión génica alterada de PPARg en el fenotipo PH anov, de igual manera que para el correpressor NcOR. Estos resultados concuerdan con reportes previos de nuestro laboratorio bajo el mismo modelo de hiperandrogenización prenatal, pero con una dosis mayor (Amalfi et al., 2012) en el cual estudiamos el sistema PPAR y encontramos que la expresión génica de PPARg se encontraba disminuida en el grupo PH anov. Asimismo, otros autores han reportado una disminución en la expresión de PPARg en tejido con cáncer endometrial (Knapp et al., 2012). Esta baja expresión de PPARg también fue encontrada en otras células tumorales y ciertos estudios realizados en líneas celulares neoplásicas sugieren que los agonistas de PPARg pueden inhibir la proliferación celular (Sato et al., 2000; Ota et al., 2006; Nagata et al., 2008; Nickkho-Amiry et al., 2012). Esto podría ser posible, ya que varios estudios *in vitro* han revelado que la pioglitazona, un agonista de PPARg, induce la diferenciación celular (Cui et al., 2002; Lebovic et al., 2004). Sin embargo, algunos resultados son controversiales respecto de PPARg, ya que otros reportes han demostrado que una mayor expresión de PPARg presente en líneas celulares de cáncer

sugerirían que PPARg puede permitir el desarrollo del cáncer (Rumi et al., 2004; Foreman et al., 2009; Yeh et al., 2011).

A su vez, las alteraciones en el sistema PPAR podrían modificar la síntesis de PGs. Esto puede explicarse considerando que existe una interacción directa entre PPARs y PGs debido a la presencia de un elemento de respuesta a PPAR en el promotor del gen de COX-2. Previamente, se ha reportado que PPARg regula la expresión y actividad de COX-2 (Sheldrick et al., 2007). Nuestros resultados revelaron que la hiperandrogenización prenatal induce un estado proinflamatorio en el tejido uterino que se evidencia, en primer lugar, por un incremento en la expresión proteica de COX-2 en ambos fenotipos PH. Asimismo, la inmunolocalización ha mostrado que el aumento en la expresión de COX-2 es mayor en el epitelio luminal respecto del epitelio glandular, particularmente en el grupo PH anov. Esto resulta importante, ya que a través del estudio histomorfológico observamos en ambos grupos PH la presencia de hiperplasia endometrial que se evidencia en el epitelio luminal, a través de cambios en la morfología celular y el incremento en la cantidad de células epiteliales. Teniendo en cuenta estos resultados, podemos inferir que la desregulación en las vías de señalización generó un desbalance en la homeostasis tisular y, en consecuencia, se desencadenó un estado proinflamatorio en el epitelio luminal del tejido uterino.

Sabiendo que existen múltiples interacciones entre las vías de señalización de PPARg y COX-2 y que, un aumento en la producción de COX-2 y una alterada expresión de PPARg, han sido encontradas en ciertas patologías (Adelizzi, 1999; Sobolewski et al., 2010), el contexto hiperandrogénico en el cual se enmarca el presente modelo animal tipo SOP, no deja de ser la excepción. En el fenotipo PH anov, se ha encontrado una correlación inversa entre los niveles de PPARg y COX-2 uterinos. Si bien los niveles proteicos de PPARg por WB no mostraron diferencias, se ha encontrado una disminución en la expresión génica y en la inmunolocalización de PPARg, junto con un incremento en los niveles de COX-2. Estudios realizados en numerosos tipos de cáncer han demostrado la misma correlación (Badawi y Badr, 2003; Gustafsson et al., 2007; Konstantinopoulos et al., 2007; Knopfová y šMarda, 2010). Más aún, cuanto más débil es la expresión de PPARg, mayor es el nivel de COX-2 / PGE-2 y, por lo tanto, más progresa el desarrollo tumoral (Sasaki et al., 2002; Badawi y Badr, 2003). Esto puede indicar, que el fenotipo anovulatorio, que se encuentra en condiciones hiperandrogénicas, es el más

comprometido y presenta un riesgo mayor en cuanto al desarrollo de otra patología más severa como cáncer de endometrio.

Más aún, cabe resaltar que existen vías independientes de PPAR γ , las cuales mediante sus ligandos, inducen la expresión de COX-2, a través de la activación de las vías de señalización de ERK y PI3K. Los agonistas de PPAR γ estimulan dichas vías de señalización que resultan en la activación de los factores de transcripción AP1 y NF κ B, los cuales a su vez estimulan la expresión de COX-2 (Patel et al., 2005).

A nivel sistémico, la evaluación de la proteína C reactiva ha mostrado que el fenotipo anovulatorio presenta un estado inflamatorio elevado. Los niveles de dicha proteína pueden elevarse por obesidad, la cual no se encuentra presente en los fenotipos PH del presente modelo. Por lo tanto, es posible atribuir su aumento al estado endocrino-metabólico tipo SOP generado por programación fetal mediante hiperandrogenización prenatal. Cabe destacar, que la proteína C reactiva es actualmente considerada un buen marcador de inflamación crónica de bajo grado en mujeres con SOP (Repaci et al., 2011). Por lo tanto, SOP trae aparejado numerosas alteraciones a nivel sistémico y uterino que se encontraron presentes en el modelo bajo estudio. Entre ellas cabe mencionar el estrés oxidativo. Aunque es posible considerar que el estrés oxidativo es un inductor de la patogénesis del SOP, frente a un desbalance oxidativo en el contexto de SOP cabe cuestionarse si el estrés oxidativo se debe a un efecto del SOP por sí mismo, o si están relacionados con las complicaciones que SOP trae aparejadas. En el presente trabajo de tesis, encontramos que la hiperandrogenización prenatal genera un estado pro-oxidante en el grupo PH anov, que se evidencia por un incremento en la peroxidación lipídica, evaluada a través de MDA. Como mecanismo antioxidante y protector frente a ROS, los niveles de GSH aumentaron en el grupo PH anov, y de esta manera los datos sugieren que se intenta compensar la oxidación.

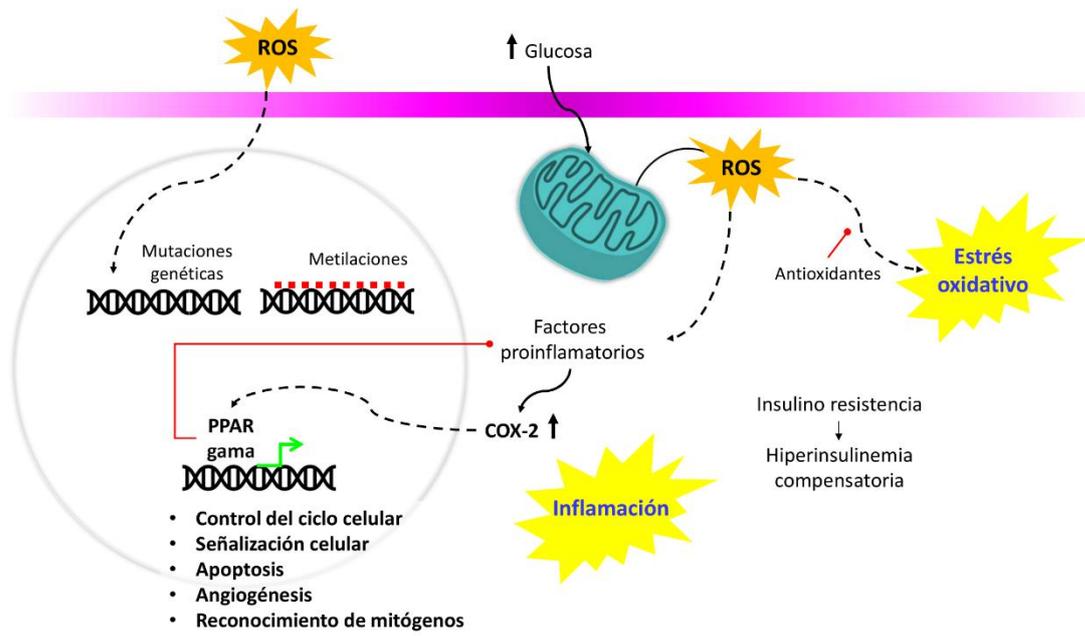
Numerosos reportes indican que el estrés oxidativo se encuentra incrementado en pacientes SOP con respecto a las pacientes sin SOP y que el estrés oxidativo se encuentra significativamente correlacionado con obesidad, hiperandrogenismo, IR e inflamación crónica (Lu et al., 2018). La IR induce estrés oxidativo porque la hiperglucemia y los niveles elevados de ácidos grasos libres conducen a la producción de ROS (Bloch-Damti y Bashan, 2005; Lee et al., 2010). Cuando el exceso de glucosa o ácido graso libre se

absorben en la célula, ciertos metabolitos se transferirán a las mitocondrias para la oxidación, resultando en un aumento en la producción de ROS.

Además, las mujeres con SOP poseen mayor riesgo a contraer patologías cardiometabólicas, lo cual podría estar asociado a un desbalance oxidativo. Más aún, según se ha descrito, el estrés oxidativo y los marcadores de inflamación se correlacionan positivamente con los niveles de andrógenos en pacientes con PCOS (González et al., 2005; Yilmaz et al., 2005; Yang et al., 2011)

Se sabe que el daño al ADN y la metilación inducida por estrés oxidativo desempeñan un papel clave durante los estadios iniciales de la patogénesis tumoral (Franco et al., 2008). El estrés oxidativo en pacientes con SOP podría causar inestabilidad genética e incrementar el riesgo de desarrollo de cáncer (Kryston et al., 2011). También, se ha demostrado que el estrés oxidativo está asociado a otros desórdenes metabólicos que son características comunes y potenciales inductores de SOP y cáncer de endometrio y que podrían participar e interferir durante la fisiología de SOP (Diñcer et al., 2005; González et al., 2009). Las ROS y los factores proinflamatorios, producidos bajo estrés oxidativo, podrían inducir IR principalmente a través de la vía IRS-PI3K-Akt mediante la activación de vías de señalización asociadas, como NFκB y JUNK (Kamata et al., 2005; Keane et al., 2015). La hiperinsulinemia, compensatoria de la IR, contribuye a la patogénesis del cáncer al activar las vías de señalización de la proliferación celular y finalmente conduce a la transformación maligna (Bremer y Miller, 2008). Además, el estrés oxidativo, la IR y la inflamación podrían ser inducidos por un exceso de andrógenos *in vivo* y estar involucrados en la obesidad. Por lo tanto, el estrés oxidativo es considerado como un factor desencadenante inicial, que puede conducir al desarrollo de cáncer en un contexto de SOP (Papaioannou y Tzafettas, 2010).

Resumen visual del capítulo 4



Capítulo 5: Estudios de fertilidad

Estudios de fertilidad

El estudio de la fisiología uterina nos permitió dilucidar como se encuentra el útero debido a programación fetal, no solo en su histomorfología sino también en la regulación de sus vías de señalización. Sabiendo la importancia que posee el útero en la reproducción y con el objetivo de estudiar si la capacidad reproductiva de las hembras de los grupos C y PH, se realizaron estudios de apareo, fertilidad y cuidado materno de crías.

Resultados

En primer lugar, cabe resaltar que el grupo PH anov, fue puesto en apareo, pero éste no logró alcanzar la preñez.

Peso y glucosa

El seguimiento de peso realizado durante los días 0, 7, 14 y 20 de la gestación no mostró diferencias entre los grupos C y PH ov. Se observó una ganancia de peso a lo largo de la preñez que se correlaciona con el desarrollo de las crías en gestación (Fig. 8.1, A). Por otro lado, los niveles de glucosa en sangre a día 0 y a día 20 de gestación mostraron un aumento significativo, entre los grupos C y PH ov (Fig. 8.1, B).

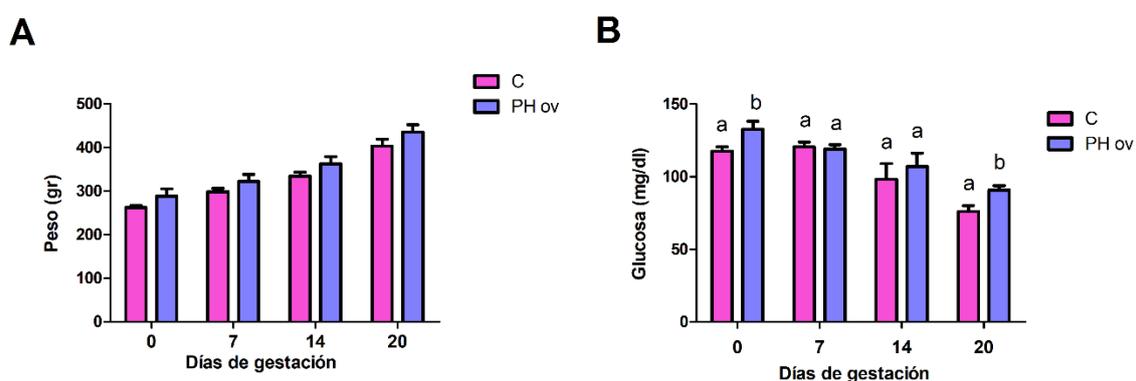


Figura 8.1: Evaluación de peso (A) y de glucosa (B) de los grupos control e hiperandrogenizado prenatalmente (PH) durante la gestación. Cada columna representa la media \pm S.E.M en n=12 madres/grupo. Los datos se analizaron mediante *t*-student. a vs. b; $p < 0.05$.

Capacidad reproductiva

Se evaluó la receptividad y fertilidad de los grupos C y PH ov. Los resultados mostraron que en primer lugar, las hembras pueden quedar preñadas (índice de apareo) y logran parir crías vivas (índice de fertilidad) independientemente del tratamiento. Sin embargo, el grupo PH ov necesitó más tiempo para que suceda la copula, afectándose así el tiempo de apareo (Tabla 8.1). Por otro lado, útero del grupo PH ov presentó una menor cantidad de sitios de implantación con respecto al grupo control y más aún, esta diferencia se mantiene y se ve reflejada en la cantidad de crías nacidas entre estos grupos (Tabla 8.1). Cabe destacar que la cantidad de reabsorciones embrionarias y la tasa de pérdida de sitios luego de la implantación no mostraron diferencias entre los grupos C y PH ov. (Tabla 8.1)

	C	PH ov
Índice de apareo^a	86.96%	85.71%
Tiempo de apareo^b (días)	2.21 ± 0.29	3.58 ± 0.34 *
Índice de fertilidad^c	78.95%	83.33%
Sitios de implantación	15.69 ± 0.54	12 ± 1.84 *
Reabsorciones embrionarias	1 ± 0.48	0.8 ± 0.37
Tasa de pérdida post-implantatoria^d	5.13 ± 1.69	5.19 ± 1.3
Crías nacidas vivas	15 ± 0.58	11.5 ± 1.77 *

^a Cantidad de hembras con tapón vaginal o presencia de espermatozoides en el extendido vaginal en relación al total de hembras analizadas en cada experimento.

^b Tiempo que tardan las hembras en presentar el tapón vaginal o presencia de espermatozoides en el extendido vaginal.

^c Cantidad de hembras que lograron parir crías vivas en relación al total de hembras analizadas en cada experimento.

^d Se calcula como el número de sitios de implantación – el número de crías vivas x 100 / el número de sitios de implantación.

Tabla 8.1: Análisis de la capacidad reproductiva de los grupos control e hiperandrogenizado prenatalmente (PH) durante la gestación. Cada valor representa la media ± S.E.M en n=12 madres/grupo. Los índices de apareo y fertilidad de analizaron como datos categorizados y con el estadístico chi-cuadrado. El resto de los datos se analizaron mediante el test *t*-student; **p*<0.05.

Capacidad materna y evaluación de camadas nacidas

Posterior al nacimiento, se evaluó la sobrevivencia de las crías la cual no presentó diferencias entre C y PH ov, demostrando así que la capacidad materna de las madres PH ov no se

ve afectada (Fig. 8.2, A). Por otro lado, el peso total de la camada nacida (a día 3) fue significativamente menor en el grupo PH ov con respecto al control (Fig. 8.2, B). A día 6, los animales fueron sexados y pesados, manteniéndose una diferencia en peso menor para el grupo PH ov tanto en hembras (Fig. 8.2, C) como en machos (Fig. 8.2, D). La proporción de hembras y machos nacidos no mostró diferencias entre los grupos C y PH ov (Fig. 8.2, E, F).

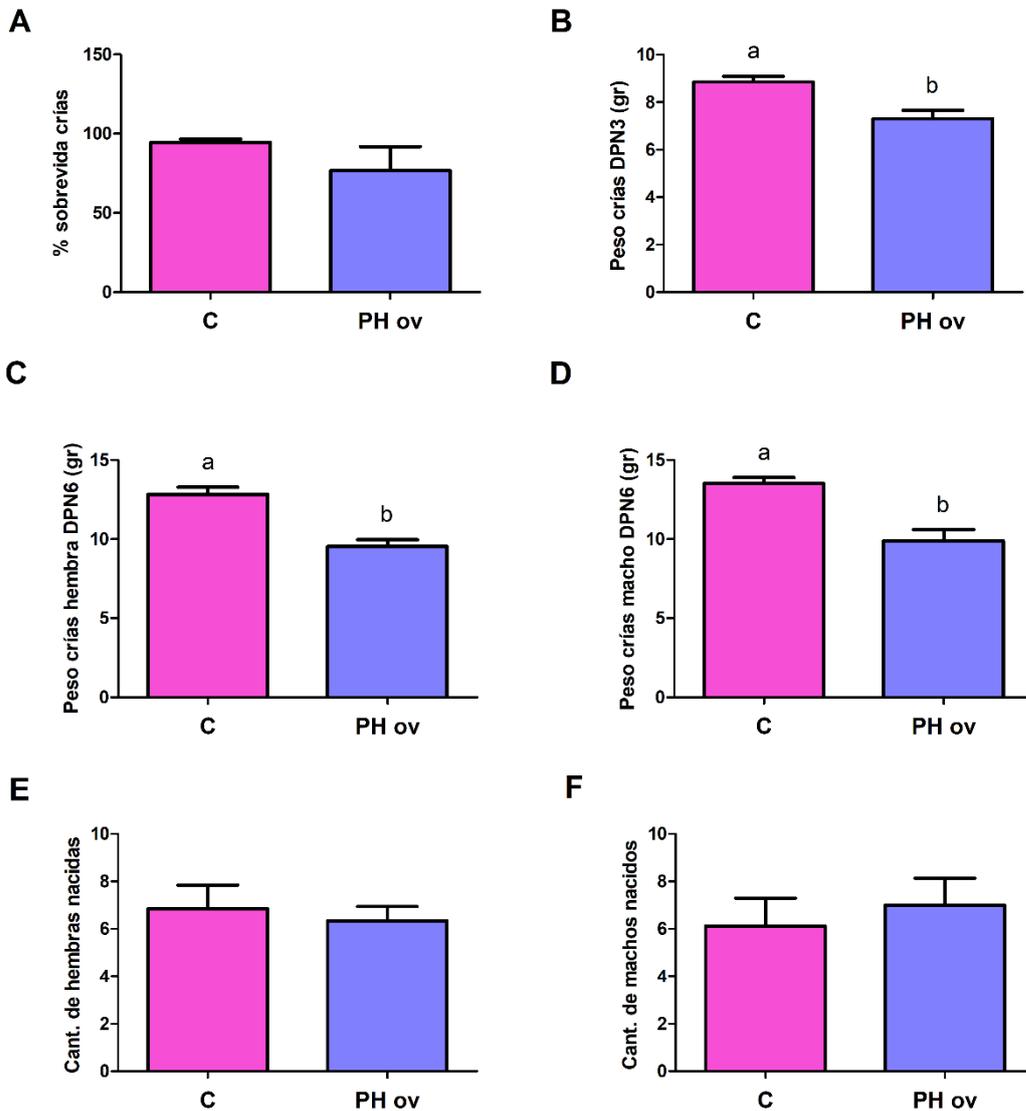


Figura 8.2: Porcentaje de crías que sobreviven post-nacimiento (A), peso de las crías de día postnatal 3 (B), pesos de las crías hembra a día postnatal 6 (C), pesos de las crías macho a día postnatal 6 (D), cantidad de hembras nacidas (E) y cantidad de machos nacidos (F), de los grupos control e hiperandrogenizado prenatalmente (PH) durante la gestación. Cada columna representa la media \pm S.E.M de las crías pertenecientes a n=12 madres/grupo. Los datos se analizaron mediante el test de *t*-student. a vs. b; $p < 0.05$.

Discusión

El factor más importante implicado en la subfertilidad de las pacientes con SOP es la anovulación debido a una falla en la selección del folículo dominante (Anón, 2004). En el presente trabajo de tesis, hemos obtenido que entre un 38% a 43% de los animales hiperandrogenizados prenatalmente no ciclaban (grupo PH anov) y se encontraban arrestados en el estadio de diestro (*ver tabla 4.2*). Este grupo, al ser puesto en apareo no mostró receptividad uterina, lo que atribuimos a su falla en la ciclicidad ovárica. En contrapartida, el grupo control que presentó ciclos ovulatorios regulares y el grupo PH ov que presentó ciclos ovulatorios irregulares, fueron capaces de concebir y parir crías vivas. El grupo PH ov, tardó más en alcanzar la cópula que el grupo control, posiblemente debido a sus alteraciones en el ciclo estral o por cuestiones comportamentales.

Actualmente, se conoce que aquellas mujeres con SOP que poseen ciclos ovulatorios presentan fallas en la implantación embrionaria, riesgo incrementado de pérdida de la preñez temprana y complicaciones obstétricas (Sastre et al., 2009), por ello nos centramos en el estudio del útero en gestación y, en primer lugar, observamos que la cantidad de sitios de implantación presentes a día 14 de gestación en el grupo PH ov era significativamente menor con respecto al grupo control y que la cantidad de crías nacidas vivas, también resultó ser menor en el grupo PH ov respecto del control. Por otro lado, si bien existe un porcentaje de pérdidas post-implantatorias, éste no resultó ser diferente entre los grupos C y PH ov. De igual modo, la cantidad de reabsorciones embrionarias evaluadas a día 14 de gestación no presentó diferencias entre los grupos bajo estudio.

Cabe destacar que las hembras preñadas del grupo PH ov presentaron mayores niveles de glucosa durante la gestación, particularmente en el inicio (día 0) y hacia el final de esta (día 20). Estos datos podrían sugerir que el metabolismo de la glucosa se encuentra alterado en el grupo PH ov, al igual que se ha demostrado previamente en mujeres con SOP, las cuales muestran un mayor índice de diabetes gestacional que mujeres sanas (Lo et al., 2006a; Mustaniemi et al., 2018). Más aún, en mujeres con SOP, también se ha reportado la presencia de trastornos hipertensivos como lo son: la preclampsia y la hipertensión arterial (Lo et al., 2006b) que pueden conducir al nacimiento de hijos con bajo peso al nacer (Sir-Petermann et al., 2005; Boomsma et al., 2006). En este punto, es

importante resaltar que las crías nacidas de las madres PH ov, presentaron un bajo peso al nacer con respecto al grupo control. Esta diferencia se observó a día 3 post nacimiento como también a día 6 post nacimiento (luego del sexado), encontrándose un menor peso tanto en crías hembra como en crías macho, con respecto al grupo control. Asimismo, existen otros factores que ponen en riesgo la gestación y conducen a un embarazo de mayor riesgo tanto para la madre como para el niño por nacer, entre los que se encuentran la obesidad, que el grupo PH ov no presenta, y alteraciones en el flujo de sangre en útero (Palomba et al., 2010, 2015), el cual podría ser una condición que afecte a las crías en desarrollo y que, por lo tanto, el bajo peso de las crías pueda atribuirse a una insuficiencia en el flujo de sangre materna que limite la nutrición fetal y por ende condicione su crecimiento.

Por último, el sexado a día 6 nos permitió dilucidar si la condición de las madres PH ov afecta la proporción de sexos obtenida por camada, y los resultados demostraron que esta no se vio afectada. Más aún, la capacidad materna, evaluada a través de la supervivencia de las crías hasta 96hs post nacimiento tampoco se vio afectada en el grupo PH ov respecto del control, lo que demuestra que todas las hembras realizan un cuidado materno que permite la sobrevivencia de la mayoría de su descendencia.

V. Conclusiones

Conclusiones

- Hemos podido desarrollar un modelo murino de programación fetal por exceso androgénico prenatal, mediante la utilización de 1mg de testosterona, la cual conduce al desarrollo de dos fenotipos tipo SOP, determinados a través del seguimiento del ciclo estral y definidos como ovulatorio irregular (al no proseguir correctamente el ciclo o extenderse en su duración) y anovulatorio (por quedar arrestado en diestro).
- Como consecuencia del efecto de la hiperandrogenización prenatal los fenotipos estudiados presentaron alteraciones metabólicas como lo son: hiperinsulinemia, hiperglucemia e insulino resistencia, a los 90 días de edad.
- A nivel histomorfológico, los úteros de los fenotipos PH presentan un incremento en el grosor del epitelio luminal, y una mayor cantidad de glándulas endometriales que se disponen en forma de conglomerados glandulares.
- El útero de los fenotipos PH presenta una mayor sensibilidad a la acción esteroidal, que podría ser la que conduce a cambios en la expresión de genes involucrados en los procesos de proliferación, apoptosis y progresión del ciclo celular.
- El desbalance en la relación REb/REa podría ser un factor importante que conduzca a la progresión a hiperplasia endometrial, aunque también el RA podría estar jugando un rol importante en el desbalance homeostático.
- El aumento en la proliferación y la ausencia de apoptosis, junto con las diferencias encontradas en la expresión de proteínas relacionadas con estos procesos, indica que en los úteros de los fenotipos PH existe una desregulación de la homeostasis tisular, conduciendo a un estado proliferativo activo no contrarrestado por apoptosis.
- La activación de Akt y ERK en el grupo PH anov sugiere que estas proteínas son importantes reguladores de la supervivencia y proliferación celular. Estas

alteraciones observadas en la expresión de proteínas que regulan la supervivencia celular endometrial de las pacientes SOP, podrían estar favoreciendo el desarrollo de hiperplasia endometrial.

- La hiperandrogenización prenatal disminuye la expresión de PPAR gama en el útero. A su vez, conduce a estrés oxidativo uterino, por un aumento del estado oxidante intenta ser compensado por los mecanismos antioxidantes, aunque no todos ellos logran contrarrestar dicha oxidación. Por último, la presencia de un estado pro-inflamatorio elevado a nivel sistémico y uterino suma un factor más de riesgo que predispone al desarrollo de una patología más severa.
- Los estudios de apareo, fertilidad y capacidad materna han demostrado que las hembras PH ov son capaces de sostener una gestación y parir crías vivas, sin embargo, es posible que la capacidad de nutrir dichas crías se encuentre condicionada, es por eso que las mismas presentan un bajo peso al nacer. En el grupo PH anov, la falla en la ciclicidad ovárica resulta determinante lo que le impide ser fértil.

VI. Referencias

- Abbas T, Dutta A. 2009. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer* 9:400-414.
- Abbastabar M, Kheyrollah M, Azizian K, Bagherlou N, Tehrani SS, Maniati M, Karimian A. 2018. Multiple functions of p27 in cell cycle, apoptosis, epigenetic modification and transcriptional regulation for the control of cell growth: A double-edged sword protein. *DNA Repair (Amst.)* 69:63-72.
- Abbott DH, Barnett DK, Bruns CM, Dumesic DA. 2005. Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome? *Hum Reprod Update* 11:357-374.
- Abbott DH, Dumesic DA, Eisner JR, Colman RJ, Kemnitz JW. 1998. Insights into the development of polycystic ovary syndrome (PCOS) from studies of prenatally androgenized female rhesus monkeys. *Trends Endocrinol. Metab.* 9:62-67.
- Abbott DH, Dumesic DA, Franks S. 2002. Developmental origin of polycystic ovary syndrome - a hypothesis. *J. Endocrinol.* 174:1-5.
- Abbott DH, Dumesic DA, Levine JE, Dunaif A, Padmanabhan V. 2007. Animal Models and Fetal Programming of the Polycystic Ovary Syndrome. En: Azziz R, Nestler JE, Dewailly D, editores. *Androgen Excess Disorders in Women: Polycystic Ovary Syndrome and Other Disorders.* Contemporary Endocrinology. Totowa, NJ: Humana Press. p 259-272. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-59745-179-6_23
- Abbott DH, Nicol LE, Levine JE, Xu N, Goodarzi MO, Dumesic DA. 2013. Nonhuman primate models of polycystic ovary syndrome. *Mol. Cell. Endocrinol.* 373:21-28.
- Abruzzese GA, Crisosto N, De Grava Kempinas W, Sotomayor-Zárate R. 2018. Developmental programming of the female neuroendocrine system by steroids. *J Neuroendocrinol* 30:e12632.
- Abruzzese GA, Heber MF, Campo Verde Arbocco F, Ferreira SR, Motta AB. 2019. Fetal programming by androgen excess in rats affects ovarian fuel sensors and steroidogenesis. *J Dev Orig Health Dis*:1-14.
- Abruzzese GA, Heber MF, Ferreira SR, Velez LM, Reynoso R, Pignataro OP, Motta AB. 2016. Prenatal hyperandrogenism induces alterations that affect liver lipid metabolism. *J. Endocrinol.* 230:67-79.
- Abukhdeir AM, Park BH. 2008. p21 and p27. *Expert Rev Mol Med* 10:e19.
- Adelizzi RA. 1999. COX-1 and COX-2 in health and disease. *J Am Osteopath Assoc* 99:S7-12.
- Allen RT, Cluck MW, Agrawal DK. 1998. Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *Cell. Mol. Life Sci.* 54:427-445.

- Amalfi S, Velez LM, Heber MF, Vighi S, Ferreira SR, Orozco AV, Pignataro O, Motta AB. 2012. Prenatal Hyperandrogenization Induces Metabolic and Endocrine Alterations Which Depend on the Levels of Testosterone Exposure. *PLoS ONE* 7:e37658.
- Anón. 2004. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 81:19-25.
- Anón. Anatomy and Physiology in Context | Reading Assignment: Reproductive System | Top Hat. Available from: <https://tophat.com/marketplace/science-&-math/biology/full-course/anatomy-and-physiology-in-context-john-redden-joe-crivello/797/74815/>
- Apparao KBC, Lovely LP, Gui Y, Lininger RA, Lessey BA. 2002. Elevated endometrial androgen receptor expression in women with polycystic ovarian syndrome. *Biol. Reprod.* 66:297-304.
- Arriaza CA, Mena MA, Tchernitchin AN. 1989. Prenatal androgenization selectively modifies some responses to oestrogen in the prepubertal rat uterus. *J. Endocrinol.* 120:379-384.
- Asunción M, Calvo RM, San Millán JL, Sancho J, Avila S, Escobar-Morreale HF. 2000. A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85:2434-2438.
- Avellaira C, Villavicencio A, Bacallao K, Gabler F, Wells P, Romero C, Vega M. 2006. Expression of molecules associated with tissue homeostasis in secretory endometria from untreated women with polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod.* 21:3116-3121.
- Aytan H, Caliskan AC, Demirturk F, Aytan P, Koseoglu DR. 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone reduces the size of experimental endometriosis in the rat model. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology* 47:321-325.
- Azziz R. 2005. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: a reappraisal. *Fertil. Steril.* 83:1343-1346.
- Azziz R. 2006. Diagnosis of Polycystic Ovarian Syndrome: The Rotterdam Criteria Are Premature. *None* 91:781-785.
- Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Janssen OE, Legro RS, Norman RJ, et al. 2006. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91:4237-4245.
- Badawi AF, Badr MZ. 2003. Expression of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and levels of prostaglandin E2 and 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 in human breast cancer and metastasis. *Int. J. Cancer* 103:84-90.
- Bahri Khomami M, Joham AE, Boyle JA, Piltonen T, Silagy M, Arora C, Misso ML, Teede HJ, Moran LJ. 2019. Increased maternal pregnancy complications in polycystic ovary syndrome appear to be independent of obesity-A systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Obes Rev* 20:659-674.
- Balen AH, Morley LC, Misso M, Franks S, Legro RS, Wijeyaratne CN, Stener-Victorin E, Fauser BCJM, Norman RJ, et al. 2016. The management of anovulatory infertility in women with

polycystic ovary syndrome: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance. *Hum Reprod Update* 22:687-708.

Balen AH, Rutherford AJ. 2007. Managing anovulatory infertility and polycystic ovary syndrome. *BMJ* 335:663-666.

Barbieri RL, Hornstein MD. 1988. Hyperinsulinemia and ovarian hyperandrogenism. Cause and effect. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 17:685-703.

Barker DJ. 1995. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ* 311:171-174.

Barker DJ. 1997. Maternal nutrition, fetal nutrition, and disease in later life. *Nutrition* 13:807-813.

Barker DJP. 2004. Developmental origins of adult health and disease. *J Epidemiol Community Health* 58:114-115.

Barker DJP, Eriksson JG, Forsén T, Osmond C. 2002. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol* 31:1235-1239.

Barouki R, Gluckman PD, Grandjean P, Hanson M, Heindel JJ. 2012. Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. *Environ Health* 11:42.

Bartsch H, Nair J. 2006. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbeck's Archives of Surgery* 391:499-510.

Berger J, Moller DE. 2002. The mechanisms of action of PPARs. *Annu. Rev. Med.* 53:409-435.

Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. 2008. CDK Inhibitors: Cell Cycle Regulators and Beyond. *Developmental Cell* 14:159-169.

Birch RA, Padmanabhan V, Foster DL, Unsworth WP, Robinson JE. 2003. Prenatal programming of reproductive neuroendocrine function: fetal androgen exposure produces progressive disruption of reproductive cycles in sheep. *Endocrinology* 144:1426-1434.

Björnström L, Sjöberg M. 2005. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol. Endocrinol.* 19:833-842.

Bloch-Damti A, Bashan N. 2005. Proposed Mechanisms for the Induction of Insulin Resistance by Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling* 7:1553-1567.

Bogacka I, Kurzynska A, Bogacki M, Chojnowska K. 2015. Peroxisome proliferator-activated receptors in the regulation of female reproductive functions. *Folia Histochem. Cytobiol.* 53:189-200.

Boomsma CM, Eijkemans MJC, Hughes EG, Visser GHA, Fauser BCJM, Macklon NS. 2006. A meta-analysis of pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod. Update* 12:673-683.

Bracho GS, Altamirano GA, Kass L, Luque EH, Bosquiazzo VL. 2019. Hyperandrogenism Induces Histo-Architectural Changes in the Rat Uterus. *Reprod Sci* 26:657-668.

- Bremer AA, Miller WL. 2008. The serine phosphorylation hypothesis of polycystic ovary syndrome: a unifying mechanism for hyperandrogenemia and insulin resistance. *Fertility and Sterility* 89:1039-1048.
- Buckley CH, Fox H. 1989. *Biopsy Pathology of the Endometrium*. Books on Demand.
- Buege JA, Aust SD. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* 52:302-310.
- Bussen S, Sütterlin M, Steck T. 1999. Endocrine abnormalities during the follicular phase in women with recurrent spontaneous abortion. *Hum. Reprod.* 14:18-20.
- Cammas L, Reinaud P, Bordas N, Dubois O, Germain G, Charpigny G. 2006. Developmental regulation of prostacyclin synthase and prostacyclin receptors in the ovine uterus and conceptus during the peri-implantation period. *Reproduction* 131:917-927.
- Cano F, García-Velasco JA, Millet A, Remohí J, Simón C, Pellicer A. 1997. Oocyte quality in polycystic ovaries revisited: identification of a particular subgroup of women. *J. Assist. Reprod. Genet.* 14:254-261.
- Chabbert Buffet N, Djakoure C, Maitre SC, Bouchard P. 1998. Regulation of the human menstrual cycle. *Front Neuroendocrinol* 19:151-186.
- Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA. 2003. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 17:590-603.
- Chen R, He F, He H, York JP, Liu W, Xia X. 2018. Phosphorylation of P27 by AKT is required for inhibition of cell cycle progression in cholangiocarcinoma. *Digestive and Liver Disease* 50:501-506.
- Chen Z-J, Zhao H, He L, Shi Y, Qin Y, Shi Y, Li Z, You L, Zhao J, et al. 2011. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for polycystic ovary syndrome on chromosome 2p16.3, 2p21 and 9q33.3. *Nat. Genet.* 43:55-59.
- Cheung AP. 2001. Ultrasound and menstrual history in predicting endometrial hyperplasia in polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol* 98:325-331.
- Cloke B, Christian M. 2012. The role of androgens and the androgen receptor in cycling endometrium. *Mol. Cell. Endocrinol.* 358:166-175.
- Cohen. 2006. Nuclear receptor corepressors and PPAR-gamma. *Nuclear Receptor Signaling* [Internet] 4. Available from: <https://www.nursa.org/NRS/nrs04003.pdf>
- Conneely OM, Mulac-Jericevic B, DeMayo F, Lydon JP, O'Malley BW. 2002. Reproductive functions of progesterone receptors. *Recent Prog. Horm. Res.* 57:339-355.
- Coyne GS, Kenny DA, Childs S, Sreenan JM, Waters SM. 2008. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids alter the expression of genes involved in prostaglandin biosynthesis in the bovine uterus. *Theriogenology* 70:772-782.
- Critchley HO, Brenner RM, Henderson TA, Williams K, Nayak NR, Slayden OD, Millar MR, Saunders PT. 2001. Estrogen receptor beta, but not estrogen receptor alpha, is present

- in the vascular endothelium of the human and nonhuman primate endometrium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86:1370-1378.
- Crosio C, Fimia GM, Loury R, Kimura M, Okano Y, Zhou H, Sen S, Allis CD, Sassone-Corsi P. 2002. Mitotic Phosphorylation of Histone H3: Spatio-Temporal Regulation by Mammalian Aurora Kinases. *Mol Cell Biol* 22:874-885.
- Cui Y, Miyoshi K, Claudio E, Siebenlist UK, Gonzalez FJ, Flaws J, Wagner K-U, Hennighausen L. 2002. Loss of the peroxisome proliferation-activated receptor gamma (PPARgamma) does not affect mammary development and propensity for tumor formation but leads to reduced fertility. *J. Biol. Chem.* 277:17830-17835.
- Das M, Djahanbakhch O, Hacıhanefioglu B, Saridogan E, Ikram M, Ghali L, Raveendran M, Storey A. 2008. Granulosa cell survival and proliferation are altered in Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 93:881-887.
- Demacopulo B, Kreimann EL. 2019. Bisphenol S increases EZRIN expression and the detrimental effects induced by dehydroepiandrosterone in rat endometrium. *Mol. Cell. Endocrinol.* 483:64-73.
- Demirturk F, Aytan H, Caliskan AC, Aytan P, Koseoglu DR. 2006. Effect of Peroxisome Proliferator—Activated Receptor- γ Agonist Rosiglitazone on the Induction of Endometriosis in an Experimental Rat Model. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 13:58-62.
- Demissie M, Lazic M, Foecking EM, Aird F, Dunaif A, Levine JE. 2008. Transient prenatal androgen exposure produces metabolic syndrome in adult female rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295:E262-268.
- Diñcer Y, Akcay T, Erdem T, Saygılı E, Gundogdu S. 2005. DNA damage, DNA susceptibility to oxidation and glutathione level in women with polycystic ovary syndrome. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 65:721-728.
- Dixon D, Reed CE, Moore AB, Gibbs-Flournoy EA, Hines EP, Wallace EA, Stanko JP, Lu Y, Jefferson WN, et al. 2012. Histopathologic changes in the uterus, cervix and vagina of immature CD-1 mice exposed to low doses of perfluorooctanoic acid (PFOA) in a uterotrophic assay. *Reprod. Toxicol.* 33:506-512.
- Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W. 1992. Control of the peroxisomal β -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68:879-887.
- Dumesic DA, Lobo RA. 2013. Cancer risk and PCOS. *Steroids* 78:782-785.
- Dunaif A. 1997. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr. Rev.* 18:774-800.
- Dunaif A, Graf M. 1989. Insulin administration alters gonadal steroid metabolism independent of changes in gonadotropin secretion in insulin-resistant women with the polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Invest.* 83:23-29.
- Dunn-Albanese LR, Ackerman WE, Xie Y, Iams JD, Kniss DA. 2004. Reciprocal expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and cyclooxygenase-2 in human term parturition. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 190:809-816.

- Ehrmann DA. 2005. Polycystic ovary syndrome. *N. Engl. J. Med.* 352:1223-1236.
- Eisner JR, Barnett MA, Dumesic DA, Abbott DH. 2002. Ovarian hyperandrogenism in adult female rhesus monkeys exposed to prenatal androgen excess. *Fertil. Steril.* 77:167-172.
- Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35:495-516.
- Erickson GF, Magoffin DA, Garzo VG, Cheung AP, Chang RJ. 1992. Granulosa cells of polycystic ovaries: are they normal or abnormal? *Hum. Reprod.* 7:293-299.
- Escobar-Morreale HF, Luque-Ramírez M, San Millán JL. 2005. The molecular-genetic basis of functional hyperandrogenism and the polycystic ovary syndrome. *Endocr. Rev.* 26:251-282.
- Eyster KM. 2016. The Estrogen Receptors: An Overview from Different Perspectives. *Methods Mol. Biol.* 1366:1-10.
- Falchi L, Scaramuzzi RJ. 2013. The expression of ER α , OTR, cPLA2, COX-2, and PPAR γ in the cervix of the ewe during the estrous cycle. *Theriogenology* 79:40-47.
- Ferenczy A, Bergeron C. 1991. Histology of the human endometrium: from birth to senescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 622:6-27.
- Ferenczy A, Bertrand G, Gelfand MM. 1979. Proliferation kinetics of human endometrium during the normal menstrual cycle. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 133:859-867.
- Ferenczy AS, Guralnick MS. 1983. Endometrial Microstructure: Structure-Function Relationships Throughout the Menstrual Cycle.
- Ferreira SR, Vélez LM, F Heber M, Abruzzese GA, Motta AB. 2019. Prenatal androgen excess alters the uterine peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) system. *Reprod. Fertil. Dev.*
- Finck BN. 2006. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *Journal of Clinical Investigation* 116:615-622.
- Finn CA. 1977. The Implantation Reaction. En: Wynn RM, editor. *Biology of the Uterus*. Boston, MA: Springer US. p 245-308. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2271-9_9
- Foecking EM, McDevitt MA, Acosta-Martínez M, Horton TH, Levine JE. 2008. Neuroendocrine consequences of androgen excess in female rodents. *Hormones and Behavior* 53:673-692.
- Foreman JE, Sorg JM, McGinnis KS, Rigas B, Williams JL, Clapper ML, Gonzalez FJ, Peters JM. 2009. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta by the APC/beta-CATENIN pathway and nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Mol. Carcinog.* 48:942-952.
- Fowden AL. 2003. The insulin-like growth factors and feto-placental growth. *Placenta* 24:803-812.

- Fowden AL, Forhead AJ. 2004. Endocrine mechanisms of intrauterine programming. *Reproduction* 127:515-526.
- Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, Panayiotidis MI. 2008. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Letters* 266:6-11.
- Franks S. 1995. Polycystic ovary syndrome. *N. Engl. J. Med.* 333:853-861.
- Franks S, Stark J, Hardy K. 2008. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod. Update* 14:367-378.
- Froment P, Gizard F, Defever D, Staels B, Dupont J, Monget P. 2006. Peroxisome proliferator-activated receptors in reproductive tissues: from gametogenesis to parturition. *J. Endocrinol.* 189:199-209.
- Gao Y, Li S, Li Q. 2014. Uterine epithelial cell proliferation and endometrial hyperplasia: evidence from a mouse model. *Mol Hum Reprod* 20:776-786.
- Giudice LC. 2006. Endometrium in PCOS: Implantation and predisposition to endocrine CA. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 20:235-244.
- Gluckman PD, Hanson MA, Buklijas T. 2010. A conceptual framework for the developmental origins of health and disease. *J Dev Orig Health Dis* 1:6-18.
- Gluckman PD, Hanson MA, Low FM. 2011. The role of developmental plasticity and epigenetics in human health. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 93:12-18.
- Golstein P, Aubry L, Levraud J-P. 2003. Cell-death alternative model organisms: why and which? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:798-807.
- Gompel A, Sabourin JC, Martin A, Yaneva H, Audouin J, Decroix Y, Poitout P. 1994. Bcl-2 expression in normal endometrium during the menstrual cycle. *Am J Pathol* 144:1195-1202.
- González F, Minium J, Rote NS, Kirwan JP. 2005. Hyperglycemia Alters Tumor Necrosis Factor- α Release from Mononuclear Cells in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *None* 90:5336-5342.
- González F, Rote NS, Minium J, Kirwan JP. 2009. Evidence of proatherogenic inflammation in polycystic ovary syndrome. *Metabolism - Clinical and Experimental* 58:954-962.
- Gregory CW, Wilson EM, Apparao KBC, Lininger RA, Meyer WR, Kowalik A, Fritz MA, Lessey BA. 2002. Steroid receptor coactivator expression throughout the menstrual cycle in normal and abnormal endometrium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87:2960-2966.
- Guerra MT, Sanabria M, Grossman G, Petrusz P, Kempinas W de G. 2013. Excess androgen during perinatal life alters steroid receptor expression, apoptosis, and cell proliferation in the uteri of the offspring. *Reproductive Toxicology* 40:1-7.
- Gunin A. 2004. Effects of peroxisome proliferator activated receptors-alpha and -gamma agonists on estradiol-induced proliferation and hyperplasia formation in the mouse uterus. *Journal of Endocrinology* 182:229-239.

- Gustafsson A, Hansson E, Kressner U, Nordgren S, Andersson M, Wang W, Lönnroth C, Lundholm K. 2007. EP1-4 subtype, COX and PPAR gamma receptor expression in colorectal cancer in prediction of disease-specific mortality. *Int. J. Cancer* 121:232-240.
- Hakim C, Padmanabhan V, Vyas AK. 2017. Gestational Hyperandrogenism in Developmental Programming. *Endocrinology* 158:199-212.
- Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC, Stoneman VE, Longthorne VL, Culhane AC, Williams GT. 1996. Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur. J. Biochem.* 236:1-26.
- Hanson MA, Gluckman PD. 2015. Developmental origins of health and disease--global public health implications. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 29:24-31.
- Hapangama DK, Kamal AM, Bulmer JN. 2015. Estrogen receptor β : the guardian of the endometrium. *Hum Reprod Update* 21:174-193.
- Hart R, Sloboda DM, Doherty DA, Norman RJ, Atkinson HC, Newnham JP, Dickinson JE, Hickey M. 2010. Circulating maternal testosterone concentrations at 18 weeks of gestation predict circulating levels of antimüllerian hormone in adolescence: a prospective cohort study. *Fertil. Steril.* 94:1544-1547.
- Heber MF, Ferreira SR, Abruzzese GA, Raices T, Pignataro OP, Vega M, Motta AB. 2019. Metformin improves ovarian insulin signaling alterations caused by fetal programming. *J. Endocrinol.*
- Heber MF, Ferreira SR, Vélez LM, Motta AB. 2013. Prenatal hyperandrogenism and lipid profile during different age stages: an experimental study. *Fertil. Steril.* 99:551-557.
- Heindel JJ, Balbus J, Birnbaum L, Brune-Drisse MN, Grandjean P, Gray K, Landrigan PJ, Sly PD, Suk W, et al. 2015. Developmental Origins of Health and Disease: Integrating Environmental Influences. *Endocrinology* 156:3416-3421.
- Hines M. 2006. Prenatal testosterone and gender-related behaviour. *Eur. J. Endocrinol.* 155 Suppl 1:S115-121.
- Hiort O. 2013. The differential role of androgens in early human sex development. *BMC Med* 11:152.
- Ho S-M, Cheong A, Adgent MA, Veevers J, Suen AA, Tam NNC, Leung Y-K, Jefferson WN, Williams CJ. 2017. Environmental Factors, Epigenetics, and Developmental Origin of Reproductive Disorders. *Reprod Toxicol* 68:85-104.
- Homburg R, Eshel A, Kilborn J, Adams J, Jacobs HS. 1990. Combined luteinizing hormone releasing hormone analogue and exogenous gonadotrophins for the treatment of infertility associated with polycystic ovaries. *Hum. Reprod.* 5:32-35.
- Horie K, Takakura K, Imai K, Liao S, Mori T. 1992. Immunohistochemical localization of androgen receptor in the human endometrium, decidua, placenta and pathological conditions of the endometrium. *Hum. Reprod.* 7:1461-1466.
- van Houten ELAF, Visser JA. 2014. Mouse models to study polycystic ovary syndrome: a possible link between metabolism and ovarian function? *Reprod Biol* 14:32-43.

- Huang J-C. 2008. The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in the Development and Physiology of Gametes and Preimplantation Embryos. *PPAR Research* 2008:1-7.
- Irwin JC, Utian WH, Eckert RL. 1991. Sex steroids and growth factors differentially regulate the growth and differentiation of cultured human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 129:2385-2392.
- Issemann I, Green S. 1990. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347:645-650.
- Iwai M, Kanzaki H, Fujimoto M, Kojima K, Hatayama H, Inoue T, Higuchi T, Nakayama H, Mori T, et al. 1995. Regulation of sex steroid receptor gene expression by progesterone and testosterone in cultured human endometrial stromal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80:450-454.
- Jaiswal PK, Goel A, Mittal RD. 2015. Survivin: A molecular biomarker in cancer. *Indian J Med Res* 141:389-397.
- Jeanes YM, Reeves S. 2017a. Metabolic consequences of obesity and insulin resistance in polycystic ovary syndrome: diagnostic and methodological challenges. *Nutr Res Rev* 30:97-105.
- Jeanes YM, Reeves S. 2017b. Metabolic consequences of obesity and insulin resistance in polycystic ovary syndrome: diagnostic and methodological challenges. *Nutr Res Rev* 30:97-105.
- Kaczanowski S. 2016. Apoptosis: its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging. *Phys Biol* 13:031001.
- Kadam L, Kohan-Ghadr HR, Drewlo S. 2015. The balancing act – PPAR- γ 's roles at the maternal-fetal interface. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 61:65-71.
- Kahn BB, Flier JS. 2000. Obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106:473-481.
- Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M. 2005. Reactive Oxygen Species Promote TNF α -Induced Death and Sustained JNK Activation by Inhibiting MAP Kinase Phosphatases. *Cell* 120:649-661.
- Karim BO, Landolfi JA, Christian A, Ricart-Arbona R, Qiu W, McAlonis M, Eyabi PO, Khan KA, Dicello JF, et al. 2003. Estrous cycle and ovarian changes in a rat mammary carcinogenesis model after irradiation, tamoxifen chemoprevention, and aging. *Comp. Med.* 53:532-538.
- Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P. 1990. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* 9:1603-1614.
- Keane KN, Cruzat VF, Carlessi R, de Bittencourt PIH, Newsholme P. 2015. Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [Internet]. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2015/181643/>

- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26:239-257.
- King KL, Cidlowski JA. 1998. CELL CYCLE REGULATION AND APOPTOSIS 1.
- Kiraz Y, Adan A, Kartal Yandim M, Baran Y. 2016. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumor Biol.* 37:8471-8486.
- Kjøtrød SB, Carlsen SM, Rasmussen PE, Holst-Larsen T, Mellembakken J, Thurin-Kjellberg A, Haapaniemikouru K, Morin-Papunen L, Humaidan P, et al. 2011. Use of metformin before and during assisted reproductive technology in non-obese young infertile women with polycystic ovary syndrome: a prospective, randomized, double-blind, multi-centre study. *Hum. Reprod.* 26:2045-2053.
- Kliwer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM. 1994. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91:7355-7359.
- Knapp P, Chabowski A, Błachnio-Zabielska A, Jarząbek K, Wołczyński S. 2012. Altered Peroxisome-Proliferator Activated Receptors Expression in Human Endometrial Cancer. *PPAR Research* 2012:1-5.
- Knopfová L, šMarda J. 2010. The use of Cox-2 and PPAR γ signaling in anti-cancer therapies. *Experimental and Therapeutic Medicine* 1:257-264.
- Kokeguchi S, Hayase R, Sekiba K. 1992. Proliferative activity in normal endometrium and endometrial carcinoma measured by immunohistochemistry using Ki-67 and anti-DNA polymerase alpha antibody, and by flow cytometry. *Acta Med. Okayama* 46:113-121.
- Komar CM. 2005. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and ovarian function – implications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue remodeling. *Reprod Biol Endocrinol* 3:41.
- Konstantinopoulos PA, Vantoros GP, Sotiropoulou-Bonikou G, Kominea A, Papavassiliou AG. 2007. NF-kappaB/PPAR gamma and/or AP-1/PPAR gamma «on/off» switches and induction of CBP in colon adenocarcinomas: correlation with COX-2 expression. *Int J Colorectal Dis* 22:57-68.
- Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG. 2011. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 711:193-201.
- Kurman RJ, Kaminski PF, Norris HJ. 1985. The behavior of endometrial hyperplasia. A long-term study of «untreated» hyperplasia in 170 patients. *Cancer* 56:403-412.
- Kwon EJ, Kim YJ. 2017. What is fetal programming?: a lifetime health is under the control of in utero health. *Obstet Gynecol Sci* 60:506-519.
- Lacau de Mengido I, Becú-Villalobos D, Libertun C. 1987. Sexual differences in the dopaminergic control of luteinizing hormone secretion in the developing rat. *Brain Res.* 432:91-95.

- Lacau-Mengido IM, Libertun C, Becú-Villalobos D. 1996. Different Serotonin Receptor Types Participate in 5-Hydroxytryptophan-Induced Gonadotropins and Prolactin Release in the Female Infantile Rat. *NEN* 63:415-421.
- Latini G, Del Vecchio A, Massaro M, Verrotti A, DE Felice C. 2006. In utero exposure to phthalates and fetal development. *Curr. Med. Chem.* 13:2527-2534.
- Lebovic DI, Kir M, Casey CL. 2004. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma induces regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis. *Fertility and Sterility* 82:1008-1013.
- Lebovic DI, Shifren JL, Ryan IP, Mueller MD, Korn AP, Darney PD, Taylor RN. 2000. Ovarian steroid and cytokine modulation of human endometrial angiogenesis. *Hum. Reprod.* 15 Suppl 3:67-77.
- Lecce G, Meduri G, Ancelin M, Bergeron C, Perrot-Applanat M. 2001. Presence of estrogen receptor beta in the human endometrium through the cycle: expression in glandular, stromal, and vascular cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86:1379-1386.
- Lee JY, Baw C-K, Gupta S, Agarwal NA and A. 2010. Role of Oxidative Stress in Polycystic Ovary Syndrome. *Current Women's Health Reviews* [Internet]. Available from: <http://www.eurekaselect.com/86322/article>
- Lehrke M, Lazar MA. 2005. The Many Faces of PPAR γ . *Cell* 123:993-999.
- Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C, Castelbaum A, Albelda SM, Buck CA. 1992. Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J Clin Invest* 90:188-195.
- Lessey BA, Killam AP, Metzger DA, Haney AF, Greene GL, McCarty KS. 1988. Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 67:334-340.
- Lessey BA, Yeh I, Castelbaum AJ, Fritz MA, Ilesanmi AO, Korzeniowski P, Sun J, Chwalisz K. 1996. Endometrial progesterone receptors and markers of uterine receptivity in the window of implantation. *Fertil. Steril.* 65:477-483.
- Lessey BA, Young SL. 2014. Homeostasis imbalance in the endometrium of women with implantation defects: the role of estrogen and progesterone. *Semin. Reprod. Med.* 32:365-375.
- Li Q, Du J, Feng R, Xu Y, Wang H, Sang Q, Xing Q, Zhao X, Jin L, et al. 2014. A Possible New Mechanism in the Pathophysiology of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The Discovery That Leukocyte Telomere Length Is Strongly Associated With PCOS. *None* 99:E234-E240.
- Li X, Pishdari B, Cui P, Hu M, Yang H-P, Guo Y-R, Jiang H-Y, Feng Y, Billig H, et al. 2015. Regulation of Androgen Receptor Expression Alters AMPK Phosphorylation in the Endometrium: In Vivo and In Vitro Studies in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *Int. J. Biol. Sci.* 11:1376-1389.
- Li Z, Huang H. 2008. Epigenetic abnormality: a possible mechanism underlying the fetal origin of polycystic ovary syndrome. *Med. Hypotheses* 70:638-642.

- Liang J, Slingerland JM. 2003. Multiple Roles of the PI3K/PKB (Akt) Pathway in Cell Cycle Progression. *Cell Cycle* 2:336-342.
- Lim H, Dey SK. 2000. PPAR δ Functions as a Prostacyclin Receptor in Blastocyst Implantation. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 11:137-142.
- Liu A, Zhang D, Yang X, Song Y. 2019a. Estrogen receptor alpha activates MAPK signaling pathway to promote the development of endometrial cancer. *J. Cell. Biochem.* 120:17593-17601.
- Liu L, Yin T-L, Chen Y, Li Y, Yin L, Ding J, Yang J, Feng H-L. 2019b. Follicular dynamics of glycerophospholipid and sphingolipid metabolisms in polycystic ovary syndrome patients. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 185:142-149.
- Lo JC, Feigenbaum SL, Escobar GJ, Yang J, Crites YM, Ferrara A. 2006a. Increased Prevalence of Gestational Diabetes Mellitus Among Women With Diagnosed Polycystic Ovary Syndrome: A population-based study. *Diabetes Care* 29:1915-1917.
- Lo JC, Feigenbaum SL, Yang J, Pressman AR, Selby JV, Go AS. 2006b. Epidemiology and adverse cardiovascular risk profile of diagnosed polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91:1357-1363.
- Lockshin RA, Zakeri Z. 2001. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:545-550.
- Louwers YV, Stolk L, Uitterlinden AG, Laven JSE. 2013. Cross-ethnic meta-analysis of genetic variants for polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98:E2006-2012.
- Lovely LP, Appa Rao KBC, Gui Y, Lessey BA. 2000. Characterization of androgen receptors in a well-differentiated endometrial adenocarcinoma cell line (Ishikawa). *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 74:235-241.
- Lu J, Wang Z, Cao J, Chen Y, Dong Y. 2018. A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol [Internet]* 16. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6102891/>
- Lu X, Toki T, Konishi I, Nikaido T, Fujii S. 1998. Expression of p21WAF1/CIP1 in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 82:2409-2417.
- Lucas A. 1991. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found. Symp.* 156:38-50; discussion 50-55.
- Lujan ME, Chizen DR, Pierson RA. 2008. Diagnostic Criteria for Polycystic Ovary Syndrome: Pitfalls and Controversies. *J Obstet Gynaecol Can* 30:671-679.
- Ma X, Zhao Y, Li Y, Lu H, He Y. 2010. Relevance of Bcl-x expression in different types of endometrial tissues. *J Exp Clin Cancer Res* 29:14.
- MacLaren LA, Guzeloglu A, Michel F, Thatcher WW. 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) expression in cultured bovine endometrial cells and response to omega-3 fatty acid, growth hormone and agonist stimulation in relation to series 2 prostaglandin production. *Domestic Animal Endocrinology* 30:155-169.

- Maliqueo M, Benrick A, Stener-Victorin E. 2014. Rodent models of polycystic ovary syndrome: phenotypic presentation, pathophysiology, and the effects of different interventions. *Semin. Reprod. Med.* 32:183-193.
- Maliqueo M, Clementi M, Gabler F, Johnson MC, Palomino A, Sir-Petermann T, Vega M. 2003. Expression of steroid receptors and proteins related to apoptosis in endometria of women with polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.* 80 Suppl 2:812-819.
- Manikkam M, Steckler TL, Welch KB, Inskoop EK, Padmanabhan V. 2006. Fetal programming: prenatal testosterone treatment leads to follicular persistence/luteal defects; partial restoration of ovarian function by cyclic progesterone treatment. *Endocrinology* 147:1997-2007.
- Martin H. 2010. Role of PPAR-gamma in inflammation. Prospects for therapeutic intervention by food components. *Mutat. Res.* 690:57-63.
- Martinez Calejman C, Astort F, Di Gruccio JM, Repetto EM, Mercau M, Giordanino E, Sanchez R, Pignataro O, Arias P, et al. 2011. Lipopolysaccharide stimulates adrenal steroidogenesis in rodent cells by a NFκB-dependent mechanism involving COX-2 activation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 337:1-6.
- Mason HD, Willis DS, Beard RW, Winston RM, Margara R, Franks S. 1994. Estradiol production by granulosa cells of normal and polycystic ovaries: relationship to menstrual cycle history and concentrations of gonadotropins and sex steroids in follicular fluid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79:1355-1360.
- Melo AS, Ferriani RA, Navarro PA. 2015. Treatment of infertility in women with polycystic ovary syndrome: approach to clinical practice. *Clinics (Sao Paulo)* 70:765-769.
- Mertens HJ, Heineman MJ, Koudstaal J, Theunissen P, Evers JL. 1996. Androgen receptor content in human endometrium. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 70:11-13.
- Mertens HJ, Heineman MJ, Theunissen PH, de Jong FH, Evers JL. 2001. Androgen, estrogen and progesterone receptor expression in the human uterus during the menstrual cycle. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 98:58-65.
- Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, Giles FJ. 2008. Survivin: Key Regulator of Mitosis and Apoptosis and Novel Target for Cancer Therapeutics. *Clin Cancer Res* 14:5000-5005.
- Möller B, Rasmussen C, Lindblom B, Olovsson M. 2001. Expression of the angiogenic growth factors VEGF, FGF-2, EGF and their receptors in normal human endometrium during the menstrual cycle. *Mol. Hum. Reprod.* 7:65-72.
- Motta AB. 2010. Dehydroepiandrosterone to induce murine models for the study of polycystic ovary syndrome. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 119:105-111.
- Müller R, Rieck M, Müller-Brüsselbach S. 2008. Regulation of Cell Proliferation and Differentiation by PPAR β / δ. *PPAR Research* 2008:1-5.
- Mustaniemi S, Väärasmäki M, Eriksson JG, Gissler M, Laivuori H, Ijäs H, Bloigu A, Kajantie E, Morin-Papunen L. 2018. Polycystic ovary syndrome and risk factors for gestational diabetes. *Endocr Connect* 7:859-869.

- Nada SE, Thompson RC, Padmanabhan V. 2010. Developmental programming: differential effects of prenatal testosterone excess on insulin target tissues. *Endocrinology* 151:5165-5173.
- Nagata D, Yoshihiro H, Nakanishi M, Naruyama H, Okada S, Ando R, Tozawa K, Kohri K. 2008. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and growth inhibition by its ligands in prostate cancer. *Cancer Detect. Prev.* 32:259-266.
- Nickkho-Amiry M, McVey R, Holland C. 2012. Peroxisome proliferator-activated receptors modulate proliferation and angiogenesis in human endometrial carcinoma. *Mol. Cancer Res.* 10:441-453.
- Nishimura K, Yamauchi N, Chowdhury VS, Torii M, Hattori M, Kaneto M. 2011. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor isoforms in the rat uterus during early pregnancy. *Cell and Tissue Research* 345:275-284.
- Nonneman DJ, Ganjam VK, Welshons WV, Vom Saal FS. 1992. Intrauterine position effects on steroid metabolism and steroid receptors of reproductive organs in male mice. *Biol. Reprod.* 47:723-729.
- Noyes RW, Hertig AT, Rock J. 1975. Dating the endometrial biopsy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 122:262-263.
- Nurse P. 1994. Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* 79:547-550.
- Odom LD, Michael Barrett J, Pantazis CG, Stoddard LD, McDonough PG. 1989. Immunocytochemical study of ras and myc proto-oncogene polypeptide expression in the human menstrual cycle. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 161:1663-1668.
- Okon MA, Laird SM, Tuckerman EM, Li TC. 1998. Serum androgen levels in women who have recurrent miscarriages and their correlation with markers of endometrial function. *Fertil. Steril.* 69:682-690.
- Ota K, Ito K, Suzuki T, Saito S, Tamura M, Hayashi S, Okamura K, Sasano H, Yaegashi N. 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and growth inhibition by its ligands in uterine endometrial carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 12:4200-4208.
- Padmanabhan V, Salvetti NR, Matiller V, Ortega HH. 2014. Developmental programming: prenatal steroid excess disrupts key members of intraovarian steroidogenic pathway in sheep. *Endocrinology* 155:3649-3660.
- Padmanabhan V, Veiga-Lopez A. 2013a. Sheep models of polycystic ovary syndrome phenotype. *Mol. Cell. Endocrinol.* 373:8-20.
- Padmanabhan V, Veiga-Lopez A. 2013b. Sheep models of polycystic ovary syndrome phenotype. *Mol. Cell. Endocrinol.* 373:8-20.
- Paixão L, Ramos RB, Lavarda A, Morsh DM, Spritzer PM. 2017. Animal models of hyperandrogenism and ovarian morphology changes as features of polycystic ovary syndrome: a systematic review. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 15:12.

- Palomba S, Falbo A, Russo T, Battista L, Tolino A, Orio F, Zullo F. 2010. Uterine blood flow in pregnant patients with polycystic ovary syndrome: relationships with clinical outcomes. *BJOG* 117:711-721.
- Palomba S, de Wilde MA, Falbo A, Koster MPH, La Sala GB, Fauser BCJM. 2015. Pregnancy complications in women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction Update* 21:575-592.
- Papaoiannou S, Tzafettas J. 2010. Anovulation with or without PCO, hyperandrogenaemia and hyperinsulinaemia as promoters of endometrial and breast cancer. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 24:19-27.
- Patel KM, Wright KL, Whittaker P, Chakravarty P, Watson ML, Ward SG. 2005. Differential modulation of COX-2 expression in A549 airway epithelial cells by structurally distinct PPAR(γ) agonists: evidence for disparate functional effects which are independent of NF-(κ)B and PPAR(γ). *Cell. Signal.* 17:1098-1110.
- Philipp-Staheli J, Payne SR, Kemp CJ. 2001. p27(Kip1): regulation and function of a haploinsufficient tumor suppressor and its misregulation in cancer. *Exp. Cell Res.* 264:148-168.
- Pillay OC, Te Fong LFW, Crow JC, Benjamin E, Mould T, Atiomo W, Menon PA, Leonard AJ, Hardiman P. 2006. The association between polycystic ovaries and endometrial cancer. *Hum. Reprod.* 21:924-929.
- Plaza-Parrochia F, Romero C, Valladares L, Vega M. 2017. Endometrium and steroids, a pathologic overview. *Steroids* 126:85-91.
- Press MF, Udove JA, Greene GL. 1988. Progesterone receptor distribution in the human endometrium. Analysis using monoclonal antibodies to the human progesterone receptor. *Am J Pathol* 131:112-124.
- Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92:829-839.
- Rango U von, Classen-Linke I, Krusche CA, Beier HM. 1998. The receptive endometrium is characterized by apoptosis in the glands. *Human reproduction* 13:3177-3189.
- Recabarren SE, Padmanabhan V, Codner E, Lobos A, Durán C, Vidal M, Foster DL, Sir-Petermann T. 2005. Postnatal developmental consequences of altered insulin sensitivity in female sheep treated prenatally with testosterone. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289:E801-806.
- Renehan AG, Booth C, Potten CS. 2001. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ* 322:1536-1538.
- Repaci A, Gambineri A, Pasquali R. 2011. The role of low-grade inflammation in the polycystic ovary syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology* 335:30-41.
- Rodriguez Paris V, Bertoldo MJ. 2019. The Mechanism of Androgen Actions in PCOS Etiology. *Med Sci (Basel)* 7.

- Rosenfield RL, Ehrmann DA. 2016. The Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The Hypothesis of PCOS as Functional Ovarian Hyperandrogenism Revisited. *Endocr Rev* 37:467-520.
- Ruhul Quddus M, Latkovich P, Castellani WJ, James Sung C, Steinhoff MM, Briggs RC, Miranda RN. 2002. Expression of cyclin D1 in normal, metaplastic, hyperplastic endometrium and endometrioid carcinoma suggests a role in endometrial carcinogenesis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 126:459-463.
- Rumi M a. K, Ishihara S, Kazumori H, Kadowaki Y, Kinoshita Y. 2004. Can PPAR gamma ligands be used in cancer therapy? *Curr Med Chem Anticancer Agents* 4:465-477.
- vom Saal FS. 1981. Variation in phenotype due to random intrauterine positioning of male and female fetuses in rodents. *J. Reprod. Fertil.* 62:633-650.
- Sagle M, Bishop K, Ridley N, Alexander FM, Michel M, Bonney RC, Beard RW, Franks S. 1988. Recurrent early miscarriage and polycystic ovaries. *BMJ* 297:1027-1028.
- Sasaki H, Tanahashi M, Yukiue H, Moiriyama S, Kobayashi Y, Nakashima Y, Kaji M, Kiriya M, Fukai I, et al. 2002. Decreased peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene expression was correlated with poor prognosis in patients with lung cancer. *Lung Cancer* 36:71-76.
- Sasano H, Harada N. 1998. Intratumoral Aromatase in Human Breast, Endometrial, and Ovarian Malignancies. *Endocr Rev* 19:593-607.
- Sastre ME, Prat MO, Checa MA, Carreras RC. 2009. Current trends in the treatment of polycystic ovary syndrome with desire for children. *Ther Clin Risk Manag* 5:353-360.
- Sato H, Ishihara S, Kawashima K, Moriyama N, Suetsugu H, Kazumori H, Okuyama T, Rumi MA, Fukuda R, et al. 2000. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)gamma in gastric cancer and inhibitory effects of PPARgamma agonists. *Br. J. Cancer* 83:1394-1400.
- Scicchitano P, Dentamaro I, Carbonara R, Bulzis G, Dachille A, Caputo P, Riccardi R, Locorotondo M, Mandurino C, et al. 2012. Cardiovascular Risk in Women With PCOS. *Int J Endocrinol Metab* 10:611-618.
- Sheehan MT. 2004. Polycystic ovarian syndrome: diagnosis and management. *Clin Med Res* 2:13-27.
- Sheldrick ELR, Derecka K, Marshall E, Chin EC, Hodges L, Wathes DC, Abayasekara DRE, Flint APF. 2007. Peroxisome-proliferator-activated receptors and the control of levels of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 by arachidonic acid in the bovine uterus. *Biochemical Journal* 406:175-183.
- Sherr CJ, Roberts JM. 1995. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 9:1149-1163.
- Sherr CJ, Roberts JM. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13:1501-1512.

- Shi Y, Zhao H, Shi Y, Cao Y, Yang D, Li Z, Zhang B, Liang X, Li T, et al. 2012. Genome-wide association study identifies eight new risk loci for polycystic ovary syndrome. *Nat. Genet.* 44:1020-1025.
- Shiozawa T, Nikaido T, Nakayama K, Lu X, Fujii S. 1998. Involvement of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in growth inhibition of endometrium in the secretory phase and of hyperplastic endometrium treated with progesterone. *Mol. Hum. Reprod.* 4:899-905.
- Simitsidellis I, Saunders PTK, Gibson DA. 2017. Androgens and endometrium: New insights and new targets. *Molecular and Cellular Endocrinology* [Internet]. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0303720717305075>
- Sirmans SM, Pate KA. 2013. Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome. *Clin Epidemiol* 6:1-13.
- Sir-Petermann T, Hitchensfeld C, Maliqueo M, Codner E, Echiburú B, Gazitúa R, Recabarren S, Cassorla F. 2005. Birth weight in offspring of mothers with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 20:2122-2126.
- Slayden OD, Nayak NR, Burton KA, Chwalisz K, Cameron ST, Critchley HO, Baird DT, Brenner RM. 2001. Progesterone antagonists increase androgen receptor expression in the rhesus macaque and human endometrium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86:2668-2679.
- Sobolewski C, Cerella C, Dicato M, Ghibelli L, Diederich M. 2010. The Role of Cyclooxygenase-2 in Cell Proliferation and Cell Death in Human Malignancies. *International Journal of Cell Biology* 2010:1-21.
- Socha BM, Łupicka M, Szczepańska AA, Korzekwa AJ. 2017. PPAR expression throughout the oestrous cycle in the bovine endometrium. *Theriogenology* 100:88-94.
- Speroff L, Fritz MA. 2005. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Steckler TL, Roberts EK, Doop DD, Lee TM, Padmanabhan V. 2007. Developmental programming in sheep: administration of testosterone during 60-90 days of pregnancy reduces breeding success and pregnancy outcome. *Theriogenology* 67:459-467.
- Strzalka W, Ziemienowicz A. 2011. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Ann Bot* 107:1127-1140.
- Sun M, Maliqueo M, Benrick A, Johansson J, Shao R, Hou L, Jansson T, Wu X, Stener-Victorin E. 2012. Maternal androgen excess reduces placental and fetal weights, increases placental steroidogenesis, and leads to long-term health effects in their female offspring. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 303:E1373-1385.
- Tabibzadeh S. 1996. The signals and molecular pathways involved in human menstruation, a unique process of tissue destruction and remodelling. *Mol. Hum. Reprod.* 2:77-92.
- Tao XJ, Sayegh RA, Tilly JL, Isaacson KB. 1998. Elevated expression of the proapoptotic BCL-2 family member, BAK, in the human endometrium coincident with apoptosis during the secretory phase of the cycle. *Fertil. Steril.* 70:338-343.

- Tao XJ, Tilly KI, Maravei DV, Shifren JL, Krajewski S, Reed JC, Tilly JL, Isaacson KB. 1997. Differential expression of members of the bcl-2 gene family in proliferative and secretory human endometrium: glandular epithelial cell apoptosis is associated with increased expression of bax. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82:2738-2746.
- Tewari N, Awad S, Macdonald IA, Lobo DN. 2015. Obesity-related insulin resistance: implications for the surgical patient. *Int J Obes* 39:1575-1588.
- Tian W, Teng F, Jinping Gao EA. 2019. Estrogen and insulin synergistically promote endometrial cancer progression via crosstalk between their receptor signaling pathways. *Cancer Biology & Medicine* 16:55-65-65.
- Tietze F. 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry* 27:502-522.
- Toki T, Mori A, Shimizu M, Nikaido T, Fujii S. 1998. Localization of apoptotic cells within the human endometrium and correlation between apoptosis and p21 expression. *Mol. Hum. Reprod.* 4:1157-1164.
- Toth B, Hornung D, Scholz C, Djalali S, Friese K, Jeschke U. 2007. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: New Players in the Field of Reproduction. *American Journal of Reproductive Immunology* 58:289-310.
- Tuckerman EM, Okon MA, Li T, Laird SM. 2000. Do androgens have a direct effect on endometrial function? An in vitro study. *Fertil. Steril.* 74:771-779.
- Tulppala M, Stenman UH, Cacciatori B, Ylikorkala O. 1993. Polycystic ovaries and levels of gonadotrophins and androgens in recurrent miscarriage: prospective study in 50 women. *Br J Obstet Gynaecol* 100:348-352.
- Tyagi S, Sharma S, Gupta P, Saini A, Kaushal C. 2011. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* 2:236.
- Urbanek M. 2007. The genetics of the polycystic ovary syndrome. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3:103-111.
- Urman B, Fluker MR, Yuen BH, Fleige-Zahradka BG, Zouves CG, Moon YS. 1992. The outcome of in vitro fertilization and embryo transfer in women with polycystic ovary syndrome failing to conceive after ovulation induction with exogenous gonadotropins. *Fertil. Steril.* 57:1269-1273.
- Usadi RS, Legro RS. 2012. Reproductive impact of polycystic ovary syndrome. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 19:505-511.
- Velez LM, Abruzzese GA, Heber MF, Ferreira SR, Motta AB. 2018. Treatment with the synthetic PPAR γ ligand pioglitazone ameliorates early ovarian alterations induced by dehydroepiandrosterone in prepubertal rats. *Pharmacol Rep* 71:96-104.
- Vélez LM, Abruzzese GA, Motta AB. 2013. The biology of the peroxisome proliferator-activated receptor system in the female reproductive tract. *Curr. Pharm. Des.* 19:4641-4646.

- Verma V. 1983. Ultrastructural changes in human endometrium at different phases of the menstrual cycle and their functional significance. *Gynecol. Obstet. Invest.* 15:193-212.
- Vienonen A, Miettinen S, Bläuer M, Martikainen PM, Tomás E, Heinonen PK, Ylikomi T. 2004. Expression of nuclear receptors and cofactors in human endometrium and myometrium. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 11:104-112.
- Villavicencio A, Bacallao K, Avellaira C, Gabler F, Fuentes A, Vega M. 2006. Androgen and estrogen receptors and co-regulators levels in endometria from patients with polycystic ovarian syndrome with and without endometrial hyperplasia. *Gynecol. Oncol.* 103:307-314.
- Villavicencio A, Goyeneche A, Telleria C, Bacallao K, Gabler F, Fuentes A, Vega M. 2009. Involvement of Akt, Ras and cell cycle regulators in the potential development of endometrial hyperplasia in women with polycystic ovarian syndrome. *Gynecol. Oncol.* 115:102-107.
- Vink JM, Sadrzadeh S, Lambalk CB, Boomsma DI. 2006. Heritability of polycystic ovary syndrome in a Dutch twin-family study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91:2100-2104.
- Vitti M, Di Emidio G, Di Carlo M, Carta G, Antonosante A, Artini PG, Cimini A, Tatone C, Benedetti E. 2016. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Female Reproduction and Fertility. *PPAR Research* 2016:1-12.
- Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. 1994. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369:574-578.
- Wagley A, Hardiman P. 2007. Menstrual Dysfunction and Endometrial Neoplasia in the Polycystic Ovary Syndrome and Other Androgen Excess Disorders. En: Azziz R, Nestler JE, Dewailly D, editores. *Androgen Excess Disorders in Women: Polycystic Ovary Syndrome and Other Disorders. Contemporary Endocrinology.* Totowa, NJ: Humana Press. p 303-318. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-59745-179-6_27
- Walters KA. 2015. Role of androgens in normal and pathological ovarian function. *Reproduction* 149:R193-218.
- Walters KA, Allan CM, Handelsman DJ. 2012. Rodent models for human polycystic ovary syndrome. *Biol. Reprod.* 86:149, 1-12.
- Watson H, Franks S, Bonney RC. 1998. Regulation of epidermal growth factor receptor by androgens in human endometrial cells in culture. *Hum. Reprod.* 13:2585-2591.
- Weihua Z, Ekman J, Almkvist A, Saji S, Wang L, Warner M, Gustafsson J-A. 2002. Involvement of androgen receptor in 17beta-estradiol-induced cell proliferation in rat uterus. *Biol. Reprod.* 67:616-623.
- Weihua Z, Saji S, Mäkinen S, Cheng G, Jensen EV, Warner M, Gustafsson JA. 2000. Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ERalpha in the uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:5936-5941.
- Weinberg RA. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81:323-330.

- Wolf CJ, Hotchkiss A, Ostby JS, LeBlanc GA, Gray LE. 2002. Effects of prenatal testosterone propionate on the sexual development of male and female rats: a dose-response study. *Toxicol. Sci.* 65:71-86.
- Wood JR, Dumesic DA, Abbott DH, Strauss JF. 2007. Molecular abnormalities in oocytes from women with polycystic ovary syndrome revealed by microarray analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92:705-713.
- Wood RI, Foster DL. 1998. Sexual differentiation of reproductive neuroendocrine function in sheep. *Rev. Reprod.* 3:130-140.
- Xu X, Shi Y, Cui Y, Ma J, Che L, Chen Z-J. 2012. Endocrine and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome in Chinese women with different phenotypes. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 76:425-430.
- Yan X, Dai X, Wang J, Zhao N, Cui Y, Liu J. 2013. Prenatal androgen excess programs metabolic derangements in pubertal female rats. *J. Endocrinol.* 217:119-129.
- Yang J, Chen L, Zhang X, Zhou Y, Zhang D, Huo M, Guan Y. 2008. PPARs and Female Reproduction: Evidence from Genetically Manipulated Mice. *PPAR Research* 2008:1-8.
- Yang Y, Qiao J, Li R, Li M-Z. 2011. Is interleukin-18 associated with polycystic ovary syndrome? *Reproductive Biology and Endocrinology* 9:7.
- Yeh S-L, Yeh C-L, Chan S-T, Chuang C-H. 2011. Plasma rich in quercetin metabolites induces G2/M arrest by upregulating PPAR- γ expression in human A549 lung cancer cells. *Planta Med.* 77:992-998.
- Yessoufou A, Hichami A, Besnard P, Moutairou K, Khan NA. 2006. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Deficiency Increases the Risk of Maternal Abortion and Neonatal Mortality in Murine Pregnancy with or without Diabetes Mellitus: Modulation of T Cell Differentiation. *Endocrinology* 147:4410-4418.
- Yilmaz M, Bukan N, Ayvaz G, Karakoç A, Törüner F, Çakir N, Arslan M. 2005. The effects of rosiglitazone and metformin on oxidative stress and homocysteine levels in lean patients with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 20:3333-3340.
- Yu C, Markan K, Temple KA, Deplewski D, Brady MJ, Cohen RN. 2005. The nuclear receptor corepressors NCoR and SMRT decrease peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcriptional activity and repress 3T3-L1 adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 280:13600-13605.
- Zawadzki, JK, Dunaif A. 1992. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. Available from: Boston: Blackwell Scientific Publications
- Zhao P-L, Zhang Q-F, Yan L-Y, Huang S, Chen Y, Qiao J. 2014. Functional investigation on aromatase in endometrial hyperplasia in polycystic ovary syndrome cases. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 15:8975-8979.
- Ziech D, Franco R, Pappa A, Panayiotidis MI. 2011. Reactive Oxygen Species (ROS)—Induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 711:167-173.

Zielinski WJ, Vandenberg JG, Montano MM. 1991. Effects of social stress and intrauterine position on sexual phenotype in wild-type house mice (*Mus musculus*). *Physiol. Behav.* 49:117-123.

Zuo T, Zhu M, Xu W. 2016. Roles of Oxidative Stress in Polycystic Ovary Syndrome and Cancers. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016:1-14.