



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS
DEL IPN**

Departamento de Toxicología

**“Efectos tóxicos de la hiperinsulinemia sobre la
funcionalidad y la regulación transcripcional de genes
esteroidogénicos en las células de la granulosa
(murales y cúmula)”**

Tesis que presenta:

Ing. Estheisy López Bello

Para obtener el grado de Maestra en Ciencias
en la especialidad de Toxicología

Directora de tesis:

Dra. Esther Ivonne López-Bayghen Patiño

Ciudad de México

Noviembre 2020

Comité tutorial

Dra. María Isabel Hernández Ochoa
Departamento de Toxicología, Cinvestav-IPN

Dr. Arturo Ortega Soto
Departamento de Toxicología, Cinvestav-IPN

Dr. Jesús Alberto Olivares Reyes
Departamento de Bioquímica, Cinvestav-IPN

Dra. Esther Ivonne López-Bayghen Patiño
Departamento de Toxicología-IPN

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Molecular del Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Esther Ivonne López-Bayghen Patiño

Este trabajo contó con el apoyo económico del programa PEI-CONACyT, proyecto 231793 otorgado a la Dra. Esther Ivonne López-Bayghen Patiño

Agradecimientos

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional
(CINVESTAV-IPN)

Departamento de Toxicología

Directora de Tesis:

Dra. Esther Ivonne López-Bayghen Patiño

Comité evaluador:

Dra. María Isabel Hernández Ochoa
Departamento de Toxicología

Dr. Arturo Ortega Soto
Departamento de Toxicología

Dr. Jesús Alberto Olivares
Departamento de Bioquímica

A la asistencia técnica de:

Dra. Leticia Ramírez Martínez, Auxiliar de investigación, Departamento de Toxicología

M. en C. Ana Cecilia Palafox Gómez, Departamento de Toxicología

I.B.Q. Luis Cid Cid, Departamento de Toxicología

M. en C. Iván José Galván Mendoza, Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales
(LaNSE)

Dr. Francisco García Sierra, Departamento de Biología Molecular

IBT Dinorah Hernández Melchor, Instituto INGENES

Biol. Mol. Luz María Escobar Angulo, Instituto INGENES

Agradecimientos

A Dios por haberme permitido pertenecer a esta casa de estudios, por acompañarme a lo largo de mis estudios y por brindarme la oportunidad de conocer a personas maravillosas.

A mi asesora, la Dra. Esther Ivonne López-Bayghen Patiño, por darme la oportunidad de pertenecer a su laboratorio y darme el apoyo para realizar este proyecto, así como su motivación y confianza.

Agradezco a mi comité evaluador por su dedicación en la revisión de la tesis, por sus comentarios y sugerencias. A la Dra. María Isabel Hernández Ocho, al Dr. Arturo Ortega Soto y al Dr. Jesús Alberto Olivares.

Agradezco especialmente a la Dra. Leticia Ramírez Martínez, a la M. en C. Ana Cecilia Palafox González y la Ing. Lucero Cervantes quienes me apoyaron y enseñaron durante mi estancia en el laboratorio

Principalmente quiero agradecer a mis padres, a mi hermana y a mi novio, quienes estuvieron incondicionalmente conmigo a lo largo de este proceso, por a su amor, dedicación y paciencia.

Finalmente quiero agradecer a mis compañeros de generación Nuria, Andrea Ocharán, Leticia, Vanessa, Karen, Rebeca, Andrea Cazares, Adrián y Ángel por haber hecho más llevaderos los largos días de clases.

Índice

Índice de tablas	vi
Índice de figuras	vii
Abreviaturas	viii
Resumen	x
Abstract	xii
1 Introducción	1
1.1 Hiperinsulinemia	1
1.1.1 Hiperinsulinemia y sus consecuencias metabólicas	1
1.1.2 Consumo de carbohidratos e hiperinsulinemia	4
1.1.3 Síndrome de Ovario Poliquístico	7
1.2 Síndrome Metabólico	10
1.2.1 Signos	11
1.3 Fisiología del crecimiento folicular y de la maduración del ovocito	19
1.4 Justificación	25
1.5 Hipótesis	26
1.6 Objetivos	26
1.6.1 Objetivo general	26
1.6.2 Objetivos particulares	26
2 Métodos	27
2.1 Diseño experimental	27
2.2 Células de la cúmula humana	28
2.2.1 Principio	29
2.2.2 Procedimiento	29
2.3 Cultivo primario de células murales luteinizadas	29
2.3.1 Principio	29
2.3.2 Procedimiento	30
2.4 Captura de glucosa radioactiva [3H]-2-Deoxy-D-glucosa	32
2.4.1 Principio	32
2.4.2 Procedimiento	32
2.5 Extracción de ARN en células de la granulosa	33
2.5.1 Principio	33

2.5.2	Procedimiento	33
2.6	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-qPCR)	33
2.6.1	Principio	33
2.6.2	Procedimiento	34
2.7	Cuantificación de progesterona	34
2.7.1	Principio	34
2.7.2	Procedimiento	35
2.8	Inmunofluorescencia	35
2.8.1	Principio	35
2.8.2	Procedimiento	36
2.9	MTT	36
2.9.1	Principio	36
2.9.2	Procedimiento	36
2.10	Análisis estadístico	37
3	Resultados	38
3.1	Detección y cuantificación de los mensajeros de GLUT6 y SF-1	38
3.2	Modelo 1 de células de la cúmula: Efecto de la insulina sobre la captura de glucosa	41
3.2.1	Evaluación del transporte de glucosa	41
3.2.2	Expresión de GLUT6 y PTGS2 tras la exposición a insulina	43
3.3	Modelo 2 cultivo de células murales: Efecto de la insulina sobre la producción de progesterona	45
3.3.1	Viabilidad celular tras la exposición a insulina	46
3.3.2	Efecto de la insulina sobre la producción de progesterona en cultivos murales independientes	47
3.3.3	Efecto de la insulina sobre la expresión de genes de la esteroidogénesis.	49
3.3.4	Efecto de la insulina sobre la presencia de la proteína CYP11A1 en células murales	50
3.3.5	Análisis del uso de Forskolina en la producción de progesterona y en la expresión de CYP11A1	51
4	Discusión	53
5	Conclusiones	61
6	Perspectivas	61

7	Referencias	62
8	Anexos	68
8.1	Anexo 1	68
8.2	Anexo 2	69

Índice de tablas

Tabla 1. Criterios para identificar el síndrome metabólico	9
Tabla 2. Definición del síndrome de poliquistosis ovárica	11
Tabla 3. Estudios de pacientes con SOP y resistencia a la Insulina	15
Tabla 4. Factores de infertilidad asociados al SOP	17
Tabla 5. Marcadores de expresión que se utilizan para identificar células de la cúmula	28
Tabla 6. Marcadores de expresión utilizados para identificar células murales	30
Tabla 7. Características de las pacientes cuyas células se emplearon para el cultivo de células murales	31
Tabla 8. Oligonucleótidos diseñados para GLUT6 y SF-1	39
Tabla 9. Eficiencia de amplificación para los genes GLUT6 y SF-1	40
Tabla 10. Caracterización de los amplicones mediante electroforesis capilar	42
Tabla 11. Ensayo de viabilidad celular	47

Índice de figuras

Figura 1. Mecanismos moleculares de las acciones de la insulina en células de la granulosa	2
Figura 2. Síntesis de hormonas esteroideas	18

<u>Figura 3. Etapas de desarrollo del óvulo y del folículo</u>	20
<u>Figura 4. Esteroidogénesis ovárica</u>	22
<u>Figura 5. Papel de las CCs en la regulación del ovocito</u>	24
<u>Figura 6. Diseño experimental</u>	27
<u>Figura 7. Características dinámicas de los amplicones</u>	40
<u>Figura 8. Electroforesis capilar</u>	41
<u>Figura 9. Captura de glucosa radioactiva de células de la cúmula de pacientes y donantes individuales</u>	43
<u>Figura 10. Efecto de la insulina sobre la expresión de genes en células de la cúmula</u>	44
<u>Figura 11. Cinética de producción de progesterona en células murales en respuesta a insulina</u>	46
<u>Figura 12. La exposición a insulina disminuye la producción de progesterona en diferentes cultivos de células murales humanas</u>	48
<u>Figura 13. Efecto de la insulina sobre genes que participan en la esteroidogénesis y el metabolismo celular</u>	49
<u>Figura 14. Efecto de la insulina sobre los niveles de la proteína CYP11A1</u>	51
<u>Figura 15. Efecto de la exposición a Fsk sobre la producción de progesterona y la expresión de CYP11A1</u>	52

Abreviaturas

SOP	Síndrome de Ovario Poliquístico
PCOS	Polycystic Ovary Syndrome
CC	Células de la cúmula
GC	Células de la granulosa
HSD3B	3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa

HSD17B	17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
CYP11A1	Enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol
SF-1	Factor esteroideogénico 1
GLUT6	Transportador de glucosa 6
GLUT4	Transportador de 4
PTGS2	Prostaglandina-endoperóxido sintasa 2
FSH	Hormona foliculoestimulante
LH	Hormona luteinizante
COC	Complejo cúmula ovocito
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
mARN	Ácido ribonucleico mensajero
OPS	Organización panamericana de salud
ECNT	Enfermedades crónicas no transmisibles
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación
OMS	Organización Mundial de la Salud
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
IAS	Sociedad Internacional de Arteriosclerosis
HOMA	Modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina
CISP	Centro de Investigación en Salud Pública
RE	Retículo endoplásmico
ROS	Especies de oxígeno reactivo
RNS	Especies de nitrógeno reactivo
AGES	Productos de glicación avanzada
StAR	Proteína esteroideogénica aguda reguladora
PDK	Cinasa piruvato deshidrogenasa
PKC	Proteína cinasa C
PKB	Proteína cinasa B
Akt	Proteína serina-treonina cinasa
GSK3	Cinasa glicógeno sintasa 3
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
ShC	Proteína que contiene el dominio SH2
IRS	Substrato del receptor de insulina
Grb2	Proteína 2 unida al receptor de crecimiento
PI3K	Cinasa fosfatidilinositol 3
IR	Resistencia a la insulina
SOG	Sobrecarga oral de glucosa
IMGD	Eliminación de glucosa mediada por insulina
ED50	Dosis efectiva 50
ESHR	Sociedad europea de la reproducción y embriología humana
ASRM	Sociedad americana de medicina reproductiva
FT	Testosterona libre
ITG	Intolerancia a la glucosa
SHBG	Globulina fijadora de hormonas sexuales
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
Ag	Antígeno
Ab	Anticuerpo
IGFR	Receptor del factor de crecimiento parecido a insulina
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
HA	Hialuronona

Resumen

Las alteraciones metabólicas en mujeres suelen presentar un trasfondo de alteraciones en la secreción y activación de la insulina, dando como resultado un estado de hiperinsulinemia. Se ha demostrado que la hiperinsulinemia no solo tiene un papel patológico sobre el metabolismo, sino que también tiene efectos negativos sobre la esteroidogénesis. Una enfermedad que nos permite apreciar esta serie de alteraciones metabólico-hormonales es el SOP descrito como un trastorno endócrino-metabólico que causa serias alteraciones desde la adolescencia hasta la menopausia. Algunos autores mencionan que el aumento de andrógenos característico del SOP está relacionado con la resistencia a la insulina que se desarrolla tras años de hiperinsulinemia. Dicha alteración de la insulina y sus acciones puede contribuir al desbalance hormonal en células de la granulosa, afectando con ello la ovulación y la fertilidad en dichas pacientes. En el ovario, las células de la granulosa murales están a cargo de la producción hormonal (estrógeno y progesterona) y las células de la granulosa tipo cúmula tienen funciones metabólicas relevantes para la sobrevivencia y maduración del ovocito. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la insulina sobre la funcionalidad de las células de la granulosa humana de pacientes con problemas de infertilidad y donantes de ovocitos del Instituto Ingenu y analizar los mecanismos moleculares implicados. Dentro de la estrategia experimental se emplearon células de la granulosa (murales y cúmula) que fueron expuestas a insulina. Las células de la cúmula se expusieron de manera individual (paciente infertil o donante de ovocitos) a 50 nM de insulina para determinar las posibles alteraciones en la funcionalidad del transporte de glucosa mediante ensayos de captura de glucosa radioactiva y para evaluar el efecto de la insulina sobre la expresión de los genes PTGS2 y GLUT6.

Se encontró que las células de la cúmula de pacientes y donantes mostraron una tendencia a aumentar la captura tras la exposición a ésta, mientras que al evaluar la expresión de genes mediante qRT-PCR se encontró que disminuye la expresión de PTGS2 en un 84% y la afectación de GLUT6 es variable. Por otro lado, las células de tipo mural fueron cultivadas en *pool* (mezcla de células de pacientes y donantes) y se analizó la posible afectación en la producción de progesterona causada por la exposición a insulina. Éstas células se expusieron a 50 nM de insulina y posteriormente se cuantificó la producción de progesterona mediante un ensayo inmunoluminométrico, y se evaluó la expresión de genes involucrados en la esteroidogénesis ovárica (HSD3B, HSD17B, CYP11A1) mediante qRT-PCR. Los resultados mostraron una disminución en la producción de progesterona en un 25% tras la exposición a 50nM. Al evaluar el efecto de la insulina sobre la expresión de genes involucrados en la producción de progesterona, como CYP11A1, SF-1 y HSD3B1 se encontró que la exposición a

50 nM de insulina aumentó la cantidad de transcrito de estos tres genes en 56%, 32% y 36%, respectivamente.

En conclusión, la disminución en la expresión de PTGS2 causada por la insulina en las células de la cúmula podría explicar en parte porque las pacientes SOP tienen una tasa baja de ovulación, sabiendo que este gen está relacionado con la inflamación del folículo y la liberación del ovocito, por lo que explorar los mecanismos del efecto de la insulina puede tener implicaciones importantes para entender la afectación en la fertilidad de estas pacientes. En las células murales los resultados indican la necesidad de plantear nuevas estrategias para analizar los mecanismos moleculares que contribuyen a la alteración de la producción de progesterona y que parecen ser divergentes de los efectos de la insulina sobre la expresión de genes relacionados con la esteroidogénesis

Abstract

Women present metabolic alterations, which usually have a background of alterations in insulin secretion and activation, resulting in hyperinsulinemia. Hyperinsulinemia has been shown not only to play a role in metabolism, but it also has adverse effects on steroidogenesis. A disease that allows us to appreciate this series of metabolic-hormonal alterations is Polycystic Ovary Syndrome (PCOS), which has been described as an endocrine-metabolic disorder that causes severe alterations from adolescence to menopause. Some authors mention that the increase in androgens, typical in PCOS, is related to the insulin resistance that develops after years of hyperinsulinemia. This alteration on insulin can contribute to the hormonal imbalance, thereby affecting these patients' ovulation and fertility.

In the ovary, mural cells are responsible for hormone production (estrogen and progesterone), and cumulus cells have metabolic functions relevant to the oocyte's survival and maturation. To evaluate insulin effect on human granulosa cells' functionality in infertile patients and egg donors from the Ingenees Institute and analyze the molecular mechanisms involved, we used human granulosa cells (mural and cumulus) exposed insulin. Human cumulus cells were individually exposed (patients or eggs donor) to insulin 50 nM to determine the possible alterations in glucose uptake by a radioactive glucose capture assay and recording the gene expression of PTGS2 and GLUT6 by qRT-PCR. A variable response was found in the radioactive glucose assay in cells from patients and donors, but mostly increasing after insulin exposure. In the evaluation of gene expression by qRT-PCR, insulin exposure decreases PTGS2 by 84%, while the expression of GLUT6 was inconsistently affected.

On the other hand, human mural cells were cultivated in a pool (mix of patients and eggs donor cells), and the effect of insulin on progesterone production was analyzed. These cells were exposed to insulin 50 nM, and an immunoluminometric assay quantified progesterone levels, while steroidogenic' genes expression were evaluated (HSD3B, HSD17B, CYP11A1, SF-1) by qRT-PCR. Progesterone production was affected 25% after exposure of 50 nM. The exposure to insulin 50 nM increases the levels of the transcript of CYP11A1, SF-1, and HSD3B genes by 56%, 32%, and 36%, respectively. Finally, the decrease in PTGS2 expression coined by insulin exposure in human cumulus cells could explain why PCOS patients have a low ovulation rate, as this gene is related to follicular inflammation and oocyte release. Exploring, therefore, insulin's effect may have important implications for understanding these infertility patients' impact. In human mural cells, the results indicate the need to propose new strategies to analyze the molecular mechanisms that contribute to the alteration of progesterone production and appear to be divergent from the effect of insulin on the expression of genes steroidogenesis.

1 Introducción

1.1 Hiperinsulinemia

La hiperinsulinemia se define como un estado en el que la concentración de insulina en sangre es más alta que la concentración considerada normal. En estado hiperinsulinémico se presenta porque la persona tiene problemas para regular sus niveles de glucosa en sangre porque el páncreas tiene que secretar una mayor cantidad de insulina para mantener los niveles normales (compensatoria) o bien, porque hay una estimulación constante de la secreción de insulina por un exceso de estímulo nutricional (carbohidratos principalmente, pero también por exceso de proteína).

1.1.1 Hiperinsulinemia y sus consecuencias metabólicas

1.1.1.1 Acciones de la insulina

La insulina tiene múltiples acciones celulares, además de regular la captura de glucosa. Ejerce efectos anabólicos para aumentar el almacenamiento de lípidos y proteínas así como la promoción del crecimiento y diferenciación celular [1]. La insulina es central en el metabolismo energético con un papel esencial en la homeostasis de la glucosa y los lípidos.

La insulina ejerce su acción sobre las células por medio de la unión a su receptor en la superficie, un heterotetrámero formado por dos dímeros, el α y el β , unidos por enlaces disulfuro, cada uno de los dímeros, α y β , es producto de un gen [2, 3]. La subunidad α es extracelular, contiene el dominio de unión al ligando, y puede inhibir la actividad intrínseca de cinasa de la subunidad β . La subunidad β se extiende a través de la membrana, y la porción citoplasmática contiene proteínas intrínsecas con actividad de tirosinas cinasas. La unión del ligando induce la autofosforilación del receptor de la insulina en residuos específicos de tirosinas y aumenta su actividad de cinasa intrínseca [1, 4].

La insulina estimula la captación de glucosa aumentando la translocación a la membrana del transportador de glucosa GLUT4. La respuesta a la insulina consiste en la movilización de las vesículas intracelulares que contienen a este transportador hacia la superficie de la célula mediada por acción de la PI3-K, que fosforila a los fosfolípidos y al

fosfatidilinositol de la membrana activando a la 3-fosfoinositido dependiente de la proteína cinasa (PDK-1 y PDK-2) [5]. Estas cinasas activan serina/treonina cinasas como Akt/proteína cinasa B (Akt/PKB) y la proteína cinasa C, λ y ζ atípica (PKC λ/ζ). Akt/PKB transmite la señal de fosforilación de su sustrato de 160kDa, AS160. Estas dos vías estimulan la translocación de GLUT4 hacia la superficie de la célula [1].

En términos de almacenamiento, la activación del receptor a insulina, permite la actividad de la enzima glucógeno sintasa es inhibida constitutivamente por la fosforilación de la enzima glicógeno sintasa cinasa-3 (GSK3). La activación de Akt/PKB también resulta en la fosforilación de la serina y la inactivación de GSK3, permitiendo un aumento en la actividad de la glicógeno-sintasa, esto resulta en la síntesis de glicógeno. La insulina estimula el crecimiento y diferenciación celular a través de la vía de las MAPK-ERK. Esta vía es activada por la fosforilación, mediada por receptores de insulina, de Shc o IRS, permitiendo su asociación con Grb2 y el factor *Son of sevenless* que resulta en la activación de Ras. La insulina también regula la síntesis y la degradación de proteínas a través de la vía mTOR que se activa por PI3-K; se piensa que esta vía puede estar relacionada en la activación transcripcional de genes esteroideogénicos (Figura 1) [1].

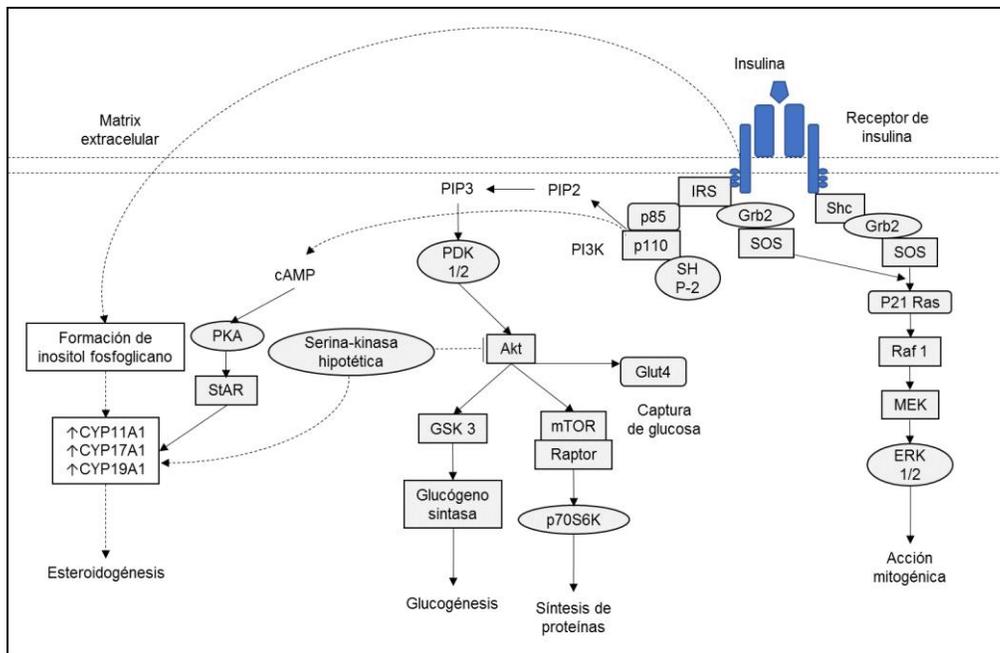


Figura 1. Mecanismos moleculares descritos para las principales acciones de la insulina en células de la granulosa.

En la figura se observan las diferentes cascadas de señalización involucradas en la activación del receptor a insulina. Figura tomada de [6, 7]

El papel de la insulina es permitir que las células tomen la glucosa para usarla como combustible o almacenarla como grasa corporal, y esto lo hace de manera tejida específica [8]. La IR se ha descrito tradicionalmente como una disminución de la habilidad de la insulina para mediar las acciones metabólicas relacionadas con la captación de glucosa, donde las células no responden adecuadamente a la hormona. Los tres tejidos más afectados por la IR son el muscular, hepático y adiposo. En músculo disminuye notablemente la entrada de glucosa, la falla en la inhibición de la producción de glucosa en el hígado es el signo característico de la IR a nivel hepático, y la inhibición de la lipólisis en tejido graso es el problema principal en los adipocitos, resultando en el aumento de las cantidades de insulina necesarias para lograr el control de la glucosa sanguínea y de cada acción metabólica para el manejo energético celular. En la IR hay aumento en los niveles de insulina circulantes, basales y en respuesta a una carga de glucosa, si es que las células beta-pancreáticas aún la producen [7, 9] Se ha observado que la resistencia a la insulina ocurre en personas que tienen altos niveles de insulina circulante, exceso de grasa almacenada en el hígado y páncreas, y altos niveles de inflamación [10] y también se propone que sea justamente la IR la responsable de estas alteraciones.

Los casos crónicos de resistencia a la insulina se acompañan por un agotamiento del páncreas y la disminución severa en la producción de la hormona; . Evidentemente la consecuencia es la hiperglucemia.

La resistencia a la insulina puede desarrollarse cuando influyen los siguientes factores: a) una dieta alta en calorías, alta en carbohidratos o alta en azúcar, b) estilo de vida sedentario - teniendo poca actividad física; c) sobrepeso u obesidad que obedece a estas dos causas d) altas dosis de esteroides durante un período prolongado, e) tener estrés crónico; f) enfermedad de Cushing o enfermedad ovárica poliquística.

El "estándar de oro" para evaluar la resistencia a la insulina *in vivo* es la determinación de la hiperinsulinemia euglucémica de la pinza de glucosa. Es una técnica cuantitativa que evalúa las acciones de la insulina sobre la captación de glucosa en todo el cuerpo por medio de la infusión de una dosis deseada de insulina y el mantenimiento de la euglucemia mediante una infusión variable de glucosa, donde la tasa se ajusta según las determinaciones frecuentes de glucosa en sangre arterializada y un principio

de retroalimentación negativa [7]. En estado estable, la cantidad de glucosa que se infunde es igual a la cantidad de glucosa absorbida por los tejidos periféricos, y se puede usar como una medida de la sensibilidad periférica a la insulina, conocida como eliminación de glucosa mediada por insulina (IMGD) [7]. La producción de glucosa endógena, que refleja la producción de glucosa hepática y renal, se puede determinar mediante la infusión de glucosa marcada isotópicamente en la línea de base y durante la prueba de la pinza euglucémica [7]. Si bien el método de la pinza euglucémica es el método de referencia para cuantificar la sensibilidad a la acción de la insulina, no es rentable para estudios con muestras grandes para estudios del tipo casos y controles, transversales o de seguimiento ya que requiere de múltiples muestras [11].

Los métodos más sencillos basados en una sola toma de muestra, como el modelo homeostático de la glucosa (HOMA), en el que se mide la resistencia a la insulina en un estado estacionario y en ayunas, se han utilizado mucho más en años recientes. También las pruebas de sobrecarga oral de glucosa (SOG) pueden ofrecer información sobre la secreción de insulina y su acción [11].

La hiperinsulinemia causa efectos patológicos a través de 5 mecanismos principales [12]:

- Glucotoxicidad continua que se detecta como hiperglucemia.
- Aumento de las especies de oxígeno reactivas y productos finales de glicación avanzada (AGES).
- Aumento del factor de crecimiento tipo insulínico 1 (IGF-1).
- Aumento de la producción triglicéridos con la consecuente liberación de un exceso de ácidos grasos.
- Inflamación crónica al alterar la producción de citocinas.

1.1.2 Consumo de carbohidratos e hiperinsulinemia

Los carbohidratos son componentes orgánicos de gran abundancia e importancia celular, son polihidroxialdehidos y polihidroxicetonas cuya fórmula general es $(CH_2O)_n$. Se clasifican de acuerdo al número de unidades monoméricas que los constituyen, en monosacáridos o azúcares simples, oligosacáridos y polisacáridos [13]. Entre los

monosacáridos el más abundante es la glucosa, metabolito importante en el reino animal para la obtención de energía química y para la formación de sustancias de reserva, en la molécula de glucógeno [13].

Los carbohidratos presentan las siguientes funciones biológicas:

- Energética: por su abundancia es considerado el combustible por excelencia.
- Estructural: forman parte de la membrana celular.
- Reserva: almacenados en forma de polímeros en animales y plantas cuyos componentes principales son el glucógeno y el almidón respectivamente.
- Sostén y protección: en los vegetales los carbohidratos forman estructuras poliméricas, como la celulosa.

El metabolismo se define como el conjunto de procesos físicos-químicos-fisiológicos que ocurren en los organismos capaces de intercambiar sus componentes y energía con el entorno, esto les permite la autoconservación y autorreproducción [13]. Existen distintas rutas metabólicas que pueden ser lineales o cíclicas. Frecuentemente los metabolitos o productos finales de una ruta suelen ser sustratos de reacciones de otras rutas. Las rutas metabólicas son un conjunto de reacciones que caracterizan un proceso bioquímico determinado como pueden ser el metabolismo de los carbohidratos llamada glucólisis, puede ser anaeróbica fermentación o aeróbica respiración, el metabolismo de lípidos o beta-oxidación, o reacciones que usan aminoácidos (proteínas) como la desaminación descarboxilación que conduce al Ciclo de Krebs [13].

En la actualidad las guías nutricionales estándar recomiendan consumir de un 45 a 65% de carbohidratos, lo que en una dieta promedio de 2000 calorías se traduce en el consumo de 900 a 1300 calorías, que a su vez implica consumir un total de 225 a 325 gramos por día [14]. Sin embargo, hay múltiples evidencias que señalan que este elevado consumo de carbohidratos es la causa principal de la epidemia de obesidad que se ha desarrollado en los últimos 30 años [15].

1.1.2.1 Consumo de carbohidratos en México

Gaona y colaboradores en 2018 realizaron un estudio en el que se estimó el consumo cotidiano de alimentos recomendables y no recomendables por características sociodemográficas en la población mexicana. Se encontró que los adultos y adolescentes de nivel socioeconómico alto consumen una mayor cantidad de frutas, verduras, carne no procesada, huevo, lácteos, comida rápida y botanas en comparación con los adolescentes y adultos de nivel socioeconómico bajo. En el artículo se expresa la preocupación debida al gran porcentaje de la población (70% aproximadamente) que consume bebidas no lácteas endulzadas ya que son la fuente principal de azúcares añadidos en la dieta mexicana [16].

Un segundo estudio realizado en 1998 por el INSP y el Centro de Investigación en Salud Pública (CISP) en el cual se analizó el consumo energético y nutrimental de 9,101 mujeres mexicanas de 12 a 49 años de edad, encontró que la mediana del consumo energético fue de 1,568 kcal/día, con 15% de proteína, 60% de hidratos de carbono y 25% de grasa. Se concluye que la población femenil mexicana presenta deficiencias importantes en su dieta, las cuales son más acentuadas en mujeres embarazadas o nodrizas, las de menor nivel socioeconómico, las que habitan en áreas predominantemente rurales o indígenas y en las de la región sur [17].

Debido al sobrepeso y obesidad que afecta al 70% de los adultos en México, es importante modificar la cantidad de carbohidratos que se consumen en la dieta disminuyendo el consumo de alimentos como tortilla, pan y evitando la ingesta de refrescos, así como de jugos industrializados e incluso los naturales, ya que tienen un alto contenido de azúcar [18].

1.1.2.2 Glucotoxicidad por exposición continua a carbohidratos

Cuando se mantiene un aumento crónico de la entrada de glucosa en plasma se presenta la glucotoxicidad (más del 65% del día se registran concentraciones de glucosa por arriba de 100 mg/dL/por más de 3 meses, identificado por un porcentaje de hemoglobina glicosilada superior a 6%), que induce la secreción continua de la insulina, y produce a nivel celular estrés en retículo endoplásmico (RE) al aumentar la demanda

de proinsulina, que aumenta el flujo de proteínas, y genera una disfunción mitocondrial inducida por la hiperglucemia crónica que conduce a un aumento en el Ca^{+2} citosólico a largo plazo que se vuelve pro-apoptótico; en diferentes tipos celulares esta hiperglucemia disminuye el número de mitocondrias y cambia su morfología (aumento de volumen y área de superficie externa), causa estrés oxidante (sobreproducción y exceso de especies de oxígeno reactivas, ROS) y la producción de especies de nitrógeno reactivas (RNS) durante el metabolismo celular [19].

La hiperglicemia crónica, ya como una condición patológica, consiste en registrar de manera frecuente concentraciones altas de glucosa en sangre (más de 100mg/dL); ésta causa alteraciones al epitelio corneal [20], inflamación y disfunción mitocondrial en células inmunes [21], alteración en las concentraciones circulantes y el aclaramiento renal de productos finales oxidantes y de glicación avanzada (AGES por sus siglas en inglés) [22], estrés mitocondrial y activación anormal de la vía de señalización de Smad2 [23].

Por otro lado, la hiperinsulinemia, que se define como la necesidad de secretar más insulina de lo normal para lograr la euglucemia, y que es inducida cuando hay exposición constante a glucosa (hiperglucemias, tanto transitorias como constantes, durante el día inducidas por exceso de glucosa en la ingesta alimentaria), se presenta propuesto un rango de referencia normal de insulina en sangre en ayuno de 5-13 $\mu\text{U}/\text{mL}$. Se ha descrito que la hiperinsulinemia precede a la hiperglucemia hasta en 24 años [24].

1.1.3 Síndrome Metabólico

El estar sometidos de manera constante y elevada a una ingesta de carbohidratos muy por encima de los niveles que pueden ser manejados con seguridad, lleva a niveles elevados de glucosa en sangre (elevaciones frecuentes, altas concentraciones sostenidas) lo que lleva a una estimulación constante de las células beta pancreáticas para la producción de insulina que permitirá controlar el nivel de glucosa en sangre. Este constante ciclo glucosa-insulina está directamente ligado a las alteraciones metabólicas que se registran como indicadores diagnósticos del síndrome metabólico [12]. El síndrome metabólico puede describirse como el conjunto de factores cardiovasculares de riesgo, entre las que destacan la IR, la obesidad, dislipidemias aterogénicas e

hipertensión arterial y anormalidades lipoproteicas que suelen incluir triglicéridos aumentados, colesterol HDL bajo y elevación de las partículas LDL pequeñas [25].

En México, 8 de cada 10 muertes son ocasionadas por enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) que se han relacionado con obesidad y sobrepeso. De acuerdo a un estudio de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) del 2013, México ocupa la tasa más alta de obesidad en adultos de los países que conforman la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE).

México cuenta con un índice de obesidad del 33%, colocándose en el cuarto más alto de Latinoamérica y el Caribe. Casi el 85% de la población en México sobrepasa el consumo de azúcar recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS). A inicios de marzo de 2015 la OMS publicó nuevas directrices para la ingesta de azúcar en niños y adultos que exhortan a reducir el consumo de azúcares libres a menos del 10%, lo que equivale a 35g de azúcar, y señalan que una reducción a menos del 5%, equivalente a 25g de azúcar, proporciona beneficios adicionales para la salud [26]. Se ha publicado que en México se consume de 12 al 16% de las calorías totales del día en forma de azúcar, lo que sobrepasa el límite recomendado por la OMS.

Un comunicado de la Organización Panamericana de Salud (OPS) explica que el azúcar no es un nutriente esencial y hay evidencia que muestra que en realidad puede ser perjudicial al contribuir al sobrepeso, la obesidad y la caries dental [26]. Este consumo excesivo de azúcar puede resultar dañino en cualquiera de sus formas (sacarosa, fructosa, glucosa, etc.) porque son calorías vacías y contribuyen al aumento de peso, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina y diabetes [27].

Existe un acuerdo de forma casi unánime que señala que la resistencia a la insulina (IR) es el vínculo fisiopatológico común en todas las alteraciones del síndrome metabólico. Así mismo, estas alteraciones metabólicas causadas por el alto consumo de azúcares, que provienen de la ingesta excesiva de carbohidratos, se encuentran en los diagnósticos de las pacientes con SOP [28].

El aumento y la presencia constante de insulina plasmática está relacionada con el síndrome metabólico, la diabetes gestacional y la diabetes tipo 2, y con las enfermedades cardiovasculares y la gota [12]. Se piensa que las alteraciones descritas para este síndrome tienen una vasta fisiopatológica común, que es la resistencia periférica a la insulina, acompañada generalmente de hiperinsulinemia compensadora. En los últimos años se han propuesto varios criterios para el diagnóstico del síndrome metabólico, la guía propuesta por la Sociedad Internacional de Arteriosclerosis (IAS por sus siglas en inglés) propone pautas de fácil aplicación clínica basadas en la existencia de tres de los siguientes cinco determinantes: aumento del perímetro de la cintura, triglicéridos elevados, cHDL bajo, presión arterial elevada y la glucosa en ayunas alterada. Los puntos de corte para cada uno de los parámetros se muestran en la Tabla 4 [28]. Por otro lado, la OMS en 1999 propuso una definición de síndrome metabólico en la que se exige que exista una tolerancia anormal a la glucosa, o diabetes mellitus, o resistencia a la insulina (valorada con el modelo HOMA) (Tabla 1) [28].

Tabla 1. Criterios para identificar el síndrome metabólico

Programa Nacional de Educación del Colesterol	Organización Mundial de la Salud
Al menos 3 de los siguientes:	Tolerancia anormal a la glucosa, diabetes melitus y/o resistencia a la insulina (HOMA) y al menos 2 de los siguientes:
Obesidad abdominal (perímetro de la cintura) Hombres > 102cm Mujeres > 88cm	Obesidad abdominal (cintura/cadera) Hombres > 0.90 cm Mujeres > 0.85 cm y/o IMC > 30
Triglicéridos > 150 mg/dL (≥1.7 mmol/L)	Triglicéridos > 150 mg/dL (≥1.7 mmol/L)
cHDL Hombres < 40 mg/dL (<1.0 mmol/L) Mujeres < 50mg/dL (<1.3 mmol/L)	cHDL Hombres < 35 mg/dL (<0.9 mmol/L) Mujeres < 39mg/dL (<1.0 mmol/L)
Presión arterial ≥130/85 mmHg	Presión arterial ≥140/90 mmHg
Glucemia en ayunas ≥110 mg/dL (6.1 mmol/L)	Microalbuminuria ≥20 µg/min o cociente albúmina: creatinina ≥30 mg/g

La tabla muestra las características consideradas en el diagnóstico del síndrome metabólico
Tabla tomada de: SED, 2007

Se ha visto que las alteraciones del síndrome metabólico tienen una alta prevalencia en otras patologías, como, por ejemplo, en las mujeres con síndrome de ovario poliquístico (SOP) cuya prevalencia es del 43 al 47%. El exceso en el peso y obesidad son muy comunes en mujeres con esta enfermedad, así como altos niveles de insulina circulante, anormalidades lipídicas como reducción en los niveles de colesterol HDL y altos triglicéridos [29, 30].

1.2 Síndrome de Ovario Poliquístico

El SOP es la endocrinopatología más frecuente en las mujeres, se puede presentar desde la adolescencia; afecta del 3 al 10% de las mujeres y de un 5 a un 15% de las mujeres mexicanas o de ascendencia mexicana [31, 32].

El SOP es una disfunción ovárica caracterizada por una sintomatología variable con oligo-ovulación o anovulación, hiperandrogenismo, hiperplasia ovárica con presencia de múltiples quistes foliculares (usualmente bilaterales), infertilidad, oligomenorrea (menos de ocho periodos menstruales en un año) o amenorrea (ausencia de la menstruación durante tres meses consecutivos o más) que empieza en la menarquia. Muchas mujeres que presentan este síndrome tienen un alto riesgo de presentar acantosis, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, dislipidemia, aumento del estado protrombótico y obesidad [32-34]. Esto puede resultar en una tasa mayor de diabetes mellitus tipo II, hígado graso, aterosclerosis subclínica, hipertensión, patología cardiovascular y carcinoma endometrial [35].

La causa de esta enfermedad no es conocida aún, pero tiene una base genética ya que hay una fuerte agregación familiar, aunque el cómo se hereda es incierto. Se han propuesto varios genes que podrían participar en la susceptibilidad, como los genes involucrados en la biosíntesis de hormonas esteroideas y los genes asociados con la regulación de la secreción de la insulina y su acción, ya que la hiperinsulinemia es una característica prevalentes en estas pacientes [36]. Se ha sugerido que se trata de una herencia autosómica dominante que se presenta en mujeres y varones, ya que se ha observado que hay una mayor frecuencia de presentar la enfermedad entre las pacientes y sus hermanas (32-66%) y las pacientes y sus madres (24-52%) [32]. Se han propuesto otros factores primarios como posibles factores etiológicos: alteraciones

neuroendocrinas, factores medioambientales y defectos genéticos asociados al gen CYP11a y polimorfismos en el locus VNRT del gen productor de insulina [33, 37].

Debido a su sintomatología variable, esta enfermedad se suele diagnosticar por discriminación de signos. En 2003 la *European Society of Human Reproductive and Embryology* (ESHRE) y la *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM) definieron a este síndrome (Tabla 4). Se propone que las pacientes diagnosticadas deben presentar dos de los tres criterios siguientes: 1) oligoovulación, anovulación o ambas, 2) hiperandrogenismo (clínico, bioquímico o ambos), 3) poliquistosis ovárica identificada en una ecografía [32].

Tabla 2. Definición del síndrome de poliquistosis ovárica

<p>ESHRE/ASRM (Róterdam) 2003</p> <p>Comprende dos de tres de los siguientes:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Oligo-ovulación o anovulación 2. Signos clínicos y/o bioquímicos de hiperandrogenismo 3. Ovarios poliquísticos (excluyendo las enfermedades similares)
<p>NHI (1990)</p> <p>Comprende los dos siguientes:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Oligo-ovulación 2. Hiperandrogenismo y/o hiperandrogenemia (excluyendo a los trastornos similares)
<p>AE/PCOS (2009)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Hiperandrogenismo: hirsutismo, hiperandrogenemia, o ambos y 2. Disfunción ovárica: oligo-ovulación –anovulación, ovarios poliquísticos, o ambos y 3. Exclusión de otros excesos de andrógenos o trastornos similares
<p>AE-PCOS, Androgen Excess and PCOS Society; ASRM, American society of Reproductive Medicine; ESHRE, European Society of Human Reproduction and Embriology; NHI, National Institutes of Health; PCOS, Síndrome de Poliquistosis Ovárica.</p>

En la tabla se muestran los signos establecidos por distintas organizaciones de salud para diagnosticar el síndrome de ovario poliquístico. Cuadro tomado de [32].

1.2.1 Signos

Según la Real Academia Nacional de Medicina (RANM) los signos son todas aquellas manifestaciones objetivas de una enfermedad o un síndrome, que resultan evidentes para un observador diferente al sujeto que lo presenta. A continuación, se describen los relacionados al SOP.

1.2.1.1 Disfunción menstrual

En pacientes con SOP la disfunción menstrual varía desde amenorrea u oligomenorrea hasta menometrorragia episódica con anemia. La amenorrea y la oligomenorrea pueden ser resultado de la anovulación. En este escenario, la falta de ovulación impide la producción de progesterona, que a su vez suprime la ovulación. De forma alterna, la amenorrea puede ser el resultado de las concentraciones aumentadas de andrógenos, de forma específica los andrógenos contrarrestan a los estrógenos para generar un endometrio atrófico. Con la amenorrea las mujeres con SOP pueden presentar sangrados profusos e impredecibles. Estas pacientes no producen progesterona debido a la anovulación y se tiene como resultado la exposición crónica a estrógenos. Esto origina la estimulación mitógena constante del endometrio [34].

1.2.1.2 Hiperandrogenismo

La definición clínica se da por la presencia de hirsutismo (determinada por una calificación mayor a 6 de la escala Ferriman y Gallwey) o la presencia severa o difusa de acné/seborrea. De forma bioquímica se establece por niveles de testosterona total en suero mayores a 0.76 ng/mL (intervalo normal de 0.14-0.76 ng/mL), y/o niveles de testosterona libre (FT) en suero mayores a 4.7 pg/mL (intervalos normal 0.3-3.18 pg/mL) [38].

La elevación en los andrógenos se da por la presencia de la insulina y la hormona luteinizante (LH) que estimulan la producción de andrógenos en células ováricas de la teca [10]. De esta forma los ovarios secretan una mayor cantidad de testosterona y androstenediona. En las mujeres con SOP se han observado elevaciones de testosterona libre de un 70 a 80% y de un 25 a 65% de dehidroepiandrosterona (hormona básica en la formación de la testosterona y del estrógeno, DHEAS). La androstenediona elevada contribuye al aumento de la estrona por medio de la biotransformación de andrógenos en

estrógenos gracias a la aromatasa lo que representa una mayor cantidad de estrógenos periféricos [32].

1.2.1.3 Hirsutismo

Consiste en alteración a nivel de unidad pilosebácea con mayor actividad enzimática de la 5 α -reductasa, aumento de andrógenos y mayor crecimiento de vello sexual en áreas andrógenodependientes como en la cara interna de muslos, brazos, cara, barbilla. El grado y la severidad se evalúan de acuerdo con la escala de Ferriman-Gallwey. Se presenta comúnmente al final de la adolescencia o al principio de la tercera década de la vida [32, 37].

1.2.1.4 Seborrea/Acné

Se presenta sólo en 50% de adolescentes; su presencia a los 20 años nos habla de sobreactividad androgénica. En la edad adulta es menor al 15%, aun presentando hiperandrogenismo.

1.2.1.5 Anovulación

En pacientes con SOP los andrógenos se elevan, mientras que la progesterona disminuye por la anovulación, su mecanismo exacto se desconoce, pero se cree que la hipersecreción de LH participa en las irregularidades menstruales. La anovulación puede ser secundaria a la resistencia a la insulina ya que en pacientes con anovulación y SOP los ciclos ovulatorios se restablecen cuando reciben metformina [39, 40]. También se piensa que el aumento de folículos antrales grandes contribuye a la anovulación [32].

1.2.1.6 Alteraciones en la secreción de gonadotropinas

Los cambios en la secreción de gonadotropinas (Hormona luteinizante LH y hormona foliculoestimulante FSH) favorecen la presencia de anovulación y problemas sobre las pulsaciones de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que provocan un aumento en la producción de la LH y la FSH. Esta elevación presenta una relación LH:FSH por arriba de 2:1 en cerca del 60% de las pacientes [41].

1.2.1.7 *Acantosis nigricans*

Se presenta como una hiperplasia hiperpigmentada en el cuello o en pliegues cutáneos como axilas y codos. Es un fenómeno cutáneo caracterizado por la presencia de placas gruesas, aterciopeladas y de color café grisáceo en los pliegues de flexión. Correlaciona con los estados de IR e hiperinsulinemia compensatoria, aunque la ausencia no descarta la existencia de IR. Se relaciona con obesidad hasta en el 74% y se asocia en el 30% de las pacientes con SOP. La hiperinsulinemia y la IR aparentemente estimulan el crecimiento de los queratinocitos y fibroblastos dérmicos, generando los cambios cutáneos característicos de este signo (Hoffman, 2008; Rodríguez, 2013).

1.2.1.8 Alteraciones en la tolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipos 2 (T2D)

Varios estudios (Tabla 3), han utilizado la pinza euglucémica y han confirmado que las mujeres con ovario poliquístico tienen una profunda resistencia a la acción de la insulina para la estimulación de la captación de glucosa y se ha llegado al consenso de que las mujeres obesas con SOP son aún más insulinoresistentes [7]. En 1989, Dunaif y colaboradores demostraron que la eliminación de glucosa mediada por insulina (IMGD), evaluada por el método de pinza euglucémica, fue significativa y sustancialmente menor (~35-40%) en mujeres con SOP comparadas con mujeres control (reproductivamente normales) comparables en edad y peso corporal. Esta disminución en la eliminación de glucosa inducida por insulina en las pacientes fue de una magnitud similar a la reportada en pacientes con diabetes mellitus tipo (T2D). La IMGD también disminuyó significativamente en las mujeres con SOP delgadas, quienes tenían una tolerancia normal a la glucosa [7, 42]. Los mismos autores en 1992 reportaron que la dosis efectiva 50 (ED50) de insulina para la captación de glucosa aumentó significativamente y las tasas máximas de IMGD se redujeron significativamente en mujeres delgadas y obesas con SOP [10].

Tabla 3. Estudios de pacientes con SOP y resistencia a la Insulina

Referencia	Modelo	Resultado	Otros datos
Morales et al., 1996 [43]	Casos y controles	<ul style="list-style-type: none"> -Sensibilidad a la insulina en un 50% en mujeres con SOP delgadas. -Dos veces menos sensibilidad en mujeres con SOP obesas. -La obesidad contribuye de forma adicional a la RI. -Hiperinsulinemia compensatoria en las pacientes. -↑ en la frecuencia de pulsaciones de LH en ambas pacientes. -Correlación positiva entre 17-hidoxiprogesterona ($r=0.70$), andrógenos ($r=0.72$) y estrógenos ($r=0.70$) con los niveles de insulina en suero. 	<ul style="list-style-type: none"> +32 mujeres, pacientes con SOP delgadas y obesas. +Diagnóstico: aparición premeneal de oligomenorrea, ↑ de androstenediona, y/o testosterona, evidencia por ultrasonido de ovarios poliquísticos
Banaszewska, et al. 2006 [44]	Mujeres con SOP	<ul style="list-style-type: none"> -Grupo con hiperinsulinemia: ↓ HDL (11%), ↑ colesterol total (23%), ↑ en triglicéridos (57%) en comparación con el grupo de normoinsulinemia. -6 meses después del tratamiento con metformina ↓ del nivel de insulina (35%), ↓ del colesterol total (11%), ↓ LDL (12%), ↓ de triglicéridos (33%). 	<ul style="list-style-type: none"> +Se separaron en dos grupos: hiperinsulinemia y normoinsulinemia +El grupo con hiperinsulinemia recibió metformina (500mg).
Belani et al., 2018 [45]	Fluido folicular de mujeres con y sin SOP.	<ul style="list-style-type: none"> -GCs de pacientes SOP IR alteración de las proteínas involucradas en la cascada de señalización de la insulina como el aumento en la fosforilación de IRS, MAPK, PPAR, ERK. Disminución de la fosforilación de PI3K, Akt, PKC-ζ. -GCs SOP con/sin IR: ↓ expresión del mRNA y proteína de StAR, HSD3B, CYP19A1, 17β-HSD y aumento en CYP11A1. Disminución en la producción de progesterona y aumento de la testosterona. 	<ul style="list-style-type: none"> +Se separaron a las pacientes con SOP en IR y no IR.
Ciraldi et al., 2009 [46]	Casos y controles	<ul style="list-style-type: none"> -70% de las SOP presentaron tolerancia a la glucosa deteriorada y ↓ eliminación de glucosa estimulada por insulina. -Los miotubos de las pacientes con SOP mostraron una respuesta de insulina reducida para la captación de glucosa y la sensibilidad. 	<ul style="list-style-type: none"> +Evaluaciones in vivo de tolerancia a la glucosa. +Evaluación en tejido adiposo y músculo fue tomado por biopsia.
He et al., 2019 [47]	Pacientes SOP infértiles	<ul style="list-style-type: none"> -De 1508 mujeres seleccionadas para el estudio 410 presentaron también síndrome metabólico. -Estas 410 mujeres presentaron una duración más prolongada de infertilidad y requieren una mayor dosis de gonadotropinas, tienen un pico de estradiol más bajo, se recuperan menos ovocitos, menos embriones 	<ul style="list-style-type: none"> +Se separaron a las pacientes con SOP en IR y no IR.

		disponibles, menor tasa de utilización de ovocitos.	
--	--	---	--

Existe una asociación entre la resistencia a la insulina, el hiperandrogenismo, el SOP y la obesidad, que a su vez exacerba la IR. En un estudio de casos y controles se demostró que las mujeres tanto delgadas como obesas con SOP tienen una mayor frecuencia de IR y T2D que las testigos de peso similar sin SOP [32]. Estas mujeres también tienen más riesgo de padecer intolerancia a la glucosa (ITG). Un estudio realizado por Legro y colaboradores en 1999, demostró que las mujeres obesas con SOP presentan prevalencia de IGT y T2D de casi el 30 y 70%, respectivamente. Específicamente, se ha observado disfunción de las células β pancreáticas independiente de la obesidad en las pacientes con SOP [7, 48].

1.2.1.10 Obesidad y dislipidemia asociadas a SOP

Las mujeres con SOP tienen una alta prevalencia de obesidad y aquellas con obesidad de cuerpo superior a cuerpo inferior tienen una mayor frecuencia de hiperandrogenismo [49]. En comparación con testigos de edad similar, estas mujeres tienen mayor tendencia a padecer obesidad, lo que se refleja en un mayor índice de masa corporal (BMI) e índice cintura:cadera. Este patrón de circunferencia de cintura aumentada y de engrosamiento de los pliegues subescapulares también son predictivos de resistencia a la insulina [50]. También se ha observado que los andrógenos pueden aumentar la masa de grasa visceral en estas mujeres [51]. El perfil aterógeno clásico de las lipoproteínas que se observa en SOP se caracteriza por elevación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), triglicéridos y relación de colesterol total: lipoproteínas de alta densidad (HDL), así como HDL reducida [44]. Estas mujeres presentan una prevalencia de casi un 70% de dislipidemia [32]. De forma independiente a la concentración total de colesterol, estos cambios aumentan el riesgo de cardiopatía en las mujeres con SOP.

1.2.1.11 Infertilidad

La falla ovulatoria es la causa principal de infertilidad en pacientes con SOP, generalmente se debe a la falla en la progresión en el desarrollo folicular (no mayor a 10

mm). Hay que considerar como factores de infertilidad a las fallas ovulatorias, las alteraciones del endometrio y su potencial impacto en la implantación, la insulinoresistencia e hiperinsulinemia que pueden dificultar la respuesta ovulatoria, la implantación y el desarrollo temprano del embarazo y, la alta tasa de abortos de primer trimestre asociados al SOP para entender las diferentes razones por las cuales hay infertilidad. Se sabe que las mujeres con SOP tienen una frecuencia elevada de abortos (30-50%) durante el primer trimestre -aproximadamente 15% en la población general- [52]. Se ha sugerido que el tener resistencia a la insulina está asociado a los abortos y en diversos estudios retrospectivos se ha observado que las mujeres con SOP que consumen metformina durante el embarazo tienen una incidencia menor de abortos [53, 54].

En la Tabla 4 se muestran los factores que generan infertilidad asociados a esta enfermedad [55].

Tabla 4. Factores de infertilidad asociados al SOP

Disfunción ovulatoria
Resistencia a la Insulina
Alteraciones del desarrollo endometrial
Aborto de primer trimestre
Patología obstétrica asociada al SOP

Datos tomados de Silva, 2010.

1.2.1.12 Cáncer endometrial

Las mujeres que padecen SOP presentan un riesgo tres veces mayor de hiperplasia y cáncer endometrial, que son riesgos a largo plazo de la anovulación crónica; se cree que la exposición crónica a los estrógenos sin oposición provoca cambios neoplásicos en el endometrio [56]. Este riesgo aumenta por los efectos del hiperandrogenismo y la hiperinsulinemia al reducir la concentración de la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) y elevar los estrógenos circulantes [32].

1.2.1.13 Esteroidogénesis ovárica

La esteroidogénesis ovárica es el término asignado a la función del ovario para producir las hormonas esteroideas sexuales, alteraciones en esta se dan como resulta de una desregulación que causa el aumento de andrógeno y en consecuencia existe una respuesta estrogénica limitada. La sobre estimulación de la LH, en tiempo y dosis dependiente, resultado de la regulación negativa de los receptores a LH, reduce la actividad de anclaje del colesterol, la actividad de 17, 20-liasas y de 17-hidroxilasa, con el subsecuente incremento en 17-hidroxiprogesterona a andrógenos. En pacientes con SOP, la concentración de LH se encuentra elevada 40 a 60% comparada con la de población control, debido al aumento en la amplitud y frecuencia de los pulsos de LH [57, 58]. La Figura 2 muestra la síntesis de distintas hormonas esteroideas a partir del colesterol.

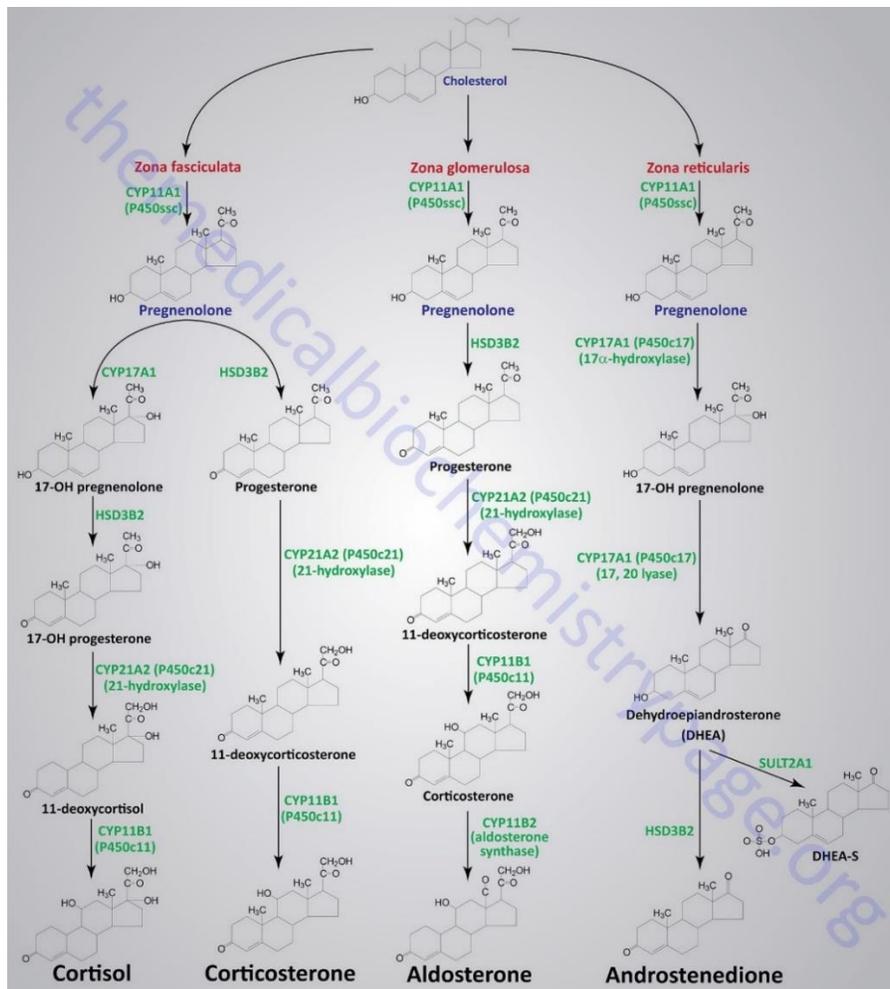


Figura 2. Síntesis de hormonas esteroideas

En la figura se observan las diversas y complejas rutas de biotransformación de colesterol a hormonas esteroideas. Figura tomada de [59].

1.3 Fisiología del crecimiento folicular y de la maduración del ovocito

Durante la etapa prenatal, hacia los cinco meses, los ovarios contienen aproximadamente 6 a 7 millones de ovogonias la mayoría mueren antes del nacimiento por un proceso de apoptosis. Las ovogonias restantes comienzan la meiosis hasta el final de la gestación y se denominan ovocitos primarios. La ovogénesis se detiene en la profase I de la primera división meiótica. Cada ovario está contenido dentro de su propia esfera de células huecas, el folículo ovárico. Cuando la niña llega a la pubertad el número de ovocitos se ha reducido a 400 000, de los cuales cerca de 400 de estos ovocitos ovularán durante los años de la reproducción de una mujer y los restantes morirán por apoptosis. La ovogénesis cesa del todo en la menopausia. Los ovocitos primarios que no han sido estimulados para concluir la primera división meiótica están contenidos dentro de pequeñísimos folículos primarios; los folículos primarios inmaduros constan de sólo una capa de células foliculares. [60].

En respuesta a la estimulación con FSH, algunos de los folículos y ovocitos aumentan de tamaño y las células foliculares se dividen para producir múltiples capas de células de la granulosa que rodean al ovocito y llenan el folículo. Algunos folículos primarios son estimulados para crecer aún más y formarán una serie de cavidades llenas de líquido llamadas microvesículas; en esta etapa se denominan folículos secundarios. El crecimiento persistente de uno de estos folículos se acompañará de la fusión de sus microvesículas para formar una sola cavidad llena de líquido llamada antro. En esta etapa se conoce al folículo como folículo maduro o de Graaf [60].

Al desarrollarse el folículo, el ovocito primario concluye su primera división meiótica. No se generan dos células completas, ya que solo una célula, que es el ovocito secundario, adquiere todo el citoplasma. La otra célula formada en esta etapa se convierte en un cuerpo polar pequeño que acaba por fragmentarse y desaparecer. El ovocito secundario comienza la segunda división meiótica, pero se detiene la meiosis en la metafase II. La segunda división meiótica se termina si al menos un ovocito se ha fecundado (Figura 3) [61].

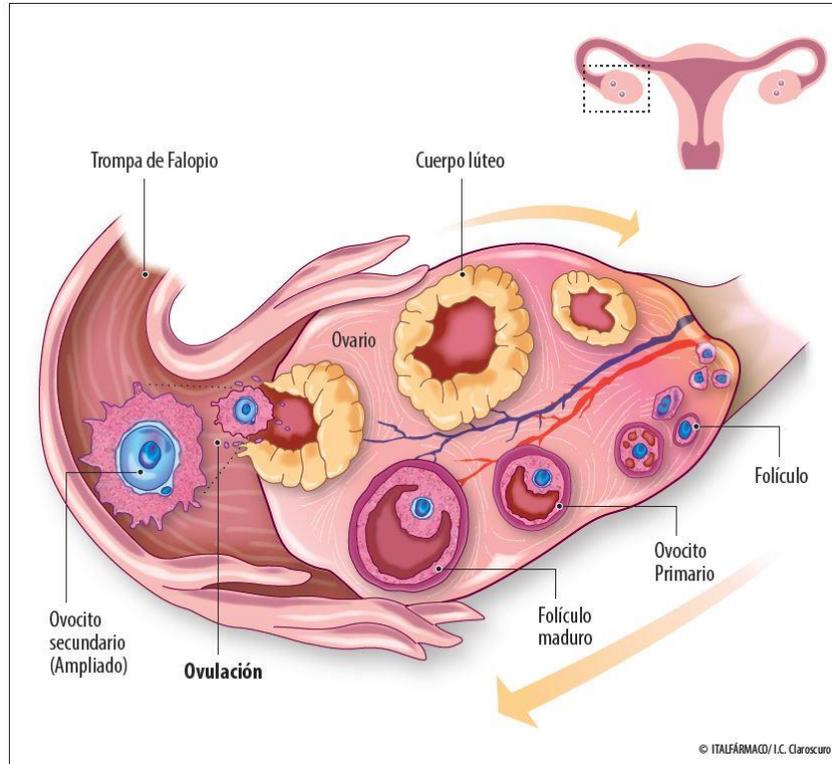


Figura 3. Etapas de desarrollo del óvulo y del folículo

En la figura se ilustra el proceso de crecimiento y maduración folicular, así como su ruptura y liberación del complejo cúmulo-ovocito. Finalmente, una vez liberado el ovocito el folículo se convierte en un cuerpo lúteo, el cual se degrada si no hay fecundación o, en caso de haberla es un productor de hormonas durante el embarazo. Figura tomada de [62]

1.3.1 Células de la granulosa

Las células de la granulosa son el tipo celular primario en el ovario que provee el soporte físico y ambiental requerido para el desarrollo del ovocito, ya que además de proveer de hormonas como la progesterona y estradiol, también brindan nutrientes metabólicos. Se sabe que estas células expresan una amplia gama de transportadores de glucosa sensibles y no sensibles a la insulina como los GLUTs 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12 y 13. La expresión de los transportadores GLUT4 y 6 se ha visto diferencial en relación a las características metabólicas de las mujeres cuyas células se han evaluado. Cuando se tiene un estado de IR en mujeres la expresión de GLUT4, un transportador de glucosa sensible a la insulina, se ve disminuida en comparación a aquellas células de

mujeres que no presentan IR. En contraste a este resultado se ha visto un aumento en la expresión del transportador GLUT6, un transportador pasivo de glucosa (no sensible a la insulina), como una posible respuesta compensatoria ante el estado de IR de las células [63].

Durante la foliculogénesis estas células se diferencian activamente en distintas poblaciones, desde un estadio primordial de desarrollo a través de la ovulación hasta la fase lútea de desarrollo [64]. Las células de la pregranulosa se diferenciarán y proliferarán para dar soporte al ovocito durante su crecimiento temprano y a través de la transición del folículo de la fase primordial a pre-antral [65].

El inicio de la diferenciación de las células de la granulosa ocurre sobre la formación del antro folicular, el cual corresponde aproximadamente al final de la fase de crecimiento del ovocito. Las células de la granulosa y de la teca se encuentran rodeando a los ovocitos. Conforme crecen los folículos y se forma el antro, las células de la granulosa se diferencian en dos subtipos: las células de la cúmula, que se encuentran rodeando y en íntimo contacto metabólico con el ovocito; y las células murales, que se encuentran recubriendo la pared folicular formando un epitelio estratificado con la lámina basal con un papel primario de esteroidogénesis [60].

1.3.2 Células murales

La progresión a lo largo de las etapas antral y de ovulación ha sido considerada dependiente de las gonadotropinas secretadas por la pituitaria (FSH y la LH –hormona luteinizante-). La FSH induce la producción del mRNA del receptor de LH (*Lhcgr*) en células murales, cuya expresión es requerida para que los folículos respondan a la LH, y desencadenar el proceso ovulatorio. La FSH y la LH son cruciales para la síntesis de estrógeno [66]. En el folículo preovulatorio, la vasculatura de las células de la teca está bien desarrollada y la capa mural de las células de la granulosa se encuentra en contacto con las células sanguíneas. Estas células responden a las variaciones en hormonas circulantes y permiten la liberación de los estrógenos directamente al efluente venoso de los folículos preovulatorios [67].

El proceso de la esteroidogénesis ovárica sucede principalmente en el folículo antral maduro y el cuerpo lúteo después de la ovulación, involucrando varias reacciones enzimáticas en las células de la teca y de la granulosa murales (Figura 4) [58].

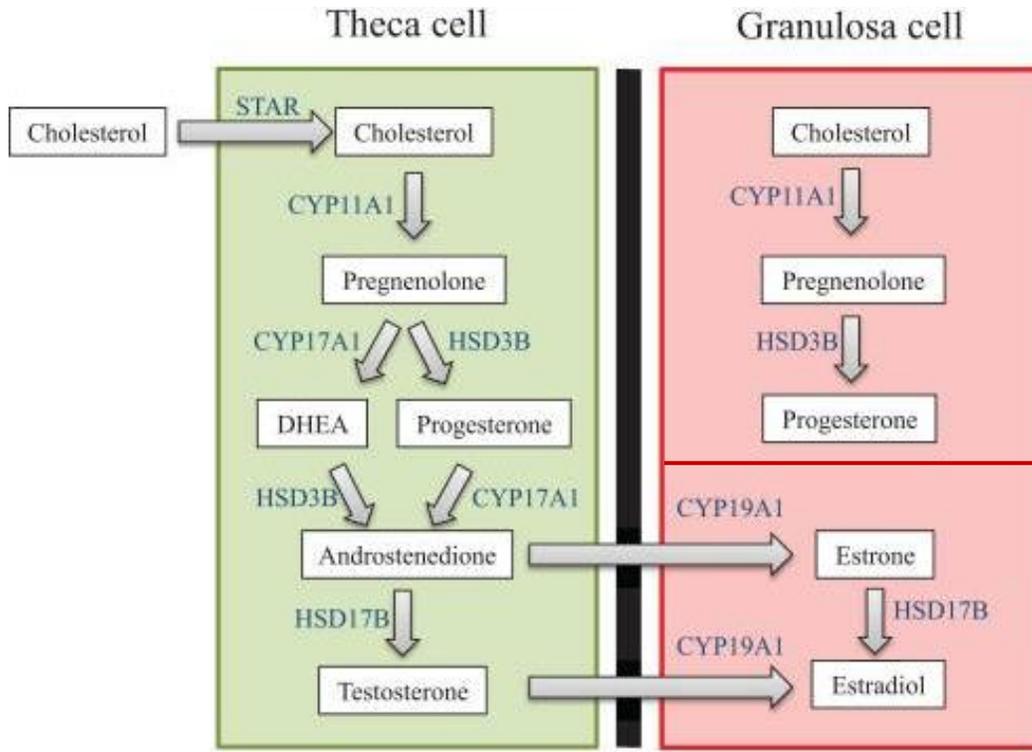


Figura 4. Esteroidogénesis ovárica

En la figura se muestra las reacciones enzimáticas realizadas en los dos tipos celulares, encargados de la producción de hormonas, presentes en el folículo. Figura tomada y modificada de [58]

En las células de la granulosa murales, el colesterol es convertido a pregnenolona en la mitocondria a través del citocromo P450 (CYP11A1) al escindir la cadena lateral del colesterol. La pregnenolona difunde fuera de la mitocondria y es transportada al retículo endoplásmico liso donde es convertido a progesterona vía 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSD3B). La androstenediona puede ser convertida a estrona por la aromatasa (CYP19A1). La estrona es convertida a estradiol por la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSD17B) [68].

El estradiol no puede ser sintetizado sin la estricta coordinación de las células de la teca y de la granulosa, además de las hormonas LH y FSH derivadas de la pituitaria. Las células de la teca en folículos antrales tempranos solamente contienen receptores

de LH. Una vez unido al receptor, la LH estimula la transcripción de genes en las células de la teca que codifican a las enzimas que se requieren para la conversión de colesterol a andrógenos, estos pueden difundir desde las células de la teca a través de la membrana basal, hasta las células de la granulosa [69].

Las células de la granulosa en folículos antrales tempranos contienen solamente receptores de FSH; en respuesta a la unión de FSH a su receptor se estimula la transcripción de genes en células de la granulosa que codifican a las enzimas necesarias para la conversión de andrógenos a estrógenos [70].

1.3.3 Células de la cúmula

Los ovocitos y las células de la cúmula (CC) crecen y se desarrollan de manera coordinada y mutuamente dependiente. La interacción entre las CC y el ovocito implica tanto las uniones gap como los factores de señalización paracrina. Las uniones gap permiten la transferencia de moléculas pequeñas y facilitan el intercambio de iones y metabolitos de glucosa entre las CC y el ovocito. Más allá de la comunicación entre las CC y el ovocito, la composición y el ensamblaje apropiados de la matriz del cúmulo son esenciales para la ovulación, así como para el paso eficiente del ovocito a través del oviducto y la fertilización, ya que el hecho de no sintetizar los componentes de la matriz del cúmulo conducen a una fertilidad o esterilidad reducida [71].

Los componentes activos de la matriz de cúmulos provienen de varias fuentes: son sintetizados directamente por las CCs bajo el control de factores endocrinos y derivados de ovocitos, son secretados por células de la granulosa o entran en el folículo a través del plasma sanguíneo. Los factores derivados del ovocito inducen la expresión de varios genes en CCs, incluyendo la ácido hialurónico-sintasa 2 (HAS2), y el factor de diferenciación de crecimiento 9 (GDF-9). En consecuencia, como blancos de GDF-9 se expresan genes como el receptor tipo 2 de prostaglandinas (PTGER2), la prostaglandina-endoperóxido sintasa-2 (PTGS2, también llamada COX-2), la citocromo P450 aromatasa CYP19A1, entre otros (Figura 5) [71].

Los requerimientos energéticos del complejo ovocito-cúmula (COC) son únicos, debido a que las CCs y el ovocito presentan diferentes necesidades metabólicas. Los

ovocitos por si mismos son incapaces de tomar L-alanina o sintetizar colesterol a partir de acetato, y metabolizan pobremente la glucosa para la producción de energía. Las CCs metabolizan substratos alternativamente, como aminoácidos, colesterol y glucosa, los cuales son esenciales para el desarrollo y funcionamiento del ovocito [9, 72].

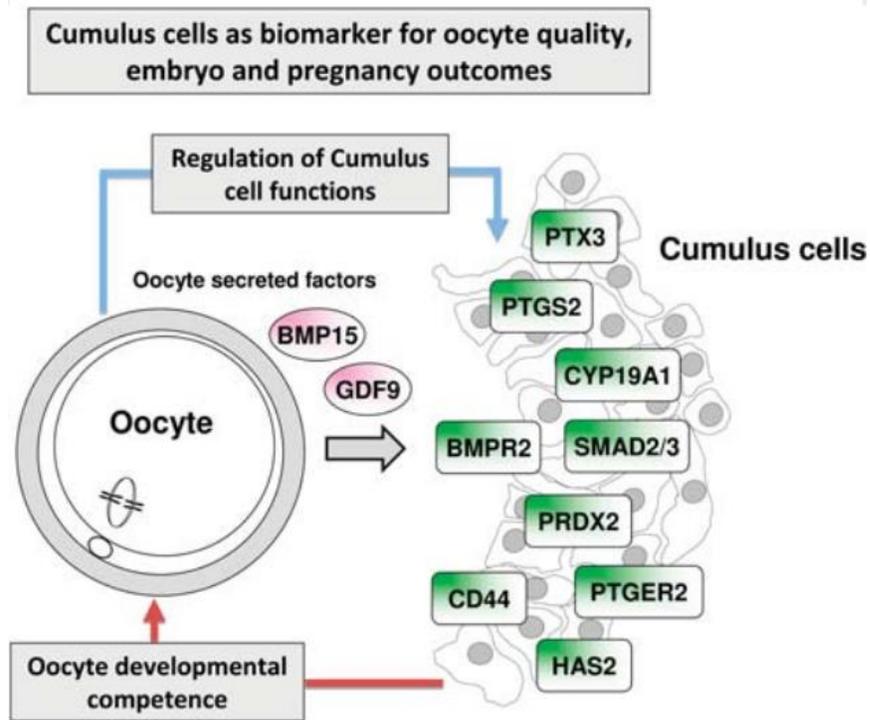


Figura 5. Papel de las CCs en la regulación del ovocito

En la figura se muestran los factores liberados por ovocito que inducen la diferenciación y expresión de marcadores de CCs. Figura tomada de [71]

1.3.4 Modelo *in vitro* de células de la granulosa

Diferentes grupos de trabajo, como Baumgarten en el 2014 y Pogrmic-Majkic en el 2019, han establecido cultivos primarios de células de la granulosa que son capaces de producir progesterona y estradiol, así como de expresar marcadores propios de este tipo celular como los mensajeros de CYP19A1 y CYP11A1 [73, 74]. Nuestro grupo de trabajo también estableció un cultivo primario de células de la granulosa humana del cual podemos obtener tanto células de la cúmula como células murales. Las células de la cúmula aisladas del ovocito y mantenidas en medio de cultivo, mantienen la expresión de marcadores transcripcionales propios, como HAS2 y PTGS2, durante las 18 h posteriores. Después de 18 horas se puede observar una disminución clara y marcada

de PTGS2, que disminuye su expresión en un 70%, lo que genera una ventana de trabajo en el laboratorio con estas células de al menos 6 horas [60, 75]. En este modelo *in vitro* también se evaluaron marcadores transcripcionales propios de las células murales. Se demostró que las células ya se pueden considerar murales a partir de las 18 h de cultivo, puesto que hay expresión del mRNA de LHCGR y CYP11A1 mediante RT-qPCR en el cultivo total y midiendo la producción de progesterona [60]. La expresión de la proteína o del mRNA de LHCGR hace la diferencia entre el fenotipo de células murales o de células de la cúmula en folículos preovulatorios, es el marcador clásico de este fenotipo. Los ovocitos suprimen la expresión de mRNA de LHR inducida por la hormona FSH en células de la granulosa, siendo dependiente de la etapa de desarrollo del ovocito [76]. CYP11A1 es la enzima involucrada en el primer paso de la vía esteroidogénica, encargada de convertir el colesterol en pregnenolona localizándose en mitocondria, y finalmente la enzima HSD3B se encuentra río abajo de la vía esteroidogénica, encargada de convertir la pregnenolona a progesterona (Figura 4); ambas enzimas son marcadores murales. Por inmunodetección se mostró la expresión de estos marcadores a las 48 h de cultivo indicando que el cultivo es de células murales; desde las 24 h las células son murales ya que cerca del 90% expresan ambos marcadores, a las 48 h el 98% del cultivo expresa claramente ambos marcadores [60]. Este modelo de cúmula y granulosa humana está bien caracterizado en ambas condiciones, de tal manera que es funcionalmente equivalente a la granulosa *in vivo* y permite el análisis de los efectos de sustancias reprotóxicas que afectan la funcionalidad ovárica. Esto lo convierte en un modelo adecuado para estudiar los efectos de la insulina sobre la granulosa humana.

1.4 Justificación

La hiperinsulinemia es una característica fuertemente arraigada en la paciente con SOP. La insulina regula la esteroidogénesis ovárica, y la producción de progesterona en cultivos de células ováricas humanas. Los mecanismos moleculares implicados en la desregulación de la funcionalidad de las células de la granulosa causada por la exposición constante a insulina no han sido evaluados a profundidad; por lo tanto, su análisis es esencial para avanzar en el entendimiento de las alteraciones metabólicas-hormonales asociadas con la infertilidad en las pacientes con SOP.

1.5 Hipótesis

La exposición a insulina afectará la funcionalidad y expresión génica de las células de la granulosa en cultivo (células de la cúmula y células murales), afectando la expresión de componentes de la vía esteroidogénica, la producción de progesterona y la captura de glucosa.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la exposición a insulina sobre la funcionalidad y la regulación transcripcional de genes esteroidogénicos en un modelo de células de la granulosa *in vitro* (cúmula y murales) para explorar los mecanismos moleculares implicados en las posibles acciones tóxicas de esta hormona.

1.6.2 Objetivos particulares

- ❖ Analizar los efectos de la exposición a insulina sobre la producción de progesterona en las células de la granulosa/murales luteinizadas en cultivo.
- ❖ Analizar la expresión de los genes CYP11A1, HSD3B1 y SF-1 en células murales tras la exposición a insulina.
- ❖ Analizar la expresión de GLUT6 y PTGS2 en células de la cúmula expuestas al tratamiento con insulina.
- ❖ Analizar las posibles vías de señalización involucradas en la regulación ejercida por la insulina en células de la granulosa (cúmula y murales).

2 Métodos

2.1 Diseño experimental

Se utilizaron células de la granulosa humana, obtenidas de pacientes que acuden al instituto Ingenes SC por algún problema de infertilidad (excluyendo pacientes con SOP) y donantes de óvulos (mujeres fértiles) que fueron atendidas en el instituto. Se trabajó con las células en los estadios de cúmula y murales, ya que ambos tipos celulares representan funciones ováricas diferentes. Ambos cultivos fueron expuestos a insulina, en las células de la cúmula evaluó la captura de glucosa y en las células murales producción de progesterona, por ser los eventos funcionales principales de estos tipos celulares; asimismo, se evaluaron los cambios en la expresión de los genes relacionados con la esteroidogénesis (Figura 6).

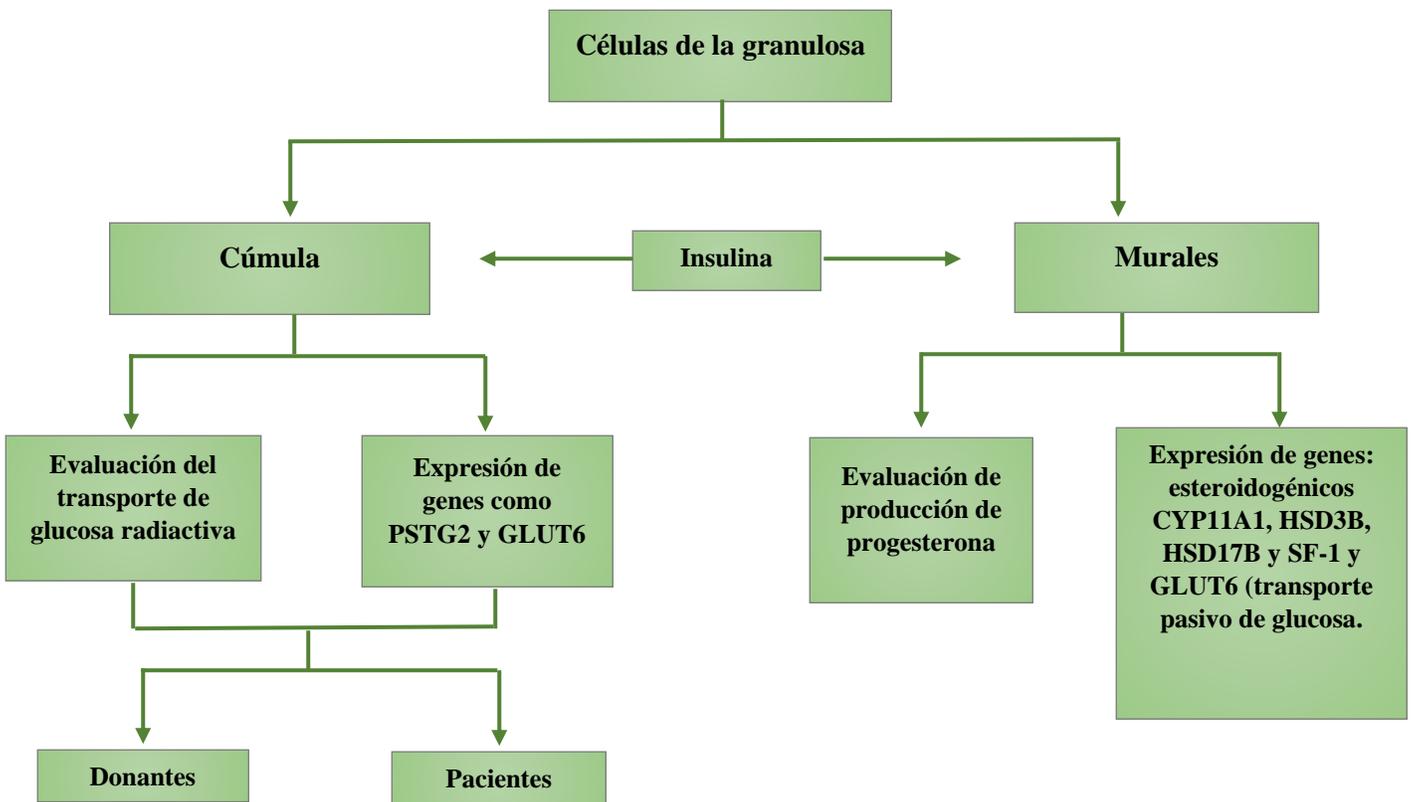


Figura 6. Diseño experimental

En la figura se muestra el diseño experimental planteado para realizar las evaluaciones propuestas en los dos tipos celulares,

2.2 Células de la cúmula humana

2.2.1 Principio

Las células de la cúmula se diferencian a este tipo celular gracias a factores liberados por el ovocito, como GDF9 y BMP15, los cuales permite su diferenciación de células murales a células de la cúmula y tiene lugar el COC. Las células obtenidas de pacientes y donantes del instituto INGENES mantienen su identidad como célula de la cúmula durante periodos de tiempo cortos ya que se les ha removido el ovocito y sin este vuelven a diferenciarse hacia células murales. En el laboratorio se tiene evidencia de que su morfología no ha cambiado y siguen expresando los marcadores específicos (Tabla 5) que las hacen células de la cúmula por un máximo de 18 h, no obstante, en el laboratorio se trabaja con estas células por no más de 6h, con el objetivo de evitar la fase donde se da el switch de la expresión de marcadores.

Tabla 5. Marcadores de expresión que se utilizan para identificar células de la cúmula

Células de la Cúmula			
Gen	Nombre	Función	Detectado en este cultivo
CD44	Glicoproteína de la superficie celular CD44	Receptor de hialuronona (HA)	No analizado en este estudio
BMPR2	Receptor de proteína morfogenética ósea 2	Se une a GDF9 para activar a ALK5	No analizado en este estudio
ALK5	Receptor TGF-beta tipo 1	Receptor de GDF9 y BMP15. Activa la vía de señalización de SMAD2/3	No analizado en este estudio
RHAMM	Receptor de movilidad mediado por hialuronano	Receptor de HA. Regula la activación de ERK1/2	No analizado en este estudio
HAS2	Ácido hialurónico sintasa 2	Convierte UDP-N- acetil glucosamina en HA	No analizado en este estudio
PTGS2	Prostaglandina-endoperoxido sintasa 2	Permite producir prostaglandinas a partir del ácido araquidónico	Positivo qPCR
VCAN	Versican	Participa en la adhesión celular, proliferación, migración y angiogénesis	Positivo qPCR

Información tomada de [77, 78]

2.2.2 Procedimiento

Para la utilización de las células de la cúmula que se obtuvieron a partir del rasurado de ovocitos de pacientes y donantes del Instituto INGENES. Las células se transportaron al CINVESTAV en medio de cultivo DMEM/F12 Advanced (ampicilina 50 U/mL, estreptomicina 50 µg/mL, gentamicina 10 µg/mL). Al llegar al laboratorio, se realizaron tres lavados con PBS 1x atemperado, posteriormente las células se pasaron a una caja de cultivo y se les adicionó de 100-200 µL de hialuronidasa (1mg/mL, no. cat. 140318, Sigma Aldrich), y se disgregaron con ayuda de la punta de la micropipeta de 1000 µL. Se pasaron a un tubo Falcon con 2 mL de medio y se homogeneizó, se centrifugó a 3200g por 5 minutos.

Se retiró el medio con cuidado y se resuspendió con 1mL de medio nuevo. A un tubo Eppendorf de 0.6mL se adicionaron 10µL de la suspensión celular y 10µL de azul de tripano (número de catálogo), se homogeneizó por pipeteo. Se tomó 10µL que se colocaron en una laminilla (*Countess cell counting chamber slides*, Invitrogen) para llevar al contador automatizado de células (*Countess Automated Cell Counting*, C10227 Invitrogen). Posteriormente se sembraron 300,000 células por pozo en una placa de 48 pozos en presencia de insulina (50 nM), y se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ por 30 min para culturas de glucosa y se sembraron 100,000 células por pozo en placas de 96 pozos en presencia de insulina (50nM) y se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ por 4 o 6h para la evaluación transcripcional.

2.3 Cultivo Primario de células murales luteinizadas

2.3.1 Principio

Los cultivos primarios son utilizados frecuentemente como modelos *in vitro* debido a que conservan la morfología de las células del órgano del que fueron aisladas, sus cromosomas tienen un número diploide, tienen inhibición por contacto y aunque su crecimiento *in vitro* es limitado. Representan modelos más cercanos a las células de las que se originaron, por tanto, su funcionalidad y actividad se asemeja a las de su ambiente natural. Particularmente este cultivo primario ha sido caracterizado de manera detallada con los marcadores que se observan en la Tabla 6.

El cultivo primario es de células luteinizadas, ya que han perdido al ovocito, y de manera natural, una vez que se da la ovulación inicia la formación del cuerpo lúteo conformado por células de la teca y de la granulosa. Las células murales luteínicas forman la principal masa del cuerpo lúteo y secretan estrógenos y progesterona.

Tabla 6. Marcadores de expresión utilizados para identificar células murales

Células Murales			
Gen	Nombre	Función	Detectado en cultivo
CYP11A1	Enzima de escisión del colesterol	Convierte el colesterol en pregnenolona	Positivo RT-PCR y CISH e IF
HSD3B1	Hidroxi- Δ -5-esteroide deshidrogenasa	Convierte pregnenolona en progesterona	Positivo RT-PCR y CISH e IF
HSD17B1	Estradiol 17-beta deshidrogenasa 1	Convierte la estrona en estradiol	No analizado en estos estudios
LHCGR	Receptor de hormona luteinizante.		Positivo RT-PCR y CISH e IF
CYP19A1	Aromatasa	Convierte la androstenediona y testosterona en estrona y estradiol	No analizado en estos estudios

Información tomada de [60, 78]

2.3.2 Procedimiento

El cultivo primario de células murales se realizó a partir de un pool de células en una proporción 1:1 o 1:2 paciente-donante. Las células de la granulosa fueron separadas del COC después del rasurado de los ovocitos de pacientes (que acuden por problemas de fertilidad) y donantes (que acuden a donar sus ovocitos y no presentan problemas de fertilidad) del Instituto Ingenes. De la obtención de células de las pacientes se excluyó a aquellas con SOP, en la Tabla 7 se muestran la etiología femenina de estas pacientes, así como su índice de masa corporal y el promedio de la edad, el peso y talla. De las células de las donantes no si tienen registros sobre el estatus de salud ya que se considera que son mujeres sanas, sin problemas de fertilidad o de peso.

Tabla 7. Características de las pacientes cuyas células se emplearon para el cultivo de células murales

Etiología femenina		IMC		Edad [años]	Peso [kg]	Talla [m]
Edad	26	Bajo peso	2	37	63	1.6
Baja respuesta	8	Normopeso	33			
Endometriosis	5	Sobrepeso grado 1	10			
Fallo gestacional RA	1	Sobrepeso grado 2	11			
Normal	15	Obesidad tipo 1	9			
Fallo tubario	4	Sin datos	5			
Sin datos	11	Total	70			
Total	70					

Etiologías: edad: mujeres mayores de 35 años; baja respuesta: al tratamiento hormonal; fallo gestacional RA: fallo en reproducción asistida en otro centro.

Las células se transportaron al CINVESTAV en medio de cultivo DMEM/F12 *Advanced* (ampicilina 50U/mL, estreptomina 50µg/mL, gentamicina 10 µg/mL). Al llegar al laboratorio se realizaron tres lavados con PBS 1x atemperado, posteriormente se pasaron las células a una caja de cultivo y se les adicionó de 100-200 uL hialuronidasa (1mg/mL, No cat.140318, sigma ALdrich), con la punta de la micropipeta de 1000 µL se mezcló hasta disgregar. Se pasó a un tubo Falcon con 2 mL de medio y se homogeneizó, se centrifugó a 3200g por 5 minutos. Se retiró el medio con cuidado y se resuspendió con 1mL de medio. A un tubo Eppendorf de 0.6mL se adicionaron 10 µL de la suspensión de células y 10 µL de azul de tripano (número de catálogo), se homogeneizó por pipeteo. Se tomaron 10 µL que se colocaron en una laminilla (*Countess cell counting chamber slides*, Invitrogen) para llevar al contador automatizado de células (*Countess Automated cell counting*, C10227 Invitrogen). Posteriormente se sembraron 100,000 células por pozo en una placa de 96 pozos y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ por 24h. Posteriormente se dio el tratamiento con insulina (50 y 100 nM) por 24 y 48h.

2.4 Captura de glucosa radiactiva [³H]-2-Deoxy D-glucosa

2.4.1 Principio

La captación de glucosa radiactiva es una medida biológica de la entrada de glucosa a las células que puede llevarse a cabo a través de transportadores o pasivamente para probar activadores o inhibidores en el cultivo celular y cómo afectan el uso de glucosa y la capacidad de la célula para responder a la insulina. El uso de material radiomarcado mejora la sensibilidad de la medición, particularmente con tritio (³H), así como alta resolución. El ³H proporciona una señal a nivel subcelular.

2.4.2 Procedimiento

Las células de la granulosa, cúmula expuestas por 30 min a insulina 50 nM o murales expuestas por 20 h a insulina 100 nM, o no expuestas a insulina se depositaron en placas de 96 pozos. Posterior al tiempo de tratamiento con insulina se realizó el ensayo de captura de glucosa siguiendo el protocolo reportado por Méndez-Flores y colaboradores en el 2016 [79]. Posterior al tratamiento, las células fueron estimuladas con una solución tampón de ensayo, después de una absorción del análogo de glucosa por 30 min en la misma solución, que contenía 0.4 µCi/mL de [³H]2DOG (20 nM), más 1-5 mM de 2DOG no marcada. Cuando se indicó el NaCl fue sustituido por cloruro de colina y se añadió EDTA a la solución tampón de ensayo. La captura de [³H]-2DOG se inició mediante la adición de 0.25 mL de solución de captura por pocillo. Los parámetros cinéticos se estimaron mediante un ensayo de captación con concentraciones crecientes de 2DOG sin marcar: 0, 0.1, 0.5, 1 y 2 mM más una concentración fija de 2DOG marcada (20 nM), el tiempo de recaptura fue de 30 min. La reacción se detuvo por medio de la aspiración del medio radioactivo y se lavó el fondo con una solución tampón de ensayo frío (con hielo). Las células de la granulosa fueron lisadas con NaOH 0.1M a temperatura ambiente, una alícuota de muestra fue usada para determinar proteína por el método de Bradford, y la radioactividad de las muestras se determinó por centelleo líquido en un contador de centelleo Perkin Elmer. Los experimentos se realizaron por triplicado con determinaciones por cuadruplicado.

2.5 Extracción de ARN en células de la granulosa

2.5.1 Principio

La extracción consiste en la separación de polímeros de ARN con el fin de estudiarlo, analizarlo o manipularlo. Para lograr dicha separación se hizo uso de Trizol, que es una solución monofásica de fenol y de isotiocianato de guanidina que permite el aislamiento de ARN, ADN y proteínas. Durante la lisis, el Trizol mantiene la integridad del ARN mientras se disuelven los componentes de la célula. Este método de purificación permite el uso de columnas que aseguran la elución de ARN ultra-puro libre de sales e inhibidores.

2.5.2 Procedimiento

El inicio del protocolo de extracción de ARN se llevó a cabo con el uso de Trizol *Tri-Reagent (No cat. Sigma-Aldrich)*, posteriormente se siguió lo establecido en el producto *Direct-zol™ RNA Microprep de Zymo Research*. Dentro del tubo que contiene las células de la granulosa lisadas se añadió un volumen igual de etanol (95-100%). La mezcla se transfiere a una columna Zymo-Spin™ IC Column y un tubo Collection Tube, se centrifugó. Se transfirió la columna a un tubo nuevo de colección y se descartó el líquido. En este paso se recomienda el tratamiento con ADNasa I, para lograr una mayor pureza de la muestra de ARN. Después se añadieron a la columna 400 µL de Direct-zol™ ARN PreWash y se centrifugó. Se descartó el líquido y se repitió este paso. Se le colocaron 700 µL de ARN Wash Tampon a la columna y se centrifugó por 1 minuto se descartó el líquido y se centrifugó de nuevo por 1 minutos para asegurar la remoción completa del tampón de lavado. Se transfirió la columna con cuidado a un tubo libre de ARNasa para eluir el ARN, se le añadieron 15 µL de agua DNase/RNase-Free a la columna y se centrifugó por 2 minutos. Posteriormente se guardó el ARN a -20 °C (no más de un día) hasta su uso.

2.6 Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-qPCR)

2.6.1 Principio

La PCR se basa en la reacción en cadena de la ADN polimerasa en la cual un fragmento de ADN conocido es copiado y amplificado billones de veces. La PCR en tiempo real es

una modalidad de la PCR de punto final, donde la acumulación de ADN amplificado es detectada y cuantificada a medida que la reacción avanza, es decir, “en tiempo real”. Esto se logra gracias a la incorporación de una molécula fluorescente que se asocia al ADN amplificado, donde el aumento de la fluorescencia es proporcional al incremento de la cantidad de moléculas de ADN amplificadas.

2.6.2 Procedimiento

La RT-qPCR se realizó mediante el kit One-Step NZYSpeedy RT-qPCR(NZTech), la mezcla de reacción se preparó en frío: en un tubo de reacción de 0.5 mL se agregaron 5 μ L de mastermix NZYRT 2x que contiene dNTPs, $MgCl_2$ y un buffer RT optimizador, 0.4 μ L de la mezcla de enzimas NZYRT que incluye la transcriptasa reversa NZY y el inhibidor de ribonucleasas NZY para proteger al ARN de alguna degradación, 0.4 μ L del primer forward y del reverse (20 μ M), 4 ng de la muestra de ARN y el volumen necesario de agua libre de nucleasas para llegar a un volumen de 10 μ L (cantidades por una reacción). Se agitó en vortex para mezclar los componentes y se guardó en frío. Las muestras se llevaron a un equipo *Step-one Plus* con sistema de PCR en tiempo real (*Applied Biosystems*) para realizar la amplificación y cuantificación. La RT-qPCR consiste en síntesis inicial de cDNA llevada a cabo por la transcriptasa reversa a una temperatura de 60 °C por 5 min, la posterior activación de la polimerasa da a 95 °C por 5 min, seguido de 40 ciclos de 95°C de 3 seg seguido de una baja de temperatura a 60°C por 30 seg para cada ciclo. Se añadió estadio de curva de *melt*. La abundancia relativa del mRNA se calculó con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ y se expresa como la muestra contra el control, normalizando los niveles de expresión con la de HPRT.

2.7 Cuantificación de progesterona

2.7.1 Principio

Ensayo inmunoluminométrico competitivo, que se basa en la interacción antígeno-anticuerpo. En un ensayo competitivo, un antígeno libre (Ag) compite con un antígeno marcado (Ag*) por un número fijo y limitado de sitios de unión del anticuerpo. La extensión de la unión anticuerpo (Ab)-Ag* depende de la concentración de Ag libre. A mayor concentración de analito (Ag libre), menos Ag* se une al Ab, permitiendo la cuantificación de la concentración del analito (Ag libre). Utiliza un anticuerpo monoclonal anti-

progesterona para etiquetar N-(aminobutil)-N-(etilisoluminol) (ABEI) y utiliza otro anticuerpo monoclonal para recubrir las microperlas magnéticas.

2.7.2 Procedimiento

Antes de la cuantificación, se diluyeron los medios de cultivo con suero sanguíneo masculino. Para los medios de 24h la dilución fue de 1:100 y para 48 h la dilución fue de 1:200. El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo establecido en el estuche MAGLUMI PRG (CLIA). Se usa un anticuerpo monoclonal anti-PRG (progesterona) para marcar con ABEI y un antígeno purificado de PRG para marcar con FITC. Se usó el analizador *Snibe Diagnostic* MAGLUMI 800. Se colocaron 40 µl de la muestra/calibrador, 40 µl de la etiqueta ABEI, 40 µl de la etiqueta FITC y 20 µl de microperlas nanomagnéticas. La muestra, el calibrador o el control marcado con ABEI, FITC y las perlas magnéticas recubiertas con anti-FITC se mezclaron en el fondo y se incubaron a 37°C por 15 min, formando complejos anticuerpo-antígeno; después del sedimentado en un campo magnético, se decantó el sobrenadante y seguido se hace un ciclo de lavado por 1 min con 400 µl. Se agregaron los reactivos y se inició una reacción quimioluminiscente rápida. La señal de luz es medida por un fotomultiplicador dentro de 3 segundos, siendo proporcional a la concentración de progesterona presente en las muestras.

2.8 Inmunofluorescencia

2.8.1 Principio

La inmunofluorescencia es una técnica de inmunomarcaje que utiliza anticuerpos unidos covalentemente a moléculas fluorescentes para identificar blancos específicos en muestras celulares fijadas sobre un soporte sólido. La fluorescencia es un tipo de fotoluminiscencia en el cual las moléculas son excitadas por interacción con fotones de radiación electromagnética. Cuando el componente absorbe luz a una longitud de onda apropiada, hay excitación de electrones que oscilan en resonancia. La luz emitida puede ser observada directamente en el microscopio usando antígenos particulados. Esta técnica es principalmente cualitativa, aunque con algunas variantes cuantitativas,

resultando de gran utilidad para estudiar la presencia/ausencia y ubicación subcelular de proteínas.

2.8.2 Procedimiento

El cultivo de las células de la granulosa se fijó con paraformaldehído al 4% por 10 minutos. Seguido de un lavado con PBS, se permeabilizó por 10 min con el Tampón de Inmunofluorescencia (0.1% de Tritón, 0.02% de SDS, 10 mg/ml de BSA y PBS). Se lavó una vez con PBS y se incubó con el anticuerpo primario toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. La dilución del anticuerpo se hizo en el tampón de inmunofluorescencia, 1:25 para CYP11A1 (Novusbio, NBP1-54758, 0.05 mg/ml, [36]). Se dieron 2 lavados con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario por 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda (la dilución del anticuerpo será de 1:75 y se hará en el tampón de inmunofluorescencia, anti-rabbit para CYP11A1). Se le dieron dos lavados con PBS y finalmente se montaron con Vecta/Dapi.

2.9 MTT

2.9.1 Principio

Las células vivas y metabólicamente activas reducen el bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) (de color amarillo) a un compuesto coloreado e insoluble en agua llamado formazán (color púrpura). El precipitado de los cristales debe ser disuelto utilizando un solvente. La lectura se hace a una absorbancia de 570 nm.

2.9.2 Procedimiento

Se preparó una solución de MTT en PBS a una concentración final de 5 mg/ml. A cada pozo de las placas con células se le añadió 20 µL de la solución de MTT preparada, posteriormente se incubó la placa durante 2 h a 37 °C, en atmósfera de CO₂ al 5%. Se retiró el medio y se le agregó 100 µL de isopropanol/HCl 0.4% para disolver los cristales de formazán. La placa se mantuvo en agitación por 2 minutos. Se tomaron 85 µL del formazán disuelto y se pasaron a otros pozos nuevos. Posteriormente, se midieron a una absorbancia de 570 nm mediante el espectrofotómetro TECAN infinite M200PRO. Los

valores de MTT se ajustaron con su respectiva cantidad de proteína. Para determinar el valor de proteína se retiró el medio de cada pozo y se le agregó 50 μL de tampón de lisis 1x y se agitó por 10 min. Se colocó 5 μL del lisado en un pozo nuevo y se le agregó 200 μL de Bradford 1x. Posteriormente, se midieron a una absorbancia de 595 nm mediante el espectrofotómetro TECAN infinite M200PRO.

2.10 Análisis Estadístico

Se utilizó el paquete estadístico de GraphPad Prism 6. Se realizaron las pruebas de distribución de Dunnet y una ANNOVA de comparación múltiple. Los resultados se expresan el promedio \pm el error estándar medio (SEM).

3 Resultados

3.1 Detección y cuantificación de los mensajeros de *GLUT6* y *SF-1*

Nuestro grupo de trabajo ha estandarizado un cultivo primario de células de la granulosa humanas para el estudio del papel de diferentes xenobióticos y su asociación con infertilidad. En los trabajos de tesis de Herrera-Cogno y Palafox-Gómez, se ha caracterizado dicho cultivo, al determinar la presencia de mensajeros de genes esteroideogénicos empleando la técnica de RT-qPCR (marcadores moleculares para cúmulo y murales). Gracias a estos trabajos, nuestro laboratorio cuenta con una batería de oligonucleótidos específicos para la amplificación de estos marcadores moleculares y evaluar así cambios en la expresión. Para cumplir con el objetivo de nuestro proyecto y determinar cuantitativamente los posibles cambios transcripcionales en genes de la esteroideogénesis y uno metabólico, se diseñaron oligonucleótidos adicionales para la amplificación de los genes *GLUT6* y *SF-1* (los oligonucleótidos para amplificar los otros genes a evaluar ya estaban estandarizados en el laboratorio).

La secuencia completa de cada gen fue localizada en la base de datos *National for Biotechnology Information* (NCBI). Con ayuda del programa Perl Primer3 se diseñaron los iniciadores *Forward* y *Reverse* bajo las siguientes consideraciones: longitud de los iniciadores de 20 a 24 pares de bases, contenido de G:C (Guanina: Citosina) entre 40 y 60%, y considerar en el diseño la ausencia de estructuras secundarias. En la Tabla 8 se muestran las secuencias de los iniciadores y el tamaño del amplicón esperado para cada gen; también se muestran estos datos para el gen *HPRT* el cual es utilizado como control de amplificación (gen endógeno).

Tabla 8. Oligonucleótidos diseñados para GLUT6 y SF-1

Gen	Iniciador Sentido	Iniciador antisentido	Tamaño amplicón
HPRT	GCCAGACTTTGTTGGATTTGA	AATAGGACTCCAGATGTTTCCA	176
GLUT6	CTCGGCAATTTTCAGCTTTGGGT	TGGGATTTGGTCAGATGCAGGT	101
SF-1	TTCAGCCTGGATTTGAAGTTCC	TAGTGGCACAGGGTGTAGTC	98

La estandarización de la amplificación por PCR usando los oligonucleótidos diseñados se realizó con ARN total extraído de células murales sin tratamiento previo con insulina. La RT-qPCR se inició haciendo la amplificación de cada gen (*GLUT6* y *SF-1*) con un gradiente de temperaturas para determinar en cual se tenía la mejor amplificación sin la presencia de estructuras secundarias. Una vez que se tuvo la temperatura optima se realizó una curva estándar con concentraciones variables de ARN para evaluar la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos diseñados. Se utilizó como control interno la amplificación del gen HPRT, ya estandarizado en el laboratorio. Como se observa en la Figura 7, en la parte superior, todos los casos muestran curvas de disociación con un solo pico, lo cual corresponde a la amplificación de un solo producto con una temperatura de disociación experimental (T_m : 80.2 °C para HPRT, 84.5 °C para GLUT6 y 84.2 °C para SF-1) similar a la teórica (T_m : 78 °C, 82 °C y 80 °C respectivamente). El análisis de la amplificación de la curva estándar nos permitió determinar la eficiencia de amplificación de cada uno de los oligonucleótidos, la cual está por encima del 80%, que es el mínimo aceptable para contar con un diseño de oligonucleótidos cuantificables (Tabla 9).

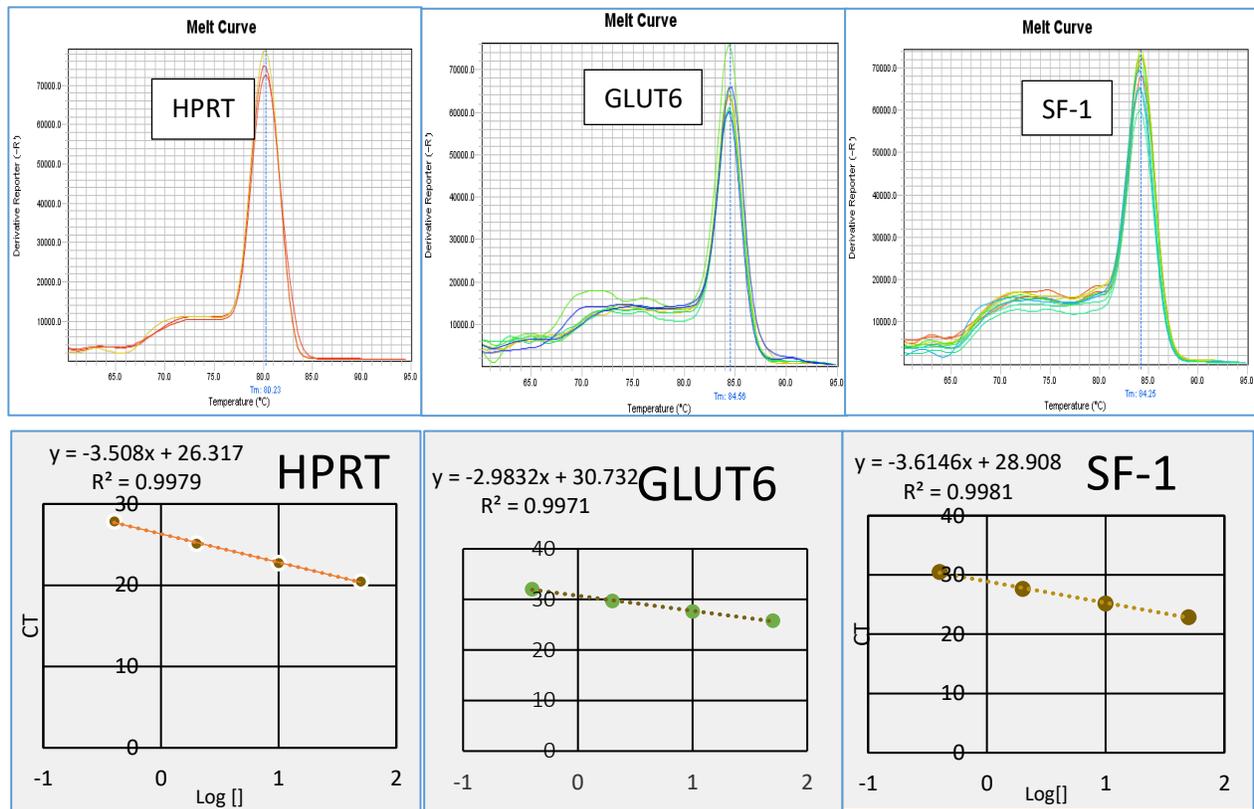


Figura 7. Características dinámicas de los amplicones

En la parte superior de la figura se muestra las curvas de disociación para HPRT, GLUT6 y SF-1, en donde se observa la presencia de un solo pico de amplificación. En la parte inferior se observan los resultados de la curva estándar llegando a la obtención de una R^2 de 0.99 para los tres genes amplificados.

Tabla 9. Eficiencia de amplificación para los genes GLUT6 y SF-1

Gen	Pendiente	Eficiencia de amplificación (%)
HPRT	-3.508	92.78
GLUT6	-2.9832	90.33
SF-1	-3.6146	89.104

Con la finalidad de corroborar la presencia de un solo producto de amplificación, se caracterizaron los amplicones mediante una electroforesis capilar en el equipo LabChip GX. Como se muestra en la figura 8, los amplicones de GLUT6 y SF-1 presentan una sola banda de amplificación con un tamaño similar al teórico esperado (101 y 98 pb

respectivamente). Mientras que HPRT muestra un ligero bandeo por arriba del peso esperado, cabe destacar que dichas bandas no se definen en un peso específico. La tecnología de LabChip GX además proporciona información relevante acerca de la pureza y concentración de cada uno de los productos de amplificación, como se muestra en la Tabla 10 la pureza de la amplificación para los genes GLUT-6 y SF-1 es mayor al 85%. Sorprendentemente en el caso de HPRT esa pureza es de 95 %. Estos resultados nos permiten corroborar que la señal de amplificación proviene del producto con el tamaño esperado. Con estos resultados concluimos que tenemos un juego de primer para la detección de *GLUT6* y *SF-1* con una buena eficiencia de cuantificación.

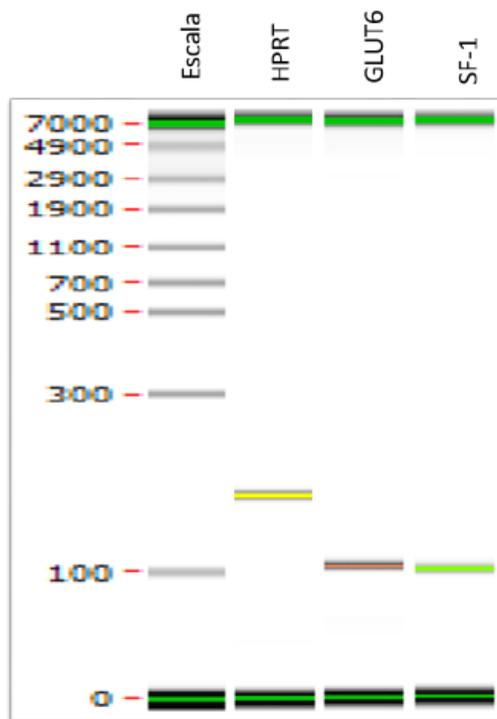


Figura 8. Electroforesis capilar

La figura muestra la separación por electroforesis capilar de los productos de amplificación de cada gen evaluado, HPRT, SF1 y CYP11A1, en la que se observa una sola banda de amplificación, las cuales corresponde al tamaño teórico.

Tabla 10. Caracterización de los amplicones mediante electroforesis capilar

Gen	Concentración (ng/μL)	Pureza (%)	Tamaño (BP)
HPRT	4.38	95.44	176
GLUT6	3.42	90.37	101
SF-1	2.4	88.15	98

3.2 Modelo 1 de células de la cúmula: Efecto de la insulina sobre la captura de glucosa

3.2.1 Evaluación del transporte de glucosa

Para evaluar la respuesta metabólica de las células de la cúmula, se llevaron a cabo evaluaciones de la captura de glucosa radioactiva en estas células tanto de pacientes como de donantes (ambas expuestas a estimulación ovárica controlada con gonadotropinas) de manera individual, y después de una exposición por 30 min a una concentración de 50 nM de insulina.

En la Figura 9 se observa que las células de las pacientes (cuyas causas de infertilidad se muestran escritas sobre sus barras correspondientes) y donantes, presentan una respuesta metabólica variable ante el estímulo de insulina. Esta variabilidad en la captura de glucosa es muy diferente en las donantes ya que los resultados de las tres son diferentes mientras que, en las pacientes, dos de ellas tienen una captura similar que es muy alta en comparación a las otras tres pacientes que tienen una captura menor pero similar entre ellas; es importante notar que hay una tendencia a aumentar la captura después del estímulo de la insulina. Este resultado indica que existe variabilidad metabólica en la respuesta a la insulina, diferente en cada muestra celular de mujeres atendidas por infertilidad o donantes fértiles. Los datos como los niveles de insulina en suero en ayunas o el valor de HOMA de cada paciente no pudieron ser obtenidos de los expedientes.

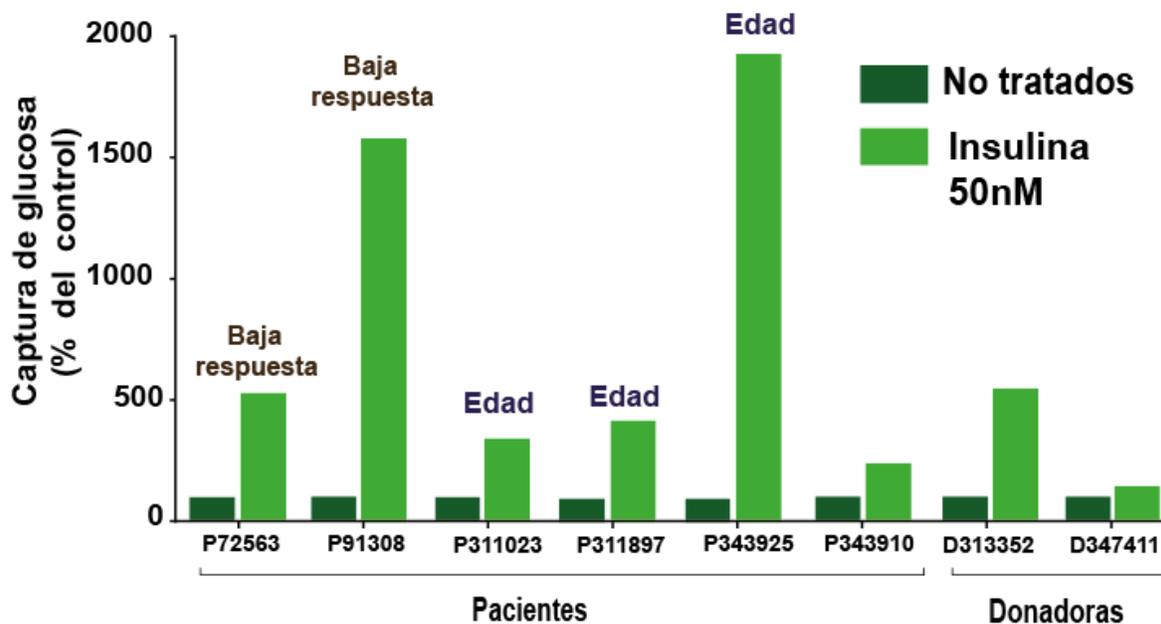


Figura 9. Captura de glucosa radioactiva de células de la cúmula de pacientes y donantes individuales. Las células de la cúmula que provienen de pacientes o donadoras (usadas de manera individual) fueron tratadas con insulina 50nM por 30 min, y se realizó el ensayo de captura de glucosa radioactiva. Los resultados se expresan en porcentaje con respecto a los controles no tratados y son el promedio de duplicados con un error no mayor al 10%. Baja respuesta: Se refiere a baja respuesta por parte de la paciente ante el estímulo hormonal recibido de manera externa; Edad: pacientes mayores a 35 años.

3.2.2 Expresión de *GLUT6* y *PTGS2* tras la exposición a insulina

Para determinar el posible efecto de la insulina sobre la expresión de un marcador metabólico como *GLUT6* y de un gen que participa en la ruptura del folículo para que se lleve a cabo la ovulación como *PTSG2*, se expusieron las células de la cúmula de donantes por 4 y 6 horas y de pacientes por 4 horas y a una concentración de 50 nM de insulina, y se evaluó la expresión de ambos genes por RT-qPCR. En la figura 10 se puede observar que la exposición a insulina afecta de manera consistente y negativa la expresión de *PTGS2* tanto en las cúmulas que vienen de las pacientes infértiles, como en las donantes, siendo más severo el efecto sobre las donantes. El efecto de la insulina sobre la expresión de *GLUT6* en cambio es variable, aunque con pocas diferencias significativas. Estos resultados indican que en este modelo es posible analizar la respuesta transcripcional de una muestra de cúmula que viene de una sola mujer, abriendo la posibilidad de analizar por qué *PTSG2* es regulado negativamente en condiciones de hiperinsulinemia.

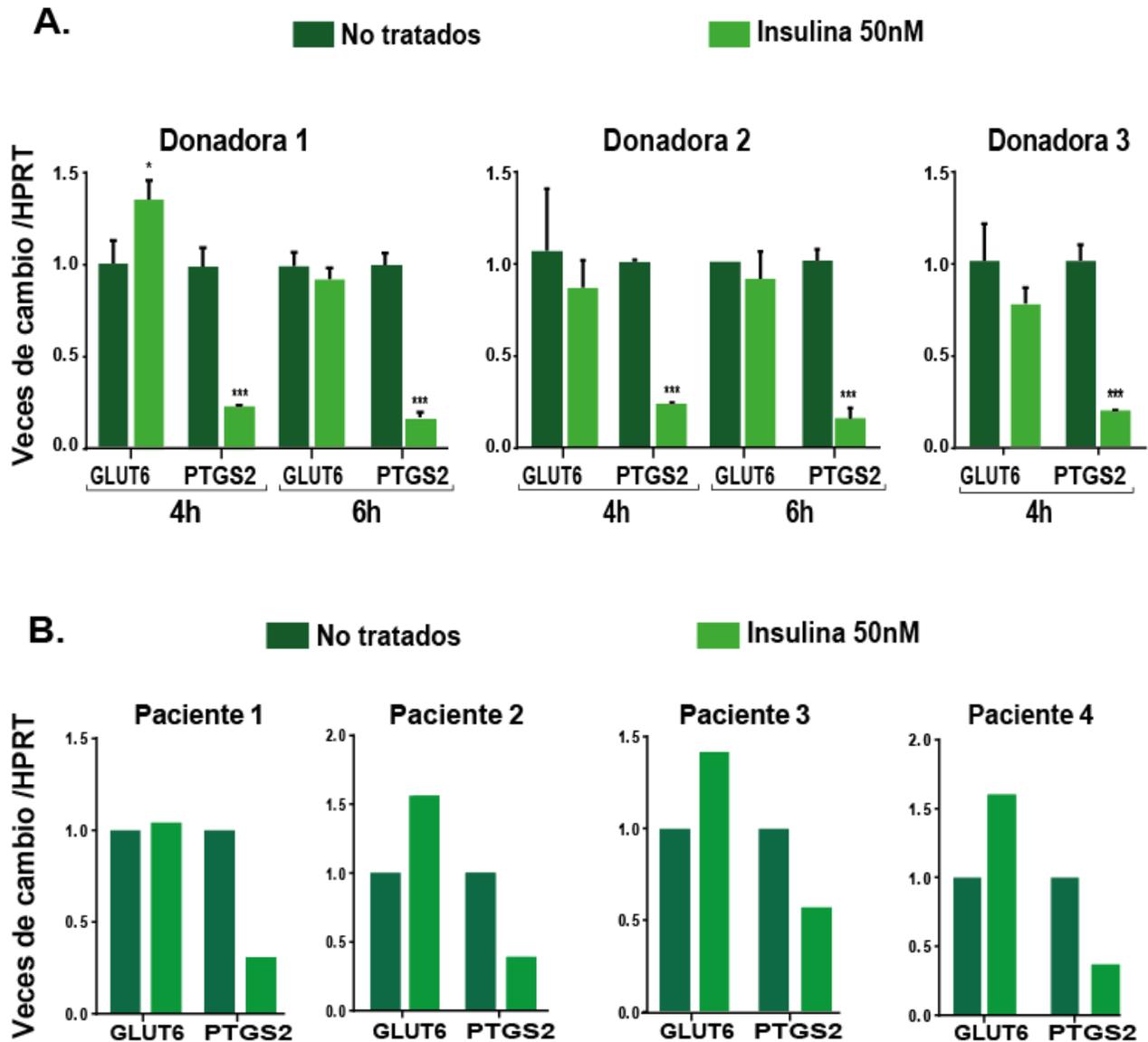
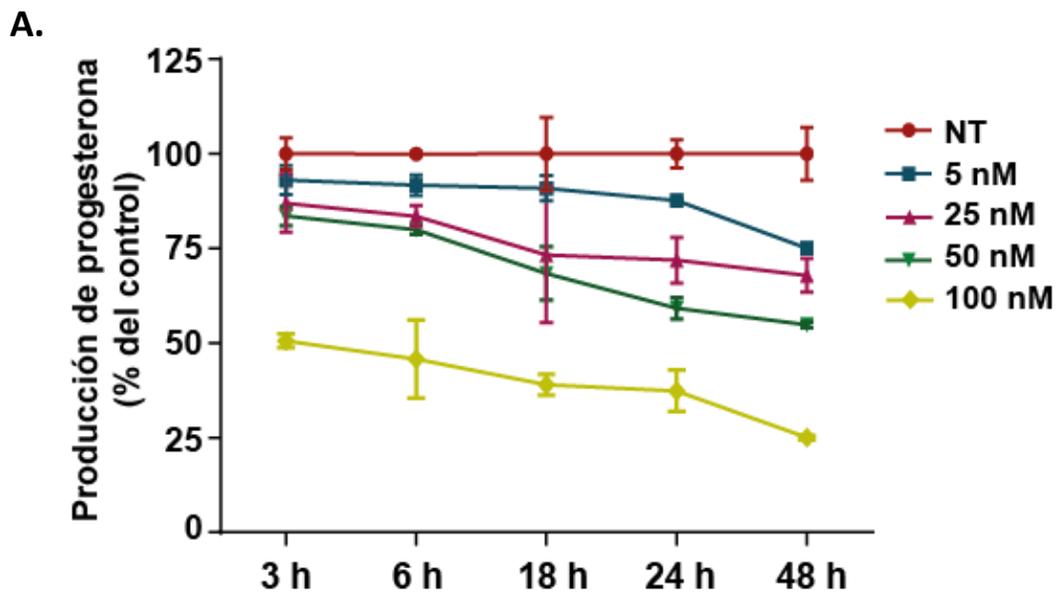


Figura 10. Efecto de la insulina sobre la expresión de genes en células de la cúmula.

Las células de la cúmula fueron expuestas a una concentración de 50 nM de insulina por un periodo de 4 y 6 h para donantes individuales (A) y por 4 h para pacientes individuales (B). Los resultados que se muestran son de siete muestras independientes. De las donantes se muestra promedio del duplicado, en las donantes se muestra el resultado sin repeticiones. Los datos se normalizaron respecto a los niveles de mRNA del control HPRT. Las diferencias estadísticamente significativas se reportan con respecto a los valores de los controles NT de cada gen (en las pacientes). Los datos se muestran como promedio \pm el SEM ($P < 0.05$; *** $P < 0.001$).

3.3 Modelo 2 cultivo de células murales: Efecto de la insulina sobre la producción de progesterona

Las células murales fueron expuestas a concentraciones crecientes de insulina variando los tiempos, para observar el efecto sobre la producción de progesterona. Los resultados se presentan en la Figura 11. En la gráfica A se observa que la exposición a insulina disminuye la producción de progesterona incluso en las concentraciones bajas y en los menores tiempos de exposición. Es importante observar que la exposición a 100 nM de insulina disminuye de manera severa y diferencial la producción de progesterona comparada con los otros tratamientos. En la tabla subsecuente se presentan los datos numéricos y estadísticos, observando una disminución “gradual” en la producción de la progesterona, en las concentraciones de 5, 25 y 50 nM, mientras que a 100 nM la disminución de la cantidad de progesterona detectada fue de más de un 50% desde el tiempo más corto.



B.

Tiempo de exposición	Producción de Progesterona (medio de cultivo; % control)				
	NT	Concentración de Insulina aplicada			
		5 nM	25 nM	50 nM	100nM
3 h	100	93.1	86.9	83.5	50.6***
6 h	100	91.7	83.5	79.9	45.8***
18 h	100	90.9	73.3**	68.4***	39.02***
24 h	100	87.7	71.9*	59.3*	37.4***
48 h	100	74.2*	67.9**	54.8***	25.2***

Figura 11. Cinética de producción de progesterona en células murales en respuesta a insulina

- A) Las células murales se expusieron a 5, 25, 50, 75 y 100 nM de insulina durante 3, 6, 18 y 24 horas. La progesterona liberada al medio de cultivo se midió después de la exposición. Los datos mostrados son el promedio de tres experimentos independientes por duplicado y expresados respecto al control.
- B) En la tabla se muestra el promedio de 4 experimentos independientes por duplicado. Se indican las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control NT para cada tiempo (*P<0.05; **P<0.005*** P <0.001)

Después de analizar los resultados de la cinética de afectación de la producción de progesterona, se eligió como dosis de trabajo 50 nM y como tiempo de exposición 24 h para continuar evaluando el efecto de la insulina sobre las células de la granulosa murales.

3.3.1 Viabilidad celular tras la exposición a insulina

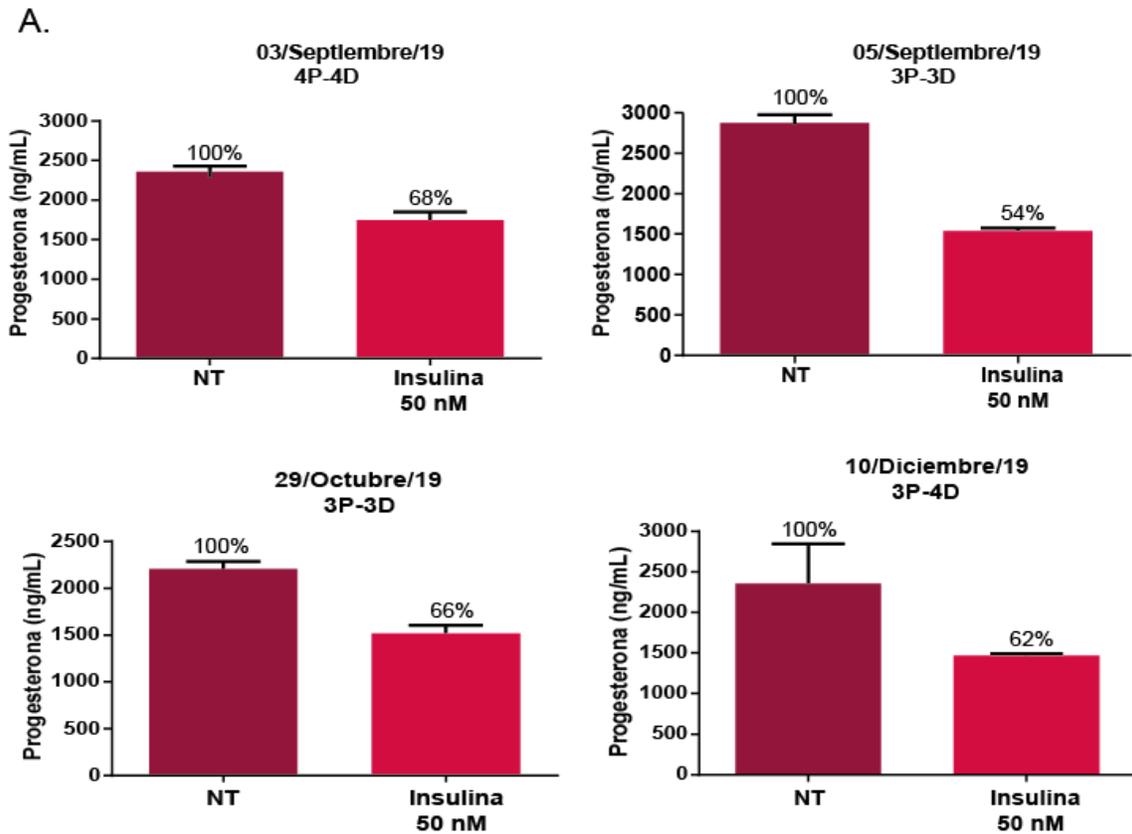
Debido al efecto negativo causado por la exposición a insulina sobre la producción de progesterona, se hicieron ensayos de viabilidad celular para descartar que la baja detección de progesterona no se debiera a un estado de muerte celular. Para esta evaluación se llevaron a cabo dos ensayos de viabilidad celular independientes: MTT, para evaluar la tasa de actividad mitocondrial y un ensayo de azul de tripano. Las células fueron expuestas a 50 y 100 nM de insulina por 24 y 48 h. La Tabla 11 muestra que la insulina no afecta la viabilidad celular, y confirma que la baja de progesterona en las células murales se debe a mecanismos que no están relacionados con la pérdida en la viabilidad. Los resultados se muestran como el promedio de un experimento por duplicado.

Tabla 11. Ensayos de viabilidad celular

Tiempo de exposición	Método	No tratado (%)	Insulina 50 nM (%)	Insulina 100 nM (%)
24h	MTT	100	111	112
	Azul de tripano	100	109	105
48h	MTT	100	126	121
	Azul de tripano	100	98	111

3.3.2 Efecto de la insulina sobre la producción de progesterona en cultivos murales independientes

Al trabajar el cultivo de células murales, se hace un “pool” de células que vienen de pacientes y de donantes; asimismo, cada vez que se lanza un cultivo primario, la mezcla resulta ligeramente diferentes aun tratando de conservar las proporciones pacientes/donante. Para determinar si cada cultivo primario independiente permitía obtener resultados reproducibles se cuantificó la producción de progesterona, posterior a la exposición a 50 nM de insulina por 24 h en cultivos realizados en distintos días, con células obtenidas de diferentes donantes y diferentes pacientes, pero respetando la proporción 1:1 o 1:2 pacientes-donantes. En la Figura 12 A se muestra la cuantificación de progesterona en cuatro cultivos distintos, en estas graficas podemos observar que la producción de progesterona se mantiene en un rango de 2200 a 2800 ng/mL en el grupo NT y de 1450 a 1750 ng/mL en las células murales tratadas, dejando ver que la disminución en la producción de progesterona es similar en todos los cultivos; en la parte B de la figura se observan las distintas etiologías de infertilidad, si es el caso, de las pacientes cuyas células se usaron para los cultivos, las donantes no presentan problemas de fertilidad. Estos resultados indican la reproducibilidad del cultivo y de las respuestas observadas, y que la mezcla entre células de diferentes pacientes (con diferentes etiologías de infertilidad), no afecta el sentido e incluso la magnitud de la respuesta.



B.

Cultivo	Etiología femenina
03/septiembre/19	2 baja respuesta 1 endometriosis 1 desconocida
05/septiembre/19	1 edad 1 fallo tubarico 1 normal
29/octubre/19	1 edad 1 normal 1 desconocida
10/diciembre/19	3 normal

Figura 12. La exposición a insulina disminuye la producción de progesterona en diferentes cultivos de células murales humanas.

Células murales de cuatro cultivos expuestas a 50 nM de insulina por 24 horas, se cosecharon y se cuantificó la producción de progesterona (A). En la tabla de muestran las etiologías de las pacientes que conformaron cada cultivo (B). Los datos de progesterona son el promedio de 4 experimentos independientes por triplicado y expresados respecto al control.

3.3.3 Efecto de la insulina sobre la expresión de genes de la esteroidogénesis

Las células murales fueron expuestas a insulina usando una concentración de 50 nM por 24 h; una vez cosechadas se extrajo el ARN total para llevar a cabo RT-qPCR y evaluar la expresión de genes que participan en la producción de progesterona como SF-1, *CYP11A1* y *HSD3B1* y también evaluar un gen que participa en la producción el estradiol *HSD17B1*. La detección del mensajero del gen GLUT6 se hizo para evaluar un gen relacionado con el metabolismo energético basado en glucosa en la granulosa, y como control se tomó a HPRT, un gen de expresión constitutiva. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la Figura 12 en la cual se observa que no hay efecto estadísticamente significativo sobre la expresión de GLUT6 antes y después de la exposición a insulina. También se observa que a la exposición de 50 nM de insulina hay un aumento de casi el 70% sobre la expresión de genes que participan en la producción de progesterona, en sentido opuesto, no se presenta efecto sobre *HSD17B1*.

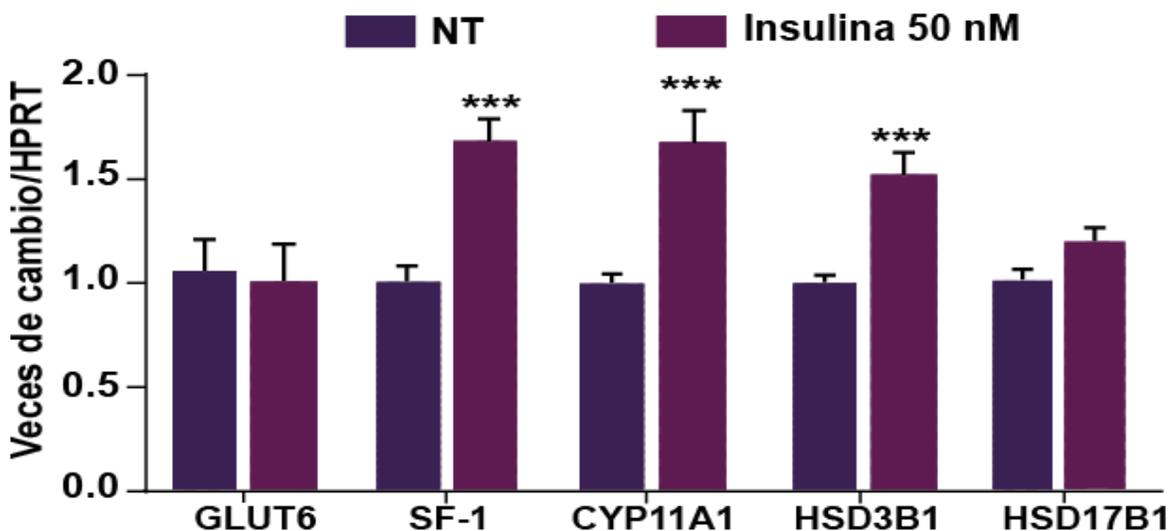
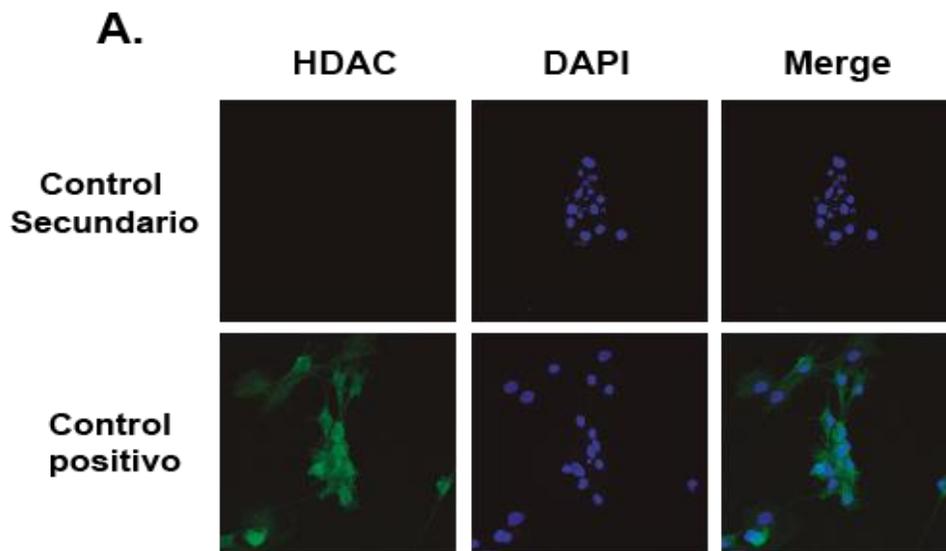


Figura 13. Efecto de la insulina sobre genes que participan en la esteroidogénesis y el metabolismo celular.

Células murales fueron expuestas a una concentración de 50nM de insulina por 24 h. Las células se cosecharon y se extrajo el ARN total para hacer RT-qPCR. Los datos se normalizaron respecto a los niveles de mRNA del control HPRT y son resultado de 3 experimentos por triplicado. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran en comparación con controles NT de cada gen. Se muestran promedios \pm el SEM de tres experimentos independientes por triplicado (* $P < 0.05$; *** $P < 0.0001$).

3.3.4 Efecto de la insulina sobre la presencia de la proteína CYP11A1 en células murales

Para continuar con el análisis de la expresión de genes que participan en la esteroidogénesis, también se realizó una evaluación cualitativa de los niveles de proteína CYP11A1, enzima que participa en el primer paso de la producción de progesterona, es decir la biotransformación de colesterol a pregnenolona en la mitocondria, por medio de una inmunofluorescencia indirecta tras la exposición a insulina 50 nM por 24 h. Los resultados observados en la Figura 14 muestran un aumento en los niveles de la proteína CYP11A1 en células tratadas, dichos resultados concuerdan con el aumento observado en el transcrito de *CYP11A1*, pero no con la disminución en la producción de progesterona.



B.

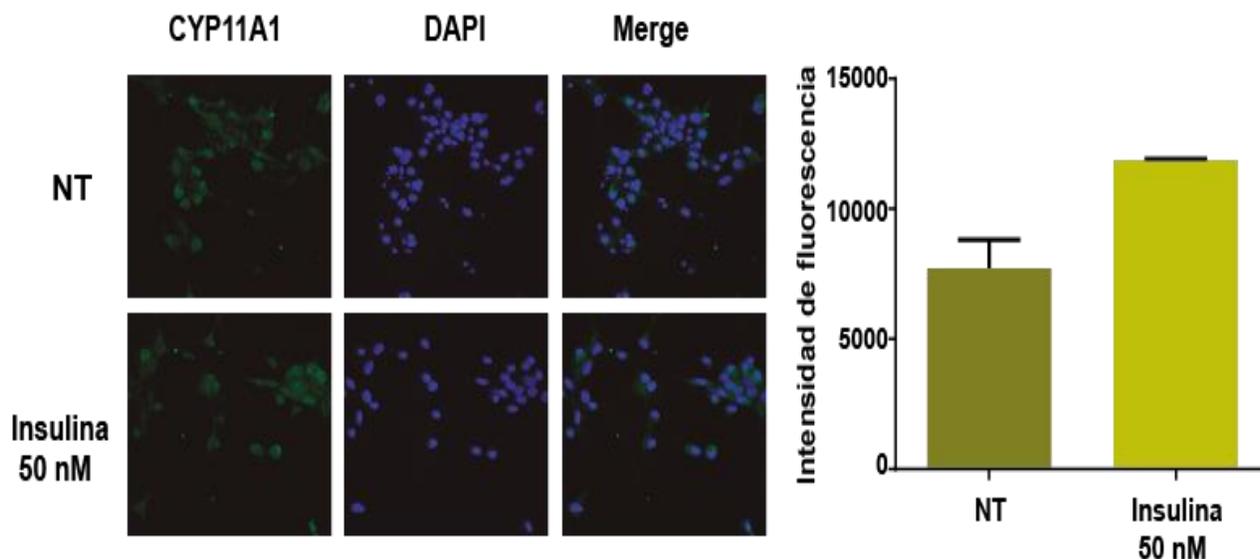


Figura 14. Efecto de la insulina sobre los niveles de la proteína CYP11A1

Células de la granulosa murales fueron sembradas en un portaobjetos con mini pozos (6) y expuestas a una concentración de 50nM de insulina por 24 h. La proteína CYP11A1 fue detectada mediante inmunofluorescencia. En panel A se observa el control secundario y el control positivo (anti HDAC). En el panel B se observa en color verde la detección de la enzima CYP11A1 con el anticuerpo anti-CYP11A1 (dilución de Ab 1:25). La cuantificación de la fluorescencia se realizó de al menos 50 células en 3 campos diferentes con el programa ImageJ.

3.3.5 Análisis del uso de Forskolina en la producción de progesterona y en la expresión de CYP11A1

Para avanzar en la caracterización del mecanismo molecular involucrado en la disminución de progesterona mediada por insulina, decidimos evaluar en primer lugar el rol de PKA sabiendo que esta vía está bien caracterizada como estimuladora de la producción de progesterona, muy probablemente a través del receptor de Factor de crecimiento parecido a insulina (IGFR). Como un primer acercamiento, las células murales fueron tratadas con forskolina (Fsk) para inducir un aumento en los niveles de AMPc y activar a PKA. Como se puede observar en la Figura 15 A, la exposición a 20 μ M de Fsk por 24 h aumenta los niveles de progesterona en el medio de cultivo comparada con la producción en el control no estimulado. Posteriormente se evaluó el efecto de Fsk sobre la expresión del gen *CYP11A1* a las 24 h de exposición con 20 μ M de Fsk,

encontrándose un aumento en la cantidad de transcrito de alrededor del 20% (Figura 15 B). Hace falta mayor evidencia experimental en presencia de inhibidores de la vía PKA (como el KT 5720) para asegurar que ésta esté involucrada

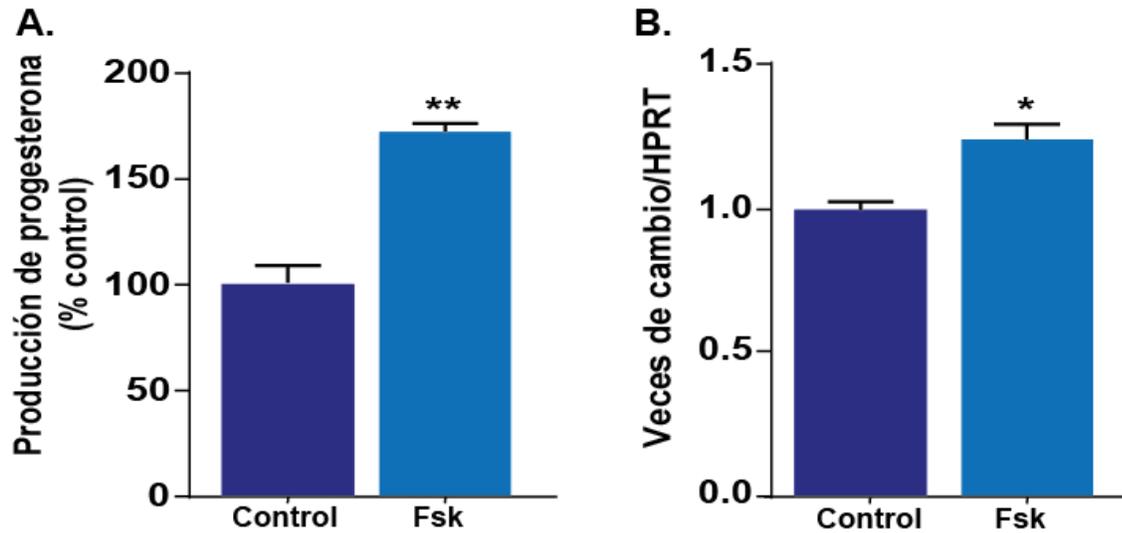


Figura 15. Efecto de la exposición a Fsk sobre la producción de progesterona y la expresión de CYP11A1.

Células murales fueron tratadas con forskolina 20 μ M por 24h, posteriormente se recolecto el medio de cultivo para realizar la cuantificación de progesterona en (A), las células fueron cosechadas para la extracción de ARN y posterior cuantificación del mensajero de CYP11Aa. Los datos son resultado de dos experimentos por duplicado. Se muestran promedios + el SEM de triplicados (* $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.0001$). Las diferencias estadísticamente significativas se muestran con respecto al control (no tratado).

4 Discusión

La hiperinsulinemia y la IR se han asociado con infertilidad en pacientes SOP y en las mujeres en general. El alza constante en la concentración de glucosa sanguínea, originada en la ingesta constante de carbohidratos puede exacerbar los síntomas del síndrome de ovario poliquístico. Varios autores discuten las contribuciones patológicas de los estados de hiperinsulinemia y de IR en SOP y se han observado mejoras reproductivas (ovulación) en estas pacientes cuando son tratadas con medicamentos como la metformina que permiten la sensibilización a la insulina [39, 63] o cuando se reduce sensiblemente el consumo de carbohidratos [80, 81]. Adicionalmente, hay estudios que han demostrado que existe una mejora en las pacientes con SOP que han sido llevadas a un estado de cetosis nutricional, al evitar el consumo en exceso de carbohidratos, porque disminuye la estimulación constante de la insulina y lleva al organismo a disminuir la hiperinsulinemia compensatoria que se presenta, mejorando la sensibilidad a la insulina. Disminuir el consumo de carbohidratos permite el uso de otras rutas metabólicas como la vía cetogénica; casi todas las células del organismo son capaces de realizar sus funciones tomando como combustible los cuerpos cetónicos (betahidroxibutirato y acetoacetato) y se podría pensar que también pueda ser el caso para las células ováricas [39, 80].

Kim y colaboradores en el año 2014 [63] observaron que en células de la granulosa murales de pacientes con SOP que mostraban un cuadro de RI presentaban una menor expresión del transportador de glucosa sensible a la insulina, *GLUT4* y, de manera posiblemente compensatoria, aumentaba la expresión del transportador *GLUT6*, un transportador no dependiente de la insulina. Este hallazgo nos hizo pensar en la posibilidad de que parte de las alteraciones hormonales observadas en pacientes SOP infértiles no solo fueran a nivel esteroideogénico sino también hubiera una influencia metabólica de la hiperinsulinemia constante; por ello decidimos analizar el mecanismo molecular que regula la expresión de genes involucrados en el correcto funcionamiento de las células de la cúmula que mantienen a los óvulos metabólicamente sanos.

En nuestro laboratorio se cuenta con un protocolo para el cultivo de células de la granulosa humana y este mismo se utilizó para la evaluación del efecto de la

hiperinsulinemia tanto en células de la cúmula como en células murales. El cultivo utilizado y caracterizado por nuestro grupo de trabajo nos permite trabajar con los dos tipos celulares: células de la cúmula y células murales. La cúmula está directamente asociadas con el ovocito y se ha descrito que existe una comunicación bidireccional entre el ovocito y las células de la cúmula que es esencial para el desarrollo y funcionamiento de ambos. El ovocito controla la actividad metabólica en estas células ya que este carece de la capacidad para transportar aminoácidos esenciales, realizar glucólisis y biotransformar al colesterol [82]. Es decir, las células de la cúmula tienen una función principalmente metabólica, para analizarla en las condiciones de nuestro modelo *in vitro*, se hizo la evaluación de su capacidad para transportar glucosa en un estado hiperinsulinémico (Figura 9) con un ensayo de captura de glucosa radiactiva individualizado que logramos estandarizar por primera vez en este tipo de células.

La variabilidad con la que las células de la cúmula incorporan glucosa permite sugerir que quizá atestigüemos estatus metabólicos diferentes en cada caso, ya sea donante o paciente. Esta variabilidad podría estar relacionada con el estado metabólico individual que bien se puede evaluar en un futuro en cada mujer atendida por infertilidad, resultando especialmente interesantes las pacientes obesas y con SOP. La posibilidad de determinar los niveles de insulina y glucosa, para obtener el HOMA R1, de cada mujer con SOP puede bien determinarse al mismo tiempo que se hace la última estimación de estradiol, al final de la estimulación ovárica controlada, y de esta forma podremos establecer si hay respuestas diferentes acordes al estado de RI registrado, al menos como una primera aproximación.

Cheng-Jie y colaboradores en el 2016 en un cultivo de células de la cúmula de ratón hembra evaluaron el papel de estas células sobre la maduración del ovocito y el éxito al realizar una fertilización *in vitro*. Encontraron que estas células y las uniones gap que tienen con el ovocito son necesarias para una buena maduración y permiten una mejor fertilización y formación de blastocisto [83]. Ge Li y colaboradores en el 2008 también evaluaron células de la cúmula de ratón hembra. Trabajaron con dos cultivos uno consistía en la siembra de ovocitos sin células de la cúmula y el otro eran los ovocitos con una monocapa de células de la cúmula. Encontraron que aquellos ovocitos

sembrados sin CCs presentaban problemas de maduración y por lo tanto una menor fecundación, ellos mencionan que estos problemas se revertían al tener la presencia en el cultivo de una monocapa de CCs debido a que este cultivo tuvo una adecuada maduración y una adecuada progresión a metafase [84]. Estos acercamientos sobre el papel de las CCs nos muestran la importancia sobre el ovocito y por tanto sobre la fertilidad y que alteraciones en ellas y sobre sus funciones metabólicas pueden causar efectos negativos sobre ésta.

Como se mostró en la Figura 10, la exposición a insulina disminuye en más del 60% la expresión transcripcional de *PTGS2*, este efecto se observa desde el menor tiempo de exposición que fue de 4 h. Para tener mayor conocimiento sobre la sensibilidad transcripcional de este gen a la insulina se ha propuesto exponer a las células de la cúmula a la misma concentración de insulina por tiempos menores a 4 h. *PTGS2* es un gen de expresión inducible, se ha descrito que la deficiencia en la producción de este gen en ratones hembra causa anovulación y anormalidades en la implantación embrionaria y en las respuestas de deciduización [85]. McKenzie y colaboradores en el 2004 y Anderson y colaboradores en el 2009 evaluaron la expresión de *PTGS2* en CCs humanas, estos grupos de trabajo encontraron que hay mayor expresión de *PTGS2* en folículos expandidos, en ovocitos que fueron fecundados exitosamente y llegaron a formar embriones [86, 87]. En el 2011 Nuttinck, F. y colaboradores evaluaron el efecto de la inhibición de *PTGS2* sobre el desarrollo del ovocito. Encontraron que la falta de *PTGS2* evita la expansión del COC así como la maduración del ovocito ya que este permanece en el arresto de metafase I y observaron daño sobre la cromatina de los ovocitos [88]. Este fallo en la expansión del folículo, de la maduración del ovocito y considerando que *PTGS2* es un factor proinflamatorio que aumenta su expresión previamente a la ruptura del folículo; alteraciones en su expresión pueden estar relacionadas con la falta de ovulación de las pacientes SOP, así como en la presencia de ovocitos inmaduros y en consecuencia en su baja tasa de embarazo. Los resultados en nuestro modelo *in vitro* indican que podremos utilizarlo en el futuro para evaluar el mecanismo de acción de la insulina sobre *PTSG2*, de tal manera que pudiéramos probar en el futuro que la insulina afecta el estallamiento del folículo maduro precisamente porque abate la expresión de *PTSG2*.

Adicionalmente, con los datos reportados sobre la importancia de la funcionalidad metabólica de las CCs y de la necesidad de una expresión adecuada de *PTGS2* en éstas y habiendo estandarizado la evaluación sobre transcritos en células de pacientes individuales se piensa continuar con el desarrollo de este cultivo para establecer una prueba dual sobre cada muestra de CCs individual de pacientes infértiles que evalúe la captura de glucosa y la afectación de *PTGS2* bajo las mismas condiciones de tratamiento, como una forma de entender y establecer una posible relación entre la hiperinsulinemia específica de una paciente y su falta de ovulación. Considerando además que los hábitos alimenticios y el estilo de vida pueden lograr reducir la glucotoxicidad e hiperinsulinemia, esta puede ser una herramienta poderosa para corregir entre un ciclo fallido (no embarazo) y el siguiente ciclo usando una estrategia diferente basada en el estatus real de la paciente (relación hiperinsulinemia/capacidad de captura de glucosa en respuesta a insulina, grado de afectación sobre *PTGS2*).

Por otro lado, las células murales están catalogadas como células productoras de hormonas esteroideas como estradiol y progesterona, produciendo esta última por sí mismas a partir de colesterol. El cultivo estandarizado por nuestro equipo de trabajo, el cual se trabaja en pool en proporción 1:1 o 2:1 donante/paciente, sufre una diferenciación hacia células murales, claramente detectable a las 24 h de cultivo, a este tiempo la expresión de sus marcadores y una nula expresión de los marcadores de CCs, así mismo ya se puede cuantificar la cantidad de progesterona sintetizada por estas células en el medio de cultivo. No hay afectación sobre la viabilidad de estas células al tenerlas en cultivo hasta 96 h y se ha comprobado que la diferenciación que sufren es uniforme en el cultivo [60, 75].

La primera evaluación que se hizo en este cultivo fue la exposición a diferentes concentraciones de insulina, los resultados presentados en la Figura 11 muestran que la insulina ocasiona una disminución en la cantidad de progesterona en el medio, observando una tendencia similar en la disminución de ésta a las concentraciones de 5, 25 y 50 nM. En cambio, la exposición a una concentración de 100 nM mostró una disminución severa en la producción de progesterona. Tras obtener estos resultados se decidió trabajar con la concentración de 50 nM para el resto de los experimentos ya que

en otros trabajos se ha reportado que la exposición a 100 nM de insulina por 24 h lleva a las células a un estado de IR lo cual no pudimos asegurar que sucedía, o no, en nuestro cultivo por falta de experimentos [89, 90].

Los resultados reportados en este trabajo acerca de la disminución en la producción de progesterona son diferentes a los presentados por Greisen y colaboradores en el 2001, quienes observaron que la exposición de células de la granulosa humana en cultivo, a 200, 400 y 800 $\mu\text{IU/mL}$ (1.4, 2.7, 5.5 nM) de insulina por 48 h aumenta la producción de progesterona, de forma significativa a las dos concentraciones más altas (200 y 400 $\mu\text{IU/mL}$) [91]. Estas diferencias pueden deberse a diferencias en la forma de establecer el cultivo de células de la granulosa; los autores mencionados trabajaron con células del fluido folicular. Probablemente su cultivo es mixto ya que no se especifica si se retiraron las células de la teca que están presentes en el líquido folicular; es de notar que en la cuantificación de la producción de estradiol que presentan se hace sin añadir los precursores de éste, que son androstenediona y testosterona, necesarios para que las GCs produzcan estradiol. Nuestro cultivo fue caracterizado a detalle (Herrera, tesis doctoral) y sabemos que el 98% de las células son murales, no es un cultivo mixto, y si podemos atribuir el resultado está dado por las células murales. Incluso sabemos que la producción de estradiol en nuestras células depende de la presencia del precursor. Es posible que la discrepancia en los resultados emane del hecho de que las células de la teca contribuyan a la producción hormonal y y su respuesta a insulina sea diferente, pensado que en este cultivo se tiene la presencia de dos tipos celulares, las células de la granulosa y de la teca. Posiblemente la presencia de la teca puede estar favoreciendo la producción de progesterona en respuesta a la insulina, además de que la concentración más alta usada por los autores es similar a la más baja usada en el presente trabajo. Ambos casos si permiten confirmar que la insulina actúa como un estimulador esteroideogénico pero que, en concentraciones mayores, como en nuestro trabajo, su efecto puede llegar a ser negativo, emulando el posible daño y alteración metabólica de pacientes con SOP en estado de hiperinsulinemia. Aproximadamente el 75% de las pacientes con SOP obesas son resistentes a la insulina y presentan hiperinsulinemia. Estas alteraciones en la homeostasis de la insulina se han relacionado con anomalías hormonales en estas pacientes [92].

Por otro lado, Hurwitz y colaboradores en 1987 evaluaron el efecto de la insulina sobre la producción de progesterona en células de la granulosa luteinizadas [93]. En este trabajo se expuso a las células a 0.0025, 0.025, 0.25, 25, 250 y 2500 mIU/mL de insulina (0.015, 0.15, 1.5, 150, 1500 y 15000 nM) por 48, 96 y 144 h. Al cuantificar la producción de progesterona se observa que a las 48 se tiene una disminución en esta, a todas las concentraciones sin embargo esta disminución no se hace más profunda conforme aumenta la concentración de insulina, la disminución es la misma en todos los grupos. A las 96 horas se observa un aumento en la producción de progesterona a la concentración mayor, pero en las demás concentraciones la disminución es variable. Fedorcsák y colaboradores en el año 2000 realizaron una evaluación del efecto de la exposición a insulina sobre células de la granulosa de pacientes SOP con resistencia a la insulina [94]. Expusieron las células de la granulosa a 10, 100 y 500 ng/mL (1.72, 17 y 86 nM) de insulina por 24 h, y posteriormente se realizó la cuantificación de progesterona en el medio de cultivo. Se encontró que a la menor concentración no hubo efecto sobre la producción de progesterona, pero se observó una disminución a las concentraciones de 100 y 500 ng/mL, equivalentes a 17 y 86 nM de insulina, concentraciones cercanas a las utilizadas en la cinética de insulina (Figura 11). La disminución más grande en este trabajo se encontró en la concentración de 100 ng/mL.

En estos trabajos se observa un efecto negativo sobre la producción de progesterona debido a la insulina, sin embargo, este efecto no es creciente conforme aumenta la concentración como se presenta en nuestro trabajo. Esto puede deber a que, al igual que en el trabajo de Greisen, se trabaja con células del folículo en donde también se encuentran presentes las células de la teca, y estas podrían estar causando un efecto de amortiguamiento en el daño causado por la insulina a las células de la granulosa [91, 93, 94].

La importancia de cuantificar progesterona en estas células parte del hecho de que se ha observado que niveles bajos de progesterona pueden causar problemas en la maduración, fertilización e implantación embrionaria, así mismo se ha visto que pacientes con SOP tienen problemas para aumentar sus niveles de progesterona incluso después de la estimulación externa con HCG (hormona liberadora de gonadotropinas). Este

resultado se observó de manera *in vitro* e *in vivo*, llevando a pensar que existe algún fallo en las células de la granulosa y que esto puede explicar parte de la anovulación y los abortos espontáneos que ocurren en estas pacientes [95].

Al observar la disminución en la progesterona causada al exponer las células a insulina se planteó como primera idea que la insulina podía estar disminuyendo la transcripción de genes de enzimas que participan en la biosíntesis de progesterona, como lo son SF-1, CYP11A1 y HSD3B1. Como se muestra en la Figura 13 la exposición a 50 nM de insulina no disminuye la cantidad de mensajero de los genes mencionados, al contrario, se observa un aumento de alrededor del 60% para cada gen. Esto puede deberse a un aumento de la transcripción ya que se sabe que la activación del receptor de insulina puede activar vías como PI3K o MAPK y señalar para activar la transcripción de los genes evaluados, regulación de la vida media del mensajero o un aumento en la transcripción dada por la célula al censar la disminución de progesterona.

Además de los genes esteroideogénicos también se evaluó a *GLUT6* un gen propuesto como marcador metabólico de las células. Kim y colaboradores en el año 2014 [63] evaluaron los transportadores de glucosa presentes en células de la granulosa de pacientes SOP con y sin resistencia a la insulina. Ellos encontraron que la expresión de GLUT 1, 3, 5, 8 y 13 fue constitutiva, mientras que la expresión de *GLUT4* y *GLUT6* fue diferencial de acuerdo al estado metabólico de cada paciente. La expresión de *GLUT6* se vio aumentada en aquellas pacientes que presentaban resistencia a la insulina en comparación a aquellas que eran sensibles a la insulina. En los resultados de la Figura 13 se observa que la exposición a 50 nM de insulina no tuvo efecto sobre la expresión de *GLUT6*. Esto puede deberse a que las células a esta concentración y tiempo de exposición aun no llegan a desarrollar un estado de resistencia a la insulina, además de que la técnica usada por Kim y colaboradores para cuantificar los niveles de mensajero fue PCR punto final y nosotros usamos RT-qPCR.

Después de analizar los resultados obtenidos en la determinación de los niveles de los mensajeros de la vía esteroideogénica, se hizo una inmunofluorescencia de la proteína CYP11A1 para su expresión. Como se observa en la Figura 14, la exposición a insulina aumenta la cantidad de proteína de CYP11A1; haciendo una aproximación

cuantitativa de la intensidad de la fluorescencia se registra justo este aumento, aunque no es estadísticamente significativo, indicativo de la importancia de cuantificar a CYP11A1 por inmunodetección en fase sólida o ELISA, que nos de precisión. Es decir, los genes esteroideogénicos, implicados en la producción de progesterona y analizados en este estudio parecen ser estimulados al alza cuando las células murales son expuestas a insulina en clara discordancia con lo que sucede con la producción de progesterona.

Como primer acercamiento para dilucidar el mecanismo molecular por el cual la insulina regula la transcripción de los genes esteroideogénicos y la producción de progesterona, decidimos reproducir la respuesta generada por la activación de PKA en granulosa, ya que se ha propuesto que la insulina actúa de manera sinérgica con la LH para elevar la concentración de cAMP y así activar la transcripción de genes como el receptor de LDL-c a través de la vía PKA [6]. Para ello usamos la Fsk, que se sabe estimula a la adenil ciclasa, aumenta la cantidad de AMPc y activa a PKA, aumentando la síntesis de CYP11A1 y posiblemente, en consecuencia, la producción de progesterona [96-98]. La Figura 15 evidencia el aumento de la progesterona acompañada de un aumento en los niveles de mensajero de *CYP11A1*, corroborando que nuestro cultivo primario responde adecuadamente. Esta aproximación debe ser profundizada, por ejemplo, al hacer co-tratamientos con insulina para saber si el estado de hiperinsulinemia es capaz de modificar esta vía y ésta sea la consecuencia de la disminución de progesterona.

5 Conclusiones

- La respuesta variable en la captura de glucosa y en la expresión de GLUT6, mostrada por las células de la cúmula de pacientes y donantes, podría ser un elemento de evaluación de la capacidad metabólica individual de una paciente PCO.
- La insulina regula negativamente la expresión de PTGS2 en la cúmula humana.
- En las células murales, la exposición a insulina disminuye la cantidad de progesterona extracelular de manera dependiente de la dosis.
- La exposición a 50 nM de insulina por 24 h aumenta los transcritos de SF-1, CYP11A1 y HSD3B1, involucrados en la vía de producción de progesterona.

6 Perspectivas

- 1 Determinar si la capacidad metabólica individual de las células de la cúmula puede evaluarse sistemáticamente al analizar la captura de glucosa y la expresión de GLUT6, en pacientes con síndrome metabólico y SOP.
- 2 Explorar los mecanismos que llevan a la regulación negativa de la expresión de PTGS2 en la cúmula humana y su importancia en el desarrollo de anovulación.
- 3 Determinar en las células murales, los mecanismos que generan que la exposición a insulina disminuya la cantidad de progesterona y analizar su importancia en el contexto de los problemas de infertilidad especialmente en pacientes SOP.
- 4 Evaluar en detalle cuáles son los mecanismos moleculares implicados en la regulación de insulina los transcritos de SF-1, CYP11A1 y HSD3B1 por la exposición a insulina.

7 Referencias

- [1] A. R. Saltiel and C. R. Kahn, "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism," *Nature*, vol. 414, no. 6865, p. 799, 2001.
- [2] C. R. Kahn, "Banting Lecture. Insulin action, diabetogenesis, and the cause of type II diabetes," *Diabetes*, vol. 43, no. 8, pp. 1066-84, Aug 1994.
- [3] B. Cheatham and C. R. Kahn, "Insulin action and the insulin signaling network," *Endocr Rev*, vol. 16, no. 2, pp. 117-42, Apr 1995.
- [4] A. Ullrich and J. Schlessinger, "Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity," *Cell*, vol. 61, no. 2, pp. 203-12, Apr 20 1990.
- [5] M. Sata and R. Nagai, "Phosphatidylinositol 3-kinase: a key regulator of vascular tone?," *Circ Res*, vol. 91, no. 4, pp. 273-5, Aug 23 2002.
- [6] J. Rojas *et al.*, "Polycystic ovary syndrome, insulin resistance, and obesity: navigating the pathophysiologic labyrinth," *Int J Reprod Med*, vol. 2014, p. 719050, 2014.
- [7] E. Diamanti-Kandarakis and A. Dunaif, "Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications," *Endocr Rev*, vol. 33, no. 6, pp. 981-1030, Dec 2012.
- [8] "Insulin Resistance," *Diabetes.co.uk the global diabetes community*, 2019.
- [9] J. Eppig, "Mouse oocytes control metabolic co-operativity between oocytes and cumulus cells," *Reprod Fertil Dev*, vol. 17, no. 1-2, pp. 1-2, 2005.
- [10] A. Dunaif, K. R. Segal, D. R. Shelley, G. Green, A. Dobrjansky, and T. Licholai, "Evidence for distinctive and intrinsic defects in insulin action in polycystic ovary syndrome," *Diabetes*, vol. 41, no. 10, pp. 1257-66, Oct 1992.
- [11] B. Girbés, J. "Métodos para la determinación de la sensibilidad a la insulina basados en la sobrecarga oral de glucosa," *Av Diabetol*, vol. 24, no. 4, pp. 296-304, 2008.
- [12] C. Crofts, A., P., C. Zinn, M. Wheldon, C., and G. Schofield, M., "Hiperinsulinemia (y resistencia a la insulina)," *IntraMed*, pp. 34-43, 2016.
- [13] A. Macías, A. *et al.*, "Introducción al Estudio de la Bioquímica," 2018.
- [14] A. Enfasis, "Señalan que se consume en promedio 765 calorías diarias," *Potencial Sensorial*, 2015.
- [15] R. H. Lustig, L. A. Schmidt, and C. D. Brindis, "Public health: The toxic truth about sugar," *Nature*, vol. 482, no. 7383, pp. 27-9, Feb 1 2012.
- [16] P. Gaona, E., B. *et al.*, "Consumo de grupos de alimentos y factores sociodemográficos en población mexicana," *Salud Pública Mex*, vol. 60, pp. 271-282, 2018.
- [17] M. Flores, H. Melgar, C. Cortés, M. Rivera, J. Rivera, and J. Sepúlveda, "Consumo de energía y nutrientes en mujeres mexicanas en edad reproductiva," *Salud Pública Mex*, vol. 40, pp. 161-171, 1998.
- [18] (2013, mayo 23) Deben mexicanos bajar consumo de carbohidratos para combatir sobrepeso: experto. *La jornada*.
- [19] K. Kupsal *et al.*, "Glucotoxicity and lipotoxicity induced beta-cell apoptosis in type 2 diabetes mellitus," *Int J Anal Bio-Sci* vol. 3, 2015.
- [20] L. Zhu, R. Titone, and D. M. Robertson, "The impact of hyperglycemia on the corneal epithelium: Molecular mechanisms and insight," *Ocul Surf*, Jun 22 2019.
- [21] G. van Niekerk, T. Davis, H. G. Patterson, and A. M. Engelbrecht, "How Does Inflammation-Induced Hyperglycemia Cause Mitochondrial Dysfunction in Immune Cells?," *Bioessays*, vol. 41, no. 5, p. e1800260, May 2019.
- [22] R. K. Perkins, E. R. Miranda, K. Karstoft, P. J. Beisswenger, T. P. J. Solomon, and J. M. Haus, "Experimental Hyperglycemia Alters Circulating Concentrations and Renal Clearance of Oxidative

- and Advanced Glycation End Products in Healthy Obese Humans," *Nutrients*, vol. 11, no. 3, Mar 1 2019.
- [23] B. Wei, M. Wang, W. Hao, and X. He, "Mst1 facilitates hyperglycemia-induced retinal pigmented epithelial cell apoptosis by evoking mitochondrial stress and activating the Smad2 signaling pathway," *Cell Stress Chaperones*, vol. 24, no. 1, pp. 259-272, Jan 2019.
- [24] R. Dankner, A. Chetrit, M. H. Shanik, I. Raz, and J. Roth, "Basal-state hyperinsulinemia in healthy normoglycemic adults is predictive of type 2 diabetes over a 24-year follow-up: a preliminary report," *Diabetes Care*, vol. 32, no. 8, pp. 1464-6, Aug 2009.
- [25] P. L. Huang, "A comprehensive definition for metabolic syndrome," *Dis Model Mech*, vol. 2, no. 5-6, pp. 231-7, May-Jun 2009.
- [26] I. N. d. S. Publica, "El consumo de azúcar en México y la nueva directriz de la OMS para su reducción global," *México: INSP*, 2015.
- [27] O. P. d. Salud, "La Representación en Méico de la OPS/OMS Acompaña Iniciativa para Detener la Epidemia de Obesidad en México. CDMX.," 2013.
- [28] SED, "Diabetes Mellitus y Enfermedad Cardiovascular.," 2007.
- [29] R. Pasquali, "Metabolic Syndrome in Polycystic Ovary Syndrome," *Front Horm Res*, vol. 49, pp. 114-130, 2018.
- [30] P. A. Essah and J. E. Nestler, "The metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome," *J Endocrinol Invest*, vol. 29, no. 3, pp. 270-80, Mar 2006.
- [31] M. O. Goodarzi, M. J. Quinones, R. Azziz, J. I. Rotter, W. A. Hsueh, and H. Yang, "Polycystic ovary syndrome in Mexican-Americans: prevalence and association with the severity of insulin resistance," *Fertil Steril*, vol. 84, no. 3, pp. 766-9, Sep 2005.
- [32] B. L. Hoffman, Schorge, J. o., Schaffer, J. I., Halvorson, L. M., Bradshaw, D. K., Cunningham, F. G., *Williams Ginecología*. Álvaro Obregón, CDMX: McGRAW-HILL, 2008.
- [33] A. J. Bajo, Laila, V. JM., Xercavins, M. J., *Fundamentos de Ginecología*. Madrid, España: SEGO, 2009.
- [34] M. W. Elting, T. J. Korsen, L. T. Rekers-Mombarg, and J. Schoemaker, "Women with polycystic ovary syndrome gain regular menstrual cycles when ageing," *Hum Reprod*, vol. 15, no. 1, pp. 24-8, Jan 2000.
- [35] H. S. Randeve *et al.*, "Cardiometabolic aspects of the polycystic ovary syndrome," *Endocr Rev*, vol. 33, no. 5, pp. 812-41, Oct 2012.
- [36] S. Franks *et al.*, "The genetic basis of polycystic ovary syndrome," *Hum Reprod*, vol. 12, no. 12, pp. 2641-8, Dec 1997.
- [37] H. Rodriguez, "Fenotipos reproductivos del síndrome de ovario poliquístico t sus implicaciones en las técnicas de reproducción asistida con los resultados obstétricos," 2013.
- [38] L. Casadei, F. Fanisio, R. P. Sorge, M. Collamarini, E. Piccolo, and E. Piccione, "The diagnosis of PCOS in young infertile women according to different diagnostic criteria: the role of serum anti-Mullerian hormone," *Arch Gynecol Obstet*, vol. 298, no. 1, pp. 207-215, Jul 2018.
- [39] P. Paredes, J.,C., E. López-Byghen, L. Ibáñez, M. Balladares, L., P. Paredes, C., and V. Ramírez, C., "Comparative treatment between sitagliptin vs. metformin, alone or in combination, in patients with polycystic ovary syndrome. A clinical entity at high risk for developing diabetes mellitus and gestational diabetes: A pilot study," *Hospital General de México*, vol. 81, pp. 15-26, 2017.
- [40] J. E. Nestler, D. J. Jakubowicz, W. S. Evans, and R. Pasquali, "Effects of metformin on spontaneous and clomiphene-induced ovulation in the polycystic ovary syndrome," *N Engl J Med*, vol. 338, no. 26, pp. 1876-80, Jun 25 1998.
- [41] A. Balen and K. Michelmores, "What is polycystic ovary syndrome? Are national views important?," *Hum Reprod*, vol. 17, no. 9, pp. 2219-27, Sep 2002.

- [42] R. A. DeFronzo, "Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM," *Diabetes*, vol. 37, no. 6, pp. 667-87, Jun 1988.
- [43] A. J. Morales, G. A. Laughlin, T. Butzow, H. Maheshwari, G. Baumann, and S. S. Yen, "Insulin, somatotrophic, and luteinizing hormone axes in lean and obese women with polycystic ovary syndrome: common and distinct features," *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 81, no. 8, pp. 2854-64, Aug 1996.
- [44] B. Banaszewska, A. J. Duleba, R. Z. Spaczynski, and L. Pawelczyk, "Lipids in polycystic ovary syndrome: role of hyperinsulinemia and effects of metformin," *Am J Obstet Gynecol*, vol. 194, no. 5, pp. 1266-72, May 2006.
- [45] M. Belani, A. Deo, P. Shah, M. Banker, P. Singal, and S. Gupta, "Differential insulin and steroidogenic signaling in insulin resistant and non-insulin resistant human luteinized granulosa cells-A study in PCOS patients," *J Steroid Biochem Mol Biol*, vol. 178, pp. 283-292, Apr 2018.
- [46] T. P. Ciaraldi, V. Aroda, S. Mudaliar, R. J. Chang, and R. R. Henry, "Polycystic ovary syndrome is associated with tissue-specific differences in insulin resistance," *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 94, no. 1, pp. 157-63, Jan 2009.
- [47] Y. He *et al.*, "Influence of metabolic syndrome on female fertility and in vitro fertilization outcomes in PCOS women," *Am J Obstet Gynecol*, Mar 22 2019.
- [48] R. S. Legro, A. R. Kusanman, W. C. Dodson, and A. Dunaif, "Prevalence and predictors of risk for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in polycystic ovary syndrome: a prospective, controlled study in 254 affected women," *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 84, no. 1, pp. 165-9, Jan 1999.
- [49] D. J. Evans, R. G. Hoffmann, R. K. Kalkhoff, and A. H. Kissebah, "Relationship of androgenic activity to body fat topography, fat cell morphology, and metabolic aberrations in premenopausal women," *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 57, no. 2, pp. 304-10, Aug 1983.
- [50] J. K. Lee *et al.*, "Insulin resistance in the middle-aged women with "Tigerish Back and Bearish Waist"," *Diabetes Res Clin Pract*, vol. 90, no. 3, pp. e85-7, Dec 2010.
- [51] J. C. Lovejoy *et al.*, "Exogenous androgens influence body composition and regional body fat distribution in obese postmenopausal women--a clinical research center study," *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 81, no. 6, pp. 2198-203, Jun 1996.
- [52] L. Regan, E. J. Owen, and H. S. Jacobs, "Hypersecretion of luteinising hormone, infertility, and miscarriage," *Lancet*, vol. 336, no. 8724, pp. 1141-4, Nov 10 1990.
- [53] D. J. Jakubowicz, M. J. Luorno, S. Jakubowicz, K. A. Roberts, J. E. Nestler, and J. E. Nestler, "Effects of metformin on early pregnancy loss in the polycystic ovary syndrome," *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 87, no. 2, pp. 524-9, Feb 2002.
- [54] C. J. Glueck, H. Phillips, D. Cameron, L. Sieve-Smith, P. Wang, and P. Wang, "Continuing metformin throughout pregnancy in women with polycystic ovary syndrome appears to safely reduce first-trimester spontaneous abortion: a pilot study," *Fertil Steril*, vol. 75, no. 1, pp. 46-52, Jan 2001.
- [55] R. Silva, "Síndrome de ovario poliquístico e infertilidad," *Revista Médica Clínica Las Condes*, pp. 336-497, 2010.
- [56] C. B. Coulam, J. F. Annegers, and J. S. Kranz, "Chronic anovulation syndrome and associated neoplasia," *Obstet Gynecol*, vol. 61, no. 4, pp. 403-7, Apr 1983.
- [57] E. Ventura-Arizmendi and M. Hernandez-Valencia, "La esteroidogenesis en el síndrome de ovarios poliquísticos," *Gac Med Mex*, vol. 155, no. 2, pp. 184-190, 2019.
- [58] O. Hannon, R. and J. Flaws, A., "The effects of Phthalates on the Ovary," *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2015.
- [59] M. King, W., "Hormonas Esteroides de la Corteza Adrenal," *The medical biochemistry page*, 2016.

- [60] G. Palafox, A., "Análisis de la expresión de marcadores murales en un cultivo primario de células de la granulosa con función esteroideogénica y el efecto de la exposición a compuestos reprotóxicos sobre la producción de progesterona," *CINVESTAV*, 2018.
- [61] I. Stuart, F., "Fisiología Humana," vol. 12° ed., 2011.
- [62] C. Arnanz, "Implantación: la fase más delicada y misteriosa del embarazo," *NATALBEN*, 2019.
- [63] E. Kim *et al.*, "Correlation between Expression of Glucose Transporters in Granulosa Cells and Oocyte Quality in Women with Polycystic Ovary Syndrome," *Endocrinology and metabolism*, pp. 40-47, 2014.
- [64] S. Lintern-Moore and G. P. Moore, "The initiation of follicle and oocyte growth in the mouse ovary," *Biol Reprod*, vol. 20, no. 4, pp. 773-8, May 1979.
- [65] M. K. Skinner, "Regulation of primordial follicle assembly and development," *Hum Reprod Update*, vol. 11, no. 5, pp. 461-71, Sep-Oct 2005.
- [66] F. Sanchez and J. Smitz, "Molecular control of oogenesis," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1822, no. 12, pp. 1896-912, Dec 2012.
- [67] R. Palermo, "Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis," *Reprod Biomed Online*, vol. 15, no. 3, pp. 326-37, Sep 2007.
- [68] I. Hanukoglu, "Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis," *J Steroid Biochem Mol Biol*, vol. 43, no. 8, pp. 779-804, Dec 1992.
- [69] J. S. Richards, "Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation," *Physiol Rev*, vol. 60, no. 1, pp. 51-89, Jan 1980.
- [70] B. Falck, "Site of production of oestrogen in the ovary of the rat," *Nature*, vol. 184(Suppl 14), p. 1082, Oct 3 1959.
- [71] S. Assou, D. Haouzi, J. De Vos, and S. Hamamah, "Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes," *Molecular Human Reproduction*, vol. 16, pp. 531-538, 2010.
- [72] M. L. Sutton-McDowall, R. B. Gilchrist, and J. G. Thompson, "Cumulus expansion and glucose utilisation by bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone," *Reproduction*, vol. 128, no. 3, pp. 313-9, Sep 2004.
- [73] S. C. Baumgarten, S. M. Convissar, M. A. Fierro, N. J. Winston, B. Scoccia, and C. Stocco, "IGF1R signaling is necessary for FSH-induced activation of AKT and differentiation of human Cumulus granulosa cells," *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 99, no. 8, pp. 2995-3004, Aug 2014.
- [74] K. Pogrmic-Majkic, D. Samardzija Nenadov, S. Fa, B. Stanic, A. Trninic Pjevic, and N. Andric, "BPA activates EGFR and ERK1/2 through PPARgamma to increase expression of steroidogenic acute regulatory protein in human cumulus granulosa cells," *Chemosphere*, vol. 229, pp. 60-67, Aug 2019.
- [75] E. Herrera-Cogco, López-Bayghen, B., Hernandez-Melchor, D., López-Luna, A., Palafox, C., Ramírez-Martínez, L., López-Bello, E., Albores, A., & López-Bayghen, E., "Paraben concentrations found in human body fluids do not exert steroidogenic effects in human granulosa primary cell cultures," *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2019.
- [76] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays," *J Immunol Methods*, vol. 65, no. 1-2, pp. 55-63, Dec 16 1983.
- [77] A. Ocampo, J. Pedraza, G. Ortiz, E. Hernandez-Perez, L. Porchia, and E. Lopez-Bayghen, "Assessment of Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2 and Versican gene expression profile from the cumulus cells: association with better in vitro fertilization outcomes," *J Ovarian Res*, vol. 11, no. 1, p. 84, Sep 21 2018.

- [78] M. Hernández, D., B. López-Byghen, and E. López-Byghen, "Cultivating a Support Network: Granulosa Cells and the Needed Knowledge on their Role in Oocyte Maturation," *Global Journal of Reproductive Medicine*, vol. 1, 2017.
- [79] O. G. Mendez-Flores, L. C. Hernandez-Kelly, E. Suarez-Pozos, M. Najimi, and A. Ortega, "Coupling of glutamate and glucose uptake in cultured Bergmann glial cells," *Neurochem Int*, vol. 98, pp. 72-81, Sep 2016.
- [80] U. Alwahab, A., K. Pantalone, M., and B. Burguera, "A KETOGENIC DIET MAY RESTORE FERTILITY IN WOMEN WITH POLYCYSTIC OVARY SYNDROME: A CASE SERIES," *Case Report*, vol. 4, April 15, 2018 2018.
- [81] B. A. Gower *et al.*, "Favourable metabolic effects of a eucaloric lower-carbohydrate diet in women with PCOS," *Clin Endocrinol (Oxf)*, vol. 79, no. 4, pp. 550-7, Oct 2013.
- [82] Y. Q. Su, K. Sugiura, and J. J. Eppig, "Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism," *Semin Reprod Med*, vol. 27, no. 1, pp. 32-42, Jan 2009.
- [83] C. J. Zhou *et al.*, "The beneficial effects of cumulus cells and oocyte-cumulus cell gap junctions depends on oocyte maturation and fertilization methods in mice," *PeerJ*, vol. 4, p. e1761, 2016.
- [84] L. Ge, H. S. Sui, G. C. Lan, N. Liu, J. Z. Wang, and J. H. Tan, "Coculture with cumulus cells improves maturation of mouse oocytes denuded of the cumulus oophorus: observations of nuclear and cytoplasmic events," *Fertil Steril*, vol. 90, no. 6, pp. 2376-88, Dec 2008.
- [85] B. J. Davis *et al.*, "Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E2 and interleukin-1beta," *Endocrinology*, vol. 140, no. 6, pp. 2685-95, Jun 1999.
- [86] L. J. McKenzie *et al.*, "Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF," *Hum Reprod*, vol. 19, no. 12, pp. 2869-74, Dec 2004.
- [87] R. A. Anderson *et al.*, "Cumulus gene expression as a predictor of human oocyte fertilisation, embryo development and competence to establish a pregnancy," *Reproduction*, vol. 138, no. 4, pp. 629-37, Oct 2009.
- [88] F. Nuttinck *et al.*, "PTGS2-related PGE2 affects oocyte MAPK phosphorylation and meiosis progression in cattle: late effects on early embryonic development," *Biol Reprod*, vol. 84, no. 6, pp. 1248-57, Jun 2011.
- [89] S. Edirs, L. Jiang, X. Xin, and H. A. Aisa, "Anti-diabetic effect and mechanism of Kursi Wufarikun Ziyabit in L6 rat skeletal muscle cells," *J Pharmacol Sci*, vol. 137, no. 2, pp. 212-219, Jun 2018.
- [90] F. Vlavcheski, D. J. Den Hartogh, A. Giacca, and E. Tsiani, "Amelioration of High-Insulin-Induced Skeletal Muscle Cell Insulin Resistance by Resveratrol Is Linked to Activation of AMPK and Restoration of GLUT4 Translocation," *Nutrients*, vol. 12, no. 4, Mar 27 2020.
- [91] S. Greisen, T. Ledet, and P. Ovesen, "Effects of androstenedione, insulin and luteinizing hormone on steroidogenesis in human granulosa luteal cells," *Hum Reprod*, vol. 16, no. 10, pp. 2061-5, Oct 2001.
- [92] K. J. Mather, F. Kwan, and B. Corenblum, "Hyperinsulinemia in polycystic ovary syndrome correlates with increased cardiovascular risk independent of obesity," *Fertil Steril*, vol. 73, no. 1, pp. 150-6, Jan 2000.
- [93] A. Hurwitz *et al.*, "The effect of insulin on progesterone production and cellular growth in long-term cultures of human granulosa lutein cells," *Fertil Steril*, vol. 48, no. 5, pp. 791-5, Nov 1987.
- [94] P. Fedorcsak, R. Storeng, P. O. Dale, T. Tanbo, and T. Abyholm, "Impaired insulin action on granulosa-lutein cells in women with polycystic ovary syndrome and insulin resistance," *Gynecol Endocrinol*, vol. 14, no. 5, pp. 327-36, Oct 2000.
- [95] N. Doldi, A. Gessi, A. Destefani, F. Calzi, and A. Ferrari, "Polycystic ovary syndrome: anomalies in progesterone production," *Hum Reprod*, vol. 13, no. 2, pp. 290-3, Feb 1998.

- [96] E. K. Asem and F. Hertelendy, "Effects of forskolin on progesterone and cyclic adenosine monophosphate production in avian granulosa cells," *Biol Reprod*, vol. 29, no. 5, pp. 1098-104, Dec 1983.
- [97] T. Ranta, M. Knecht, J. M. Darbon, A. J. Baukal, and K. J. Catt, "Induction of granulosa cell differentiation by forskolin: stimulation of adenosine 3',5'-monophosphate production, progesterone synthesis, and luteinizing hormone receptor expression," *Endocrinology*, vol. 114, no. 3, pp. 845-50, Mar 1984.
- [98] S. M. Hsia, W. Chiang, Y. H. Kuo, and P. S. Wang, "Downregulation of progesterone biosynthesis in rat granulosa cells by adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf.) bran extracts," *Int J Impot Res*, vol. 18, no. 3, pp. 264-74, May-Jun 2006.

Anexos

Anexo 1

Este trabajo fue presentado en el 59° congreso de la *Society of Toxicology* (SOT), del 15-19 de marzo del año 2020 en Anaheim California, de manera virtual debido a la pandemia por COVID19.

ABSTRACT NUMBER: 3549 **Poster Board Number:** P365

TITLE: Insulin Effects on Granulosa Cells Steroidogenic Functions

AUTHORS (FIRST INITIAL, LAST NAME) AND INSTITUTIONS: E. López-Bello, A. C. Palafox-Gómez, L. Ramírez-Martínez, and E. López-Bayghen. *Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico.* Sponsor: O. Barbier

KEYWORDS: Metabolism; Cell Culture; Ovary

ABSTRACT: Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS) is associated with metabolic syndrome (MetS)—a multifactorial, systemic imbalance in cell-energy usage that includes hyperinsulinemia and insulin resistance (IR). Recent evidence demonstrates that carbohydrate intake restriction improved hyperinsulinemia, and subsequently, ovarian, hormonal- and metabolic-associated abnormalities in women with PCOS. Granulosa cells (GCs) play an essential role in folliculogenesis and provide physical and environmental support for oocyte development. However, insulin's effect on human granulosa cells (hGCs) has been poorly explored. Using a primary hGC cell culture, differentiated into mural luteinized,

we analyzed the effects of insulin on the steroidogenic functions of hGCs. Progesterone production was reduced when treated for 24 h with 50 nM and 100 nM of insulin (25% and 58%, respectively), and a more pronounced decrease was observed at 48 h (33% and 61%, respectively). When hGCs were treated with 50 nM insulin for 24 h, using RT-qPCR, CYP11A1, SF-1, and HSD3B1 (genes responsible for steroidogenesis) expression increased by 56%, 32% and 36% respectively. Undifferentiated hGCs, kept as cumulus cells, were exposed to insulin to evaluate PTGS2, a gene that participates in the inflammation and follicle rupture. PTGS2 expression decreased by 84% when cumula cell was treated with 50 nM insulin for 6h. In conclusion, exposure to insulin affects hGCs steroidogenic function, in differentiated and undifferentiated cells. The mechanism involved in this effect could affect the quality of the oocytes, which is one of the problems in women with PCOS.

Anexo 2

Parte de este trabajo fue publicado en el artículo:

Elena Herrera-Cogco, Bruno López-Bayghen, Dinorah Hernández-Melchor, Almena López-Luna, Cecilia Palafox-Gómez, Leticia Ramírez-Martínez, Estheisy López-Bello, Arnulfo Albores & Esther López-Bayghen (2020). **Paraben concentrations found in human body fluids do not exert steroidogenic effects in human granulosa primary cell cultures**, *Toxicology Mechanisms and Methods*, 30:5, 336-349, DOI: [10.1080/15376516.2020.1741052](https://doi.org/10.1080/15376516.2020.1741052)