

En esta sección los trabajos presentados deberán reunir las siguientes condiciones:

1. Deberán estar escritos en castellano.
2. Preferentemente en Word.
3. No deberán superar preferentemente las 25 carillas de hoja tamaño A4, escritas en cuerpo de letra 12, a doble espacio.
4. El ordenamiento de los mismos deberá seguir la estructura clásica de:
  - a. Título.
  - b. Autores, centro al que pertenecen y correo electrónico de contacto.
  - c. Resumen en castellano y en inglés (excluyente) de no más de 200 palabras.
  - d. Palabras clave: no más de 5 (cinco).
  - e. Introducción.
  - f. Material y métodos.
  - g. Resultados.
  - h. Discusión.
5. Las abreviaturas deberán ser definidas al ser mencionadas por primera vez,

excepto aquellas aceptadas por convención (por ejemplo, FIV, ICSI, etc).

6. Tablas y cuadros: en blanco y negro, teniendo especial cuidado de ser bien referidos desde el texto.
7. Figuras: todas serán en blanco y negro.
8. Bibliografía: las citas se harán en el texto y se ordenarán en forma correlativa al final del trabajo por orden de aparición. Las citas de revistas deberán consignarse de la siguiente manera:
  - a) apellido completo e iniciales de los 3 primeros autores, sin puntos y separados por comas; si hubiera más, puede colocarse "et al"; b) título del trabajo; c) abreviatura del nombre de la revista (tal como figuran en el Index Medicus); y e) año, volumen, número de la revista (optativo), página inicial y final.

En todos los casos el envío de trabajos, comentarios y publicaciones deberá hacerse por correo electrónico a la dirección de la secretaría de SAMeR: info@samer.org.ar

# Caracterización de los glucotransportadores y la acción pleiotrópica de la metformina en células de la granulosa de pacientes con síndrome de ovario poliquístico

Valeria Basconi,<sup>1</sup> Abril Salinas,<sup>2</sup> Guillermo Marconi,<sup>1</sup> Paulina Kohen,<sup>2</sup> Luigi Devoto,<sup>2</sup> Dante Paz,<sup>3</sup> Carolina Pustovrh<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Ginecología y Fertilidad (IFER), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI), Hospital San Borja Arriarán, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

<sup>3</sup> Laboratorio de Biología del Desarrollo, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE-CONICET-UBA), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Reproducción 2012;27:19-30**

## Resumen

*El síndrome de ovario poliquístico (SOP), actualmente reconocido como la endocrinopatía más común en mujeres en edad reproductiva, fue considerado inicialmente como un trastorno de la reproducción. Sin embargo, en los últimos años el papel de la resistencia a la insulina (IR) ha sido identificado como un contribuyente importante en la patogénesis de este síndrome. Mucho se ha investigado sobre los posibles mecanismos de la IR en músculo esquelético y tejido adiposo de las pacientes SOP. A pesar de ello, existen pocos estudios sobre el efecto de la hiperinsulinemia y la resistencia a insulina en los tejidos reproductivos, particularmente en el ovario. El correcto metabolismo de la glucosa por parte de las células de la granulosa (CG) es un paso importante dado el papel que juegan estas células en el aporte de sustratos energéticos al folículo en maduración. Las proteínas transportadoras de glucosa (GLUTs) son las encargadas*

*de regular el movimiento de este azúcar entre el compartimiento extracelular e intracelular, manteniendo una fuente constante de glucosa disponible para el metabolismo. En este trabajo demostramos que: a) las CG humanas expresan GLUT-1 (transportador que mantiene el aporte basal de glucosa intracelular) y GLUT-4 (transportador modulado por insulina), b) ambos transportadores se encuentran disminuidos en las CG de las pacientes SOP, c) la vía metabólica de las CG de pacientes SOP es IR, d) la alteración de los GLUTs de las pacientes SOP puede ser inducida en las células normales por exceso de andrógenos, de insulina o bien de ambos factores combinado; y e) metformina ejerce su acción pleiotrópica sobre las CG en condiciones hiperandrogénicas y/o hiperinsulinémicas, restableciendo la expresión y función de GLUT-4. Ante lo expuesto destacamos que las CG de las pacientes SOP presentan una clara disfunción en la expresión de los GLUTs que disminuye el aporte energético de las mismas, afectando de manera directa el estado metabólico del folículo en crecimiento. La metformina tiene la capacidad de revertir estas*

**Correspondencia:** María Carolina Pustovrh  
E-mail: carolinapustovrh@yahoo.com.ar

El correcto metabolismo de la glucosa por parte de las células de la granulosa es un paso importante dado el papel que juegan estas células en el aporte de sustratos energéticos al foliculo en maduración;<sup>9</sup> siendo las proteínas transportadoras de glucosa (GLUTs) las encargadas de regular el movimiento de este azúcar entre el compartimiento extracelular e intracelular, manteniendo una fuente constante de glucosa disponible para el metabolismo.<sup>11,12</sup> Hasta el momento se encuentran descritas 12 isoformas de los transportadores, de los cuales GLUT-1, GLUT-3 y GLUT-4 se expresan en células de la granulosa y teca de ovinos, bovinos y murinos.<sup>13,14</sup>

Estos transportadores varían en su grado de afinidad por la glucosa; siendo GLUT-1 responsable del pasaje y almacenamiento basal de la glucosa en todas las células;<sup>15</sup> GLUT-3 un transportador de alta afinidad abundante en aquellos tejidos que presentan un alto requerimiento de glucosa, como son el cerebro, los testículos y la placenta;<sup>16,18</sup> y GLUT-4, el transportador insulino-dependiente más importante, que regula el pasaje rápido de glucosa desde el plasma hacia las células del músculo esquelético, cardíaco, los adipocitos y las células placentarias.<sup>15,19,20</sup>

Estudios realizados en músculo esquelético y tejido adiposo, blancos clásicos de la resistencia a insulina en pacientes SOP y diabéticos tipo 2, han determinado una menor incorporación de glucosa bajo estímulo de insulina, coincidente con una menor expresión de los glucotransportadores, en especial GLUT-4.<sup>21,22</sup>

En los últimos años se ha reconocido que la insulino-resistencia y la hiperinsulinemia son un componente clave del SOP. Esto llevó a la aplicación de terapias con el uso de drogas insulinosensibilizantes, siendo la metformina la más ampliamente estudiada. En particular, la metformina mostró tener efectos directos, tanto *in vitro* como *in vivo*, sobre la expresión de los glucotransportadores en endometrio y adipocitos de pacientes SOP.<sup>23,25</sup>

Tomando en cuenta estos antecedentes, postulamos que en las células de la granulosa de las pacientes SOP:

1. El camino metabólico de la glucosa, mediado por los glucotransportadores, es insulino-resistente.

2. La metformina actúa de manera directa sobre la señalización celular de los glucotransportadores revirtiendo los efectos negativos causados por el exceso de andrógenos e insulina característicos de este síndrome.

## Materiales y métodos

### Pacientes

El grupo de pacientes estuvo conformado por 30 mujeres que ingresaron al programa de fertilización *in vitro* (FIV) del Instituto de Ginecología y Fertilidad (IFER) y del Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI). Las voluntarias fueron sometidas a una evaluación clínica que incluyó: medidas antropométricas, *score* de Ferriman Gallway, presencia de acné, seborrea y acantosis nigricans. Se realizó, además, evaluación ecográfica, determinaciones de testosterona total, SHBG, insulina y glucemia en ayunas en fase folicular temprana en mujeres ovulatorias y en cualquier momento de la consulta en mujeres anovulatorias. El grupo de pacientes SOP fue seleccionado según los criterios de Rotterdam.<sup>26</sup> El grupo control estuvo constituido por mujeres con función ovárica normal, cuya causa de infertilidad correspondía exclusivamente a infertilidad masculina. Todas las mujeres participantes firmaron un consentimiento informado y el protocolo de estudio estuvo de acuerdo a los principios de la Declaración de Helsinki.<sup>27</sup>

### Aislamiento y cultivo de células de la granulosa

Las células de la granulosa (CG) fueron obtenidas mediante aspiración folicular, bajo guía ecográfica durante el procedimiento de FIV. La inducción ovulatoria se realizó administrando a las pacientes lo siguiente: antagonista de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), hormona foliculo estimulante recombinante (FSHr) y gonadotropina menopáusica humana (hMG). La ovulación se desencadenó con gonadotropina coriónica humana (hCG) realizándose la captación ovocitaria 34-36 hs posteriores a su aplicación.

Las pacientes con SOP utilizaron dosis menores de gonadotrofinas para evitar el síndrome de hiperestimulación ovárica.

Las CG fueron aisladas desde el aspirado folicular después de la recolección de los ovocitos. El fluido folicular de la primera aspiración libre

*alteraciones en la expresión y funcionalidad de los GLUTs, indicando que este fármaco puede aportar al estatus nutricional del folículo (CG y ovocito) conduciendo a un incremento en la calidad de la gameta en mujeres con SOP.*

*Palabras claves. Síndrome de ovario poliquístico, células de la granulosa, glucotransportador, metformina.*

### **Glucotransporters expression and metformin action on granulosa cells from women with polycystic ovary syndrome**

#### **Summary**

*Polycystic ovary syndrome (PCOS) is currently recognized as the most common endocrinopathy in women of reproductive age. In recent years, the role of insulin resistance (IR) has been identified as an important contributor to the pathogenesis of this syndrome. However, there are few studies on the effect of hyperinsulinemia and insulin resistance in reproductive tissues, particularly in the ovary. The proper metabolism of glucose in the granulosa cells (GC) is an important step do to the role these cells play in providing energy substrates to follicle maturation. The glucose transporters (GLUTs) are responsible for regulating the movement of the sugar between the extracellular and intracellular compartment, keeping a constant source of glucose available for metabolism. In the present study we show that: A) Human GC expresses GLUT-1 (carrier that maintains the basal intracellular glucose contribution) and GLUT-4 (carrier modulated by insulin). B) Both transporters are decreased in the CG from PCOS patients. C) The metabolic pathway of CG from PCOS patients is IR. D) The alteration of GLUTs of PCOS patients may be induced in normal cells by androgen excess, insulin or both factors combined. E) Metformin exerts its pleiotropic action on CG under hyperandrogenic conditions and/or hyperinsulinemic, restoring expression and function of GLUT-4. In summary: CG from PCOS patients clearly exhibit a dysfunction in the expression of GLUTs decreasing energy intake that could affected the metabolic state of follicle growth. Metformin has the ability to reverse these alterations, indicating that this drug may contribute to the nutritional status of the follicle (GC and oocyte) leading to an increase in the quality of the gamete in PCOS women.*

*Key words. Polycystic ovary syndrome, granulosa cell, glucotransporter, metformin.*

#### **Introducción**

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es uno de los desórdenes endocrino-metabólicos más comunes en la edad reproductiva. El 4-18% de las mujeres que presentan hiperandrogenismo, anovulación crónica e infertilidad están afectadas por SOP. Este síndrome está caracterizado por presentar una variedad de fenotipos clínicos y bioquímicos, como hipersecreción de LH, hiperandrogenismo, producción acíclica de estrógeno, disminución de la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG), y entre 40-70% de los casos están asociados con hiperinsulinemia y resistencia a la insulina.<sup>1,2</sup>

El SOP impacta fuertemente sobre la fertilidad, no sólo afectando la ovulación, sino también por estar asociado a un alto índice de abortos espontáneos. Además, las mujeres con SOP presentan mayor riesgo de sufrir abortos recurrentes.<sup>3</sup> No habiéndose podido, hasta el presente, identificar ninguna causa evidente en la mayoría de los casos estudiados.<sup>3,4</sup>

Alteraciones metabólicas como la hiperinsulinemia, la resistencia a la insulina y la obesidad, son características presentes con alta incidencia en el SOP a las cuales actualmente se les asigna un papel relevante en la patogenia de este trastorno. Se ha demostrado que las pacientes SOP anovulatorias presentan mayor tasa de insulino-resistencia que las mujeres SOP ovulatorias.<sup>5,6</sup> Se destaca que las mujeres obesas con fenotipo bioquímico-ultrasonográfico SOP que han reducido su peso corporal luego de tratamiento dietario presentan menores niveles de insulina basal y/o postcarga de glucosa plasmática, asociándose esta disminución de insulina con el restablecimiento de los ciclos ovulatorios normales.<sup>6</sup> Una de las evidencias más convincentes que vinculan la resistencia a la insulina con las anomalías del ciclo reproductivo está dada por el éxito de la administración de drogas insulino-sensibilizantes en la restitución de la ovulación en mujeres SOP.<sup>7</sup> Estos antecedentes sugieren una importante asociación entre la resistencia a la insulina y la anovulación.

Amplia evidencia da cuenta de la resistencia periférica (tejido muscular y adiposo) a la acción de la insulina en esta patología,<sup>5,8</sup> pero a nivel ovárico la evidencia es paradójica, ya que la esteroidogénesis en células de la granulosa de pacientes SOP persiste sensible, mientras que la utilización de glucosa mediada por insulina estaría desregulada.<sup>9,10</sup>

de células fue centrifugado a 400 gs por 5 min y almacenado a -20°C para la medición de glucosa. Posteriormente, el medio de aspirado folicular fue centrifugado a 400 gs por 5 min. El sobrenadante fue eliminado, se agregó al *pellet* 3 ml de verseno (PBS + EDTA 1mM) y se centrifugó a 400 gs por 5 min. El *pellet* fue extendido en una columna de histopaque y se centrifugó a 400 gs por 30 min para eliminar los glóbulos rojos. Luego se aspiró la interfase entre glóbulos rojos e histopaque, y se colocó en un nuevo tubo de 15 ml al cual se agregó 2 ml medio M199 y centrifugó a 400 gs por 5 min.

El *pellet* fue resuspendido en 2 ml de medio de crecimiento (M199 + 10% de suero fetal bovino, SFB) y se sembró en placa de petri incubándose a 37°C por 20 min para eliminar macrófagos y fibroblastos. Se recolectó el medio desde la placa y se centrifugó a 400 gs por 5 min. El *pellet* fue resuspendido en 1 ml de medio de crecimiento y se evaluó la viabilidad celular mediante el conteo en cámara de Neubauer y tinción con azul de Tripán.

### Grupos experimentales

3-5x10<sup>5</sup> células/pocillos fueron sembradas para los experimentos de incorporación de 2D- glucosa (2-deoxiglucosa tritiada) y para RT-PCR. 1,5-2-5x10<sup>5</sup> células/pocillos fueron sembradas para inmunocitoquímica (ICQ). Las CG se mantuvieron en cultivo en incubadora con control temperatura, humedad y atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Grupo experimental 1: Las células de las pacientes control y SOP fueron cultivadas con M199 + 10% SFB por 4 días con cambio de medio cada 48 hs. Luego fueron preparadas para ICQ y RT-PCR. Para el estudio de incorporación de 2D-glucosa las células fueron cultivadas en medio de privación: M199 + 0.1% BSA (libre de SFB) por 24 hs.

Grupo experimental 2: CG de mujeres control fueron derivadas y separadas en 8 grupos. Basal: sin adición; HA: testosterona 10<sup>-6</sup> M; HI: insulina 10<sup>-6</sup> M; HAH: testosterona + insulina (10<sup>-6</sup> M, respectivamente); metformina: 10<sup>-4</sup> M; HA+MET: testosterona 10<sup>-6</sup> M + metformina 10<sup>-4</sup> M; HI+MET: insulina 10<sup>-6</sup> M + metformina 10<sup>-4</sup> M; HAH+MET: testosterona 10<sup>-6</sup> M + insulina 10<sup>-6</sup> M + metformina 10<sup>-4</sup> M. Luego de 48 hs de estímulo, las células se fijaron para ICQ o se prepararon para el estudio de incorporación de 2D-glucosa.

### RT-PCR

La expresión de los transportadores GLUT-1, GLUT-3 y GLUT-4 en células de la granulosa provenientes de pacientes control y SOP fue realizada a través de RT-PCR.

5x10<sup>5</sup> células/pocillos fueron lisadas con 350 µl de *Buffer* RTL (*Buffer* de tiosianato de guanidina) adicionado con 2-β mercaptoetanol y almacenadas a -80°C para posterior análisis. El RNA total fue obtenido mediante el empleo del *Kit R Neasy Mini* de *Qiagen* (según protocolo del fabricante). Se cuantificó y evaluó la pureza de la muestra por absorbancia a 260 nm. 0,2 µg de RNA fueron utilizados para la transcripción reversa siguiendo el protocolo de IMPROM II *reverse transcription system* de *Promega*.

Las secuencias de los partidores se detallan a continuación:

- GLUT-1: 5'ACT GCT CAA GAA GAC ATG GAC AC 3' / 5' TTT AGG TAA GTA ACA GGA GTA AGG 3'.

- GLUT-3: 5'CAA TGC TCC TGA GAA GAT CAT AA 3' / 5' AAA GCG GTT GAC GAA GAG T 3'.

- GLUT 4, 5' TGC AGT TTG GGT ACA ACA TTG 3' / 5' ATG AGG AAGGAG GAA ATC ATG 3'.

La reacción de PCR se realizó con 23 ciclos, 1 ciclo desnaturalización 94°C x 30 seg, dimerización 60°C 30 seg, extensión 72°C 30 seg.

Como control se utilizó 18 S cuya secuencia de partidores fue: 5' TAA CGA GGA TCC ATT GGA GG -3' / 5' CCC TCT TAA TCA TGG CCT CA- 3'. Con ciclo de incubación 94°C 10 min, 94°C 45 seg, 60°C 60 seg, 63°C 60 seg, 72°C 30 seg, 70°C 10 min, 4°C hasta retiro de muestra. Los productos del PCR fueron luego sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 2% con 1µl/7ml de bromuro de etidio.

### Incorporación de deoxiglucosa tritiada (2D-glucosa)

3x10<sup>5</sup> células/pocillos fueron lavadas 2 veces con KRH (50 mM HEPES, 136 mM NaCl; 4.7 mM KCl; 1.25 Mm MgSO<sub>4</sub>; 1.25 Mm CaCl<sub>2</sub> a pH 7.4) + 0.1% BSA para eliminar los restos de medio de cultivo. A cada pocillo se agregó 500 µl de KRH.

Grupo experimental 1: Las células a las que se denominó basales no recibieron adiciones, mien-

tras que las células de los pocillos tratados fueron adicionadas con insulina a 100 ng/ml.

Grupo experimental 2: Las CG de todos los grupos de tratamiento (basal, HA, HI, HAHl, Met, HA+ Met; HI+ met; HAHl+ Met) fueron adicionadas con insulina a 100 ng/ml para estudiar la captación de 2D-glucosa principalmente medida por GLUT-4.

Para ambos grupos, luego de 10 min de incubación en presencia del estímulo, se agregó 60  $\mu$ l de 2D-glucosa mezcla (30  $\mu$ l de 2D-glucosa tritiada y 30  $\mu$ l de 2D-glucosa) y se incubó por 1 hora a 37°C.

La incorporación de glucosa fue frenada adicionando PBS frío a las placas de cultivo, se lavó con PBS frío 2 veces y se procedió a lisar las células con 350  $\mu$ l de *buffer* de lisis. El lisado celular fue recuperado en tubos *eppendorf* y almacenado a -20°C. Cantidades iguales de lisado celular fueron mezcladas con líquido de centelleo y la actividad específica fue medida en contador de centelleo líquido por duplicado. Además, se realizó una curva temporal de incorporación de glucosa en diferentes tiempos en condiciones basales (0, 15, 30, 45 y 60 min); determinándose que a los 60 min se produce la máxima incorporación de 2D-glucosa. Como control de incorporación de 2D-glucosa mediada por los GLUTs se utilizó citocalasina 10  $\mu$ M (inhibidor específico de GLUTs). La actividad de 2D-glucosa incorporada por el tejido fue medida en contador de centelleo líquido por duplicado y expresada como pmol/10<sup>5</sup> células/min.

#### Medición de glucosa en fluido folicular

El fluido folicular (FF) se centrifugó a 400 g por 5 min, luego se distribuyó en *eppendorf* y almacenó a -20°C para medición de glucosa. La medición de los niveles de glucosa en FF se realizó mediante la técnica de glucosa oxidasa según datos del proveedor (*VALTEK*).

#### Inmunocitoquímica

Luego de finalizado el cultivo las CG fueron lavadas 3 veces con PBS y fijadas con metanol frío 20 min a -20°C.

Al momento de realizarse la ICQ, las células se llevaron a temperatura ambiente. Se lavó con PBS 3 veces y se bloqueó la actividad endógena

de las peroxididasas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% durante 10 min. Posteriormente, luego de 3 lavados con PBS se bloquearon las uniones inespecíficas con 3% de leche descremada libre en grasas en PBS. El anticuerpo primario fue preparado en una dilución 1/100 para GLUT-1 y 1/500 para GLUT-4, y la incubación se realizó durante toda la noche. Luego de sucesivos lavados con PBS se incubó con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, y posterior revelado con 3,3' diaminobencidina (DAB), protocolo modificado de Pustovrh y col, 2005.<sup>28</sup> Se realizó una contratinción con hematoxilina y se montó con medio DPX.

#### Análisis estadístico

Los resultados se presentan como la media  $\pm$  SEM, en cada experimento se indica el número de pacientes utilizados. Los datos fueron analizados empleando los métodos estadísticos *t-test* y análisis de la varianza de una vía (ANOVA), según correspondiera. Se consideró resultado con diferencia estadística significativa cuando los valores presentaron un  $p \leq 0.05$ . Para el análisis estadístico se utilizó el programa *Graphpad prism 5.0*.

#### Resultados

Características clínicas y endocrinológicas de las mujeres SOP y control.

Las características clínicas y endocrinológicas de las mujeres control y de las pacientes SOP se describen en la Tabla 1.

Al comparar los grupos de estudio no se encontraron diferencias significativas entre los parámetros: edad e índice de masa corporal (IMC).

Los resultados de los parámetros de hiperandrogenismo bioquímico mostraron que las pacientes del grupo SOP presentaron mayores niveles de testosterona y SHBG plasmáticos, cuando se compararon con el grupo control ( $p < 0.001$  y  $p < 0.05$ ; respectivamente).

Si bien los niveles de glucosa basal no mostraron diferencias entre los grupos, las concentraciones de insulina basal fueron significativamente mayores en el grupo de pacientes SOP comparado con el control ( $p < 0.05$ ). Por último, el HOMA se encontró disminuido en las pacientes SOP ( $p < 0.05$  Vs control) (Tabla 1).

Tabla 1.

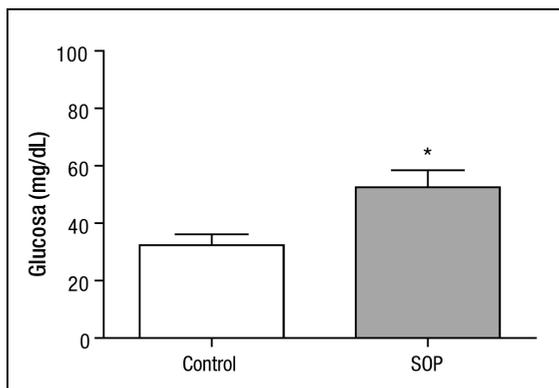
|                          | CONTROL      | SOP          |         |
|--------------------------|--------------|--------------|---------|
| Edad (años)              | 31,6 ± 1,9   | 30,8 ± 1,1   | NS      |
| IMC (kg/m <sup>2</sup> ) | 26,3 ± 0,9   | 28,5 ± 1,1   | NS      |
| Testosterona (ng/l)      | 0,31 ± 0,05  | 0,61 ± 0,06  | P<0,001 |
| Androstenediona (ng/dl)  | 3,22 ± 0,50  | 3,86 ± 0,41  | NS      |
| SHBG (ng/l)              | 54,20 ± 7,20 | 31,00 ± 2,50 | P<0,05  |
| Glucosa basal (mg/dl)    | 79,71 ± 3,59 | 85,86 ± 2,40 | NS      |
| Insulina basal (pmol/l)  | 57,5 ± 9,6   | 104,6 ± 6,1  | P<0,05  |
| HOMA IR                  | 1,50 ± 0,15  | 2,75 ± 0,70  | P<0,05  |
| N                        | 12           | 9            |         |

Índice de masa corporal (IMC): peso/altura<sup>2</sup>. HOMA: modelo de estimación de resistencia a la insulina = (glucosa en ayunas [mmol/l] x insulina en ayunas [μU/ml] / 22.5) x. Los datos se representan como la media ± SEM. Análisis estadístico: *t*-test.

### Concentración de glucosa en el fluido folicular de pacientes SOP y control

Las muestras de fluido folicular de ambos grupos fueron analizadas para determinar los niveles de glucosa. Como se muestra en la Figura 1, los niveles de glucosa se encontraron significativamente elevados en pacientes SOP en comparación al grupo control ( $p<0.05$ ).

Figura 1. Niveles de glucosa en fluido folicular de pacientes SOP y control. Los datos representan la media ± SEM,  $n=8$ . T-test. \* $p<0.05$  Vs control.

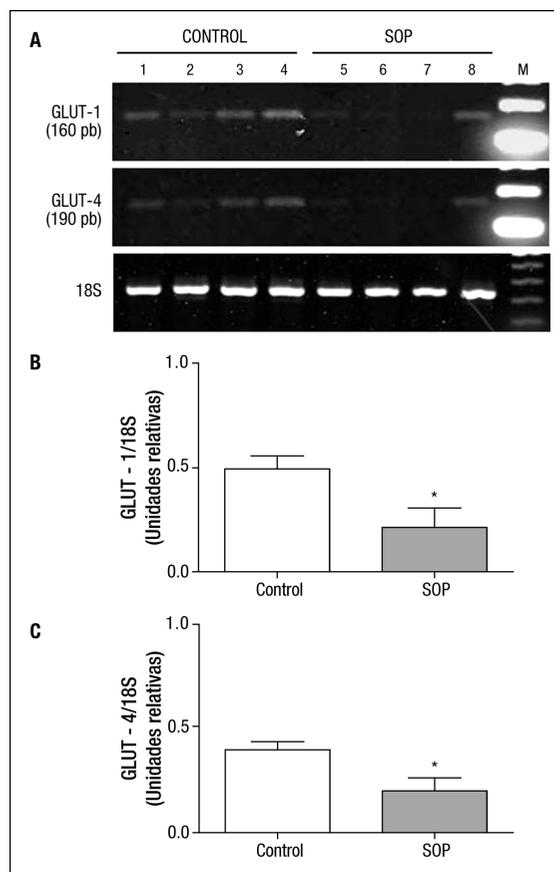


### Expresión de los mensajeros de GLUTs en células de la granulosa de pacientes SOP y control

Siendo las proteínas transportadoras de glucosa (GLUTs) las responsables de regular el intercambio de este azúcar entre el comportamiento extra e intracelular, analizamos la expresión de los mRNA de GLUT en las CG comparando pacientes SOP y controles.

La expresión de los mensajeros de GLUT-1, GLUT-3 y GLUT-4 fue evaluada por medio de RT-PCR. En estas células no se detectó la presencia de GLUT-3. Sí se observó la expresión del transportador constitutivo GLUT-1, como así también del transportador insulino-dependiente GLUT-4. Como se muestra en la Figura 2 A y B, las CG provenientes de pacientes SOP presentan una marcada disminución en la expresión de los mensajeros de GLUT-1 y GLUT-4 en comparación al grupo control ( $p<0.05$ ; respectivamente).

Figura 2. RT-PCR de transportadores GLUT-1 y GLUT-4 en células de la granulosa humana de pacientes control y SOP. A) Fotografía representativa de un gel de análisis semicuantitativo de los GLUTs por RT-PCR. Los productos de RT-PCR fueron resueltos en gel de agarosa al 2% conteniendo 1 μl/ml de bromuro de etidio. Carriles: 1-4 pacientes control, 5-8 pacientes SOP. M: Estándar de peso molecular 100 bp. B) Cuantificación de las bandas del mensajero de GLUT-1. C) Cuantificación de las bandas del mensajero de GLUT-4. Para el análisis de cada transportador se realizaron tres experimentos independientes. Los datos son representados como la media ± SEM,  $n=8$ . T-test. \* $p<0.05$  control Vs SOP.



### Inmunodetección de GLUT-1 y GLUT-4 en células de la granulosa de pacientes SOP y control

Dada la disminución de la expresión de los mRNA de GLUT-1 y GLUT-4, quisimos analizar si se correlacionaban con la expresión de sus respectivas proteínas en las CG.

La inmunomarcación de la proteína del transportador GLUT-1 y GLUT-4 fue coincidente con los análisis de RT-PCR. Las CG de las pacientes SOP presentaron una menor expresión proteica de GLUT-1 y GLUT-4 en comparación con las CG control (Figura 3).

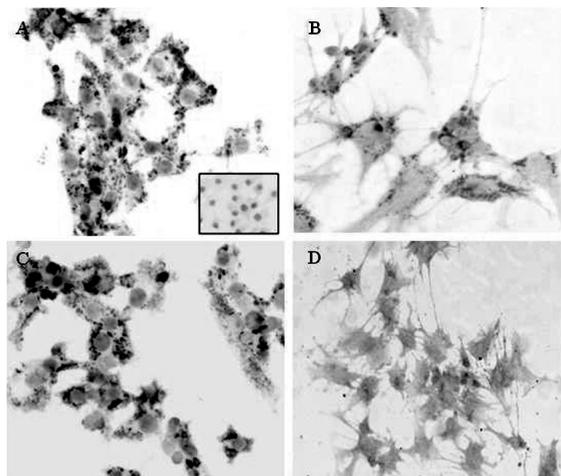
### Figura 3. Inmunocitoquímica de GLUT1 y GLUT4 en células de la granulosa humana de pacientes control y SOP.

Campos representativos de cultivos de CG inmunomarcados para GLUT-1 (A y B).

Campos representativos de cultivos de CG inmunomarcados para GLUT-4 (C y D).

A y C: CG control; B y D: CG pacientes SOP. Inserto en A: control de especificidad, cultivo CG control en donde se ha omitido el anticuerpo primario.

Anticuerpos específicos anti-GLUT-1 y GLUT-4 desarrollados en conejo fueron empleados en una dilución 1:100 y 1:500, respectivamente. La marcación se observa de color marrón-rojizo. Aumento: 20x.



### Incorporación de 2D-glucosa en células de granulosa de pacientes SOP y control

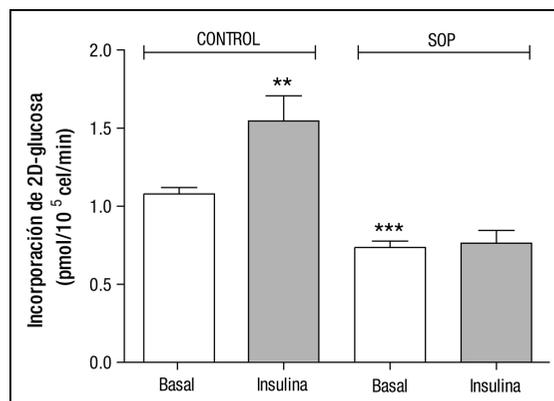
Para reconocer la funcionalidad de los glucotransportadores analizados se evaluó la incorporación de glucosa intracelular por medio de la técnica de 2-Deoxi-Glucosa-3H.

Las CG de las pacientes SOP presentaron una disminución significativa en la incorpora-

ción basal de 2D-glucosa comparadas con las CG control ( $p < 0.001$ ) (Figura 4).

Cuando los cultivos fueron estimulados con insulina 100 ng/ml, señal de translocación de GLUT-4 a la membrana celular, las CG control incrementaron la captación de 2D-glucosa comparado con la condición basal ( $p < 0.01$ ). De manera contraria, las CG de pacientes con SOP no presentaron cambios frente a la señal de insulina (Figura 4).

**Figura 4.** Incorporación de glucosa en células de la granulosa de pacientes SOP y control. Las CG fueron incubadas 1 h con glucosa tritiada con o sin estímulo de insulina 100 ng/ml. Los datos son representados como la media  $\pm$  SEM,  $n=8$ . ANOVA.  $**p < 0.01$  y  $***p < 0.001$  Vs basal control.



### Hiperandrogenismo, hiperinsulinemia y metformina: su efecto sobre GLUT-4

Una de las características principales de las pacientes SOP es el exceso de andrógenos circulantes. Además, alteraciones metabólicas que involucran la hiperinsulinemia han sido relacionadas con las dificultades ovulatorias de las pacientes SOP.<sup>5</sup> Para verificar que estas dos condiciones, hiperandrogenismo e hiperinsulinemia, son responsables de la baja expresión de GLUT-4, hemos analizado, en cultivos de CG de mujeres control, el efecto del exceso de andrógeno y/o insulina sobre la expresión y funcionalidad de este transportador insulino-dependiente.

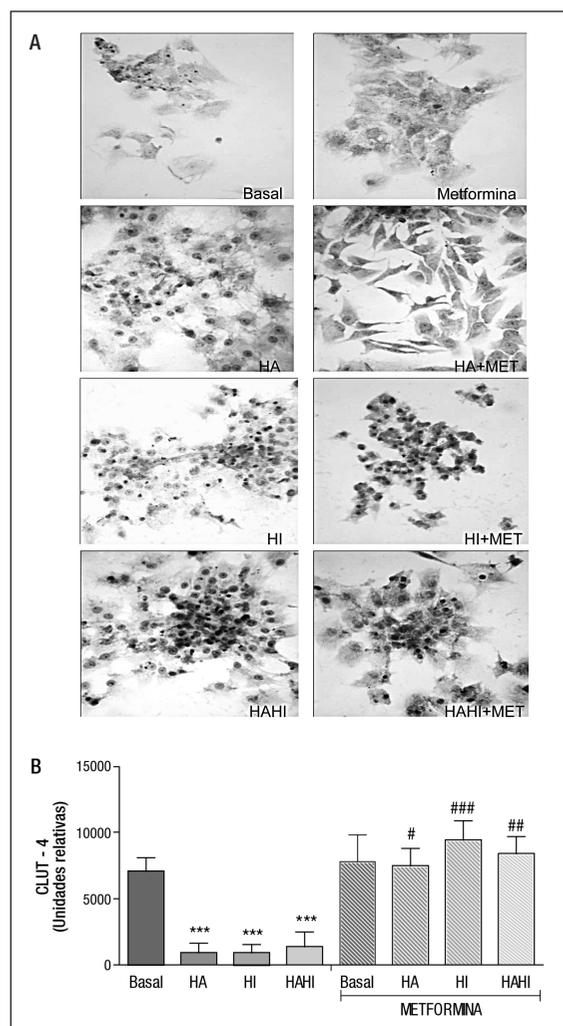
En estos cultivos hemos analizado también el efecto pleiotrópico de la metformina sobre la expresión y funcionalidad de GLUT-4 en CG humanas.

La inmunomarcación de GLUT-4 se encontró fuertemente disminuida cuando las CG fueron incubadas en presencia de testosterona  $10^{-6}$  M, de insulina  $10^{-6}$  M y bajo tratamiento combinado de testosterona e insulina ( $p < 0.001$ ; respectivamente). Esta disminución en la expresión proteica del transportador GLUT-4 no se verificó cuando las células se incubaron de manera conjunta con: testosterona + metformina ( $10^{-4}$  M), insulina + metformina, y el tratamiento combinado con testosterona + insulina + metformina (Figura 5 A y B).

Para determinar si la recuperación del transportador GLUT-4 mediada por metformina se refleja sobre la funcionalidad del mismo se analizó la incorporación de glucosa tritiada en estas células.

Las CG con el tratamiento de exceso de testosterona mostraron una disminución en los niveles de captación de glucosa, aunque no fueron significativas comparadas con el control. Los tratamientos con alta concentración de insulina y la combinación de andrógenos más insulina elevados produjeron una disminución en la captación de 2D-glucosa en las células en estudio ( $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ ) (Figura 6).

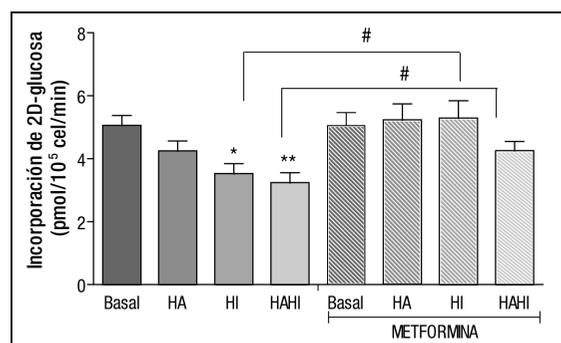
De manera interesante, la adición al cultivo de metformina en conjunto con los tratamientos de hiperandrogenismo, hiperinsulinemia y su combinación, fue capaz de mantener la incorporación de 2D-glucosa en niveles similares a los de las CG sin tratamiento (basal) (Figura 6).



**Figura 5.** Efecto de la testosterona, insulina y metformina sobre la expresión de GLUT-4.

A) Campos representativos de cultivos de CG inmunomarcados (color marrón-rojizo) para GLUT-4. B) Densitometría. Las células fueron separadas en 8 grupos. Basal: sin adición; HA: testosterona  $10^{-6}$  M; HI: insulina  $10^{-6}$  M; HAHI: testosterona + insulina ( $10^{-6}$  M, respectivamente); metformina:  $10^{-4}$  M; HA+MET: testosterona  $10^{-6}$  M + metformina  $10^{-4}$  M; HI+MET: insulina  $10^{-6}$  M + metformina  $10^{-4}$  M; HAHI+MET: testosterona  $10^{-6}$  M + insulina  $10^{-6}$  M + metformina  $10^{-4}$  M. \*\*\* $p < 0.001$  Vs basal; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  y ### $p < 0.001$  Vs sus respectivos tratamientos sin metformina. N=9. Aumento: 20x.

**Figura 6.** Incorporación de glucosa en células de la granulosa hiperandrogenizadas y/o hiperinsulinémicas. Las CG fueron incubadas 48 hs bajo los estímulos: Basal: sin adición; HA: testosterona  $10^{-6}$  M; HI: insulina  $10^{-6}$  M; HAH: testosterona + insulina ( $10^{-6}$  M, respectivamente); metformina:  $10^{-4}$  M; HA+MET: testosterona  $10^{-6}$  M + metformina  $10^{-4}$  M; HI+MET: insulina  $10^{-6}$  M + metformina  $10^{-4}$  M; HAH+MET: testosterona  $10^{-6}$  M + insulina  $10^{-6}$  M + metformina  $10^{-4}$  M. Los datos representan la media  $\pm$  SEM. N=9. \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  Vs basal. # $p < 0.05$  Vs sus respectivos tratamientos sin adición de metformina.



## Discusión

El síndrome de ovario poliquístico, actualmente reconocido como la endocrinopatía más común en mujeres en edad reproductiva, fue considerado inicialmente como un trastorno de la reproducción. Sin embargo, en los últimos 15 años el papel de la resistencia a la insulina (IR) ha sido identificado como un contribuyente importante en su patogénesis.

Mucho se ha investigado sobre los posibles mecanismos de la IR en músculo esquelético y tejido adiposo de las pacientes SOP. A pesar de ello, existen pocos estudios sobre el efecto de la hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina en los tejidos reproductivos, particularmente en el ovario.

La insulina estimula a nivel ovárico la biosíntesis de andrógenos, estrógeno y progesterona, indicando que esta hormona juega un papel en el desarrollo folicular normal.<sup>29</sup> En pacientes con SOP la hiperinsulinemia parece ser el principal factor que contribuye a la hiperandrogenemia. La reducción farmacológica de los niveles de insulina disminuyen en conjunto los niveles de andrógenos restableciendo la ovulación.<sup>30,33</sup> Sin embargo, está reportado que la disminución en los niveles

de andrógenos circulantes no es suficiente para producir una recuperación de la IR o la hiperinsulinemia en mujeres SOP.<sup>33,34</sup>

En este trabajo demostramos que las células de la granulosa humana expresan GLUT-1 y GLUT-4. Además, demostramos que las CG provenientes de pacientes SOP (hiperandrogénicas, hiperinsulinémica e IR) presentan menores niveles de ambos transportadores, expresado tanto a nivel de los mensajeros como de las proteínas.

La disminución de GLUT-1, transportador constitutivo encargado de mantener el aporte basal de glucosa en las células, no fue observada en otros tejidos de mujeres SOP donde los niveles de este transportador se mantuvieron similares a los tejidos controles.<sup>23,35</sup> En este estudio hemos verificado que la captación basal de glucosa, dependiente de este transportador, es menor en las CG de las pacientes SOP, lo cual indica que estas células presentan una clara deficiencia en el aporte energético llevando, sin lugar a dudas, a una disfunción metabólica a nivel folicular.

Hemos podido demostrar también que GLUT-4, el principal transportador insulino-dependiente, muestra una marcada disminución en las CG de mujeres SOP. Nuestros resultados son coincidentes con la expresión del transportador en tejidos clásicos IR, tales como el músculo esquelético y el tejido adiposo donde se ha descrito claramente que las pacientes SOP expresan menores niveles de GLUT-4.<sup>36</sup> El estudio de incorporación de glucosa a las CG de las pacientes SOP bajo el estímulo de insulina, señal clave para que GLUT-4 transloque a la membrana e incremente la captación basal de glucosa en las células, no mostró cambios en comparación con la incorporación basal del azúcar, marcando una clara característica de IR, también descrita para otros tejidos.<sup>21,22</sup>

Esta deficiencia en la vía metabólica de la señal de insulina en CG de pacientes SOP se ve apoyada también por investigaciones previas que muestran una menor producción de lactato e incorporación de glucosa a glicógeno.<sup>9,37</sup> Sumando a estas evidencias, nosotros observamos un incremento en los niveles de glucosa del fluido folicular de las pacientes SOP, aumento asociado con la disminución en la capacidad de incorporación de este monosacárido por las CG en esta patología.

Como mencionamos previamente, la insulina

es capaz de estimular la producción de hormonas en las células ováricas de las pacientes SOP,<sup>38,39</sup> así como también de activar la vía mitogénica.<sup>37</sup> Esta divergencia en la señal de insulina podría explicarse a nivel de la post-activación del receptor dado que en esta patología el número de receptores de insulina, así como su unión y afinidad, no se encontrarían alteradas.<sup>40,41</sup> En particular, estudios en CG de pacientes SOP han mostrado un aumento en los niveles de mRNA total del receptor de insulina.<sup>42</sup> *En base a estas evidencias planteamos que en CG de mujeres SOP existe una disrupción en la señalización de insulina sobre la vía metabólica que culmina con defectos en la expresión y/o funcionalidad de GLUT-4.*

Posteriormente, nos interesó evaluar los efectos de un exceso en los niveles de testosterona, insulina y su combinatoria sobre la expresión y funcionalidad del GLUT-4 en CG humanas. Estos resultados mostraron que el aumento de testosterona produce una marcada disminución en la expresión proteica de GLUT-4 que se acompaña por una disminución moderada de la captación de glucosa en estas células. Resultados similares fueron descritos por Zhang y col, quienes mostraron que el aumento de testosterona *in vitro* induce una marcada reducción de la proteína y del mensajero de GLUT-4 en células endometriales humanas en cultivo.<sup>25</sup> Por otra parte, altos niveles de insulina indujeron una marcada reducción tanto de la proteína GLUT-4 como de la captación de glucosa mediada por este transportador.

La suma de los efectos entre un aumento en la concentración de testosterona e insulina causaron una disminución en los niveles de GLUT-4, afectando profundamente el transporte de glucosa mediado por insulina. Estos resultados nos están demostrando que *la característica de IR puede ser adquirida por CG de mujeres control bajo los estímulos tanto hiperandrogénico como hiperinsulinémico y su combinatoria, siendo más severos los resultados para estas dos últimas condiciones.*

La metformina, agente antidiabético, es una biguanidina ampliamente usada en el manejo de la diabetes tipo 2.<sup>43</sup> En el SOP el uso de la metformina se asocia con la restitución de la ciclicidad menstrual, mejora la ovulación y produce una reducción en los niveles circulantes de andrógenos.<sup>44,45</sup> Su acción clínica principal es inhibir la

producción de glucosa hepática, a pesar de que también disminuye la absorción intestinal de la glucosa y aumenta la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos.<sup>45</sup>

Dados los efectos pleiotrópicos que actualmente se describen para la metformina, fue nuestro interés evaluar si la adición de este fármaco *in vitro* combinado con los tratamientos hiperandrogénico y/o hiperinsulinémico podía afectar la expresión y funcionalidad de GLUT-4. Nuestros resultados demostraron que la adición de metformina en forma conjunta con los tratamientos fue capaz de preservar la expresión proteica de GLUT-4, llevándola a los niveles del control. También pudimos observar que la metformina previno las alteraciones en el transporte de glucosa observada bajo los tratamientos. Parte de estos efectos de metformina fueron descritos en cultivo de células endometriales, donde revirtió la disminución de la expresión de GLUT-4 bajo condiciones hiperandrogénicas.<sup>25</sup> Estudios complementarios en líneas de CG mostraron que la metformina estimula la activación de Akt bajo la señal de insulina, aumentando la translocación de GLUT-4 desde el citosol a la membrana.<sup>46</sup> De estos resultados podemos inferir que *la metformina tiene la capacidad de mejorar de manera directa el estatus metabólico de las CG de pacientes SOP, actuando tanto a nivel de la expresión del transportador como sobre su translocación.*

En conjunto, estos resultados sientan una base interesante para la comprensión de la patología del síndrome del ovario poliquístico, mostrando la existencia de una acción diferencial de la insulina sobre la regulación hormonal y metabólica de las células de la granulosa de las pacientes SOP.

Dado que las CG murales son espejo en muchos aspectos de las características que poseen las células del cúmulo que acompañan, interactúan y nutren de manera directa al ovocito en desarrollo. Estos cambios que afectan el metabolismo de la glucosa en las CG de mujeres SOP podrían comprometer de manera directa la calidad del ovocito y su competencia para el desarrollo de un potencial embrión.

Por otra parte, mujeres SOP tratadas con metformina que realizaron tratamientos de reproducción asistida presentaron un incremento en el número de ovocitos/embriones de buena

calidad y tasa de implantación, así como también una disminución en la tasa de abortos.<sup>47</sup> Un estudio reciente con ovocitos provenientes de pacientes SOP mostró alteraciones en el metabolismo del piruvato, que fueron regularizadas con la administración de metformina.<sup>48</sup> Estos antecedentes en conjunto con nuestros resultados indican que la metformina puede mejorar el estatus nutricional del folículo (CG y ovocito) conduciendo a un incremento en la calidad de la gameta en mujeres con SOP.

**Agradecimientos:** Este trabajo fue financiado por Fogarty RFA-TW-05-002, FONDAF 15010006 y SOCHED 2008-05.

#### Referencias

- Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, Dobrjansky A. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 1989;38(9):1165-1174.
- DeUgarte CM, Bartolucci AA, Azziz R. Prevalence of insulin resistance in the polycystic ovary syndrome using the homeostasis model assessment. *Fertil Steril* 2005;83(5):1454-1460.
- Essah PA, Cheang KI, Nestler JE. The pathophysiology of miscarriage in women with polycystic ovary syndrome. Review and proposed hypothesis of mechanisms involved. *Hormones (Athens)* 2004;3(4):221-227.
- Stirrat GM. Recurrent miscarriage. II: Clinical associations, causes, and management. *Lancet* 1990;336(8717):728-733.
- Teede HJ, Hutchison SK, Zoungas S. The management of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 2007;18(7):273-279.
- Venkatesan AM, Dunaif A, Corbould A. Insulin resistance in polycystic ovary syndrome: progress and paradoxes. *Recent Prog Horm Res* 2001;56:295-308.
- Ma F, Qiao L, Yue H, Xie S, Zhou X, Jiang M, et al. Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance (HOMA-IR), a Key Role for Assessing the Ovulation Function in Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) Patients with Insulin Resistance. *Endocr J* 2008.
- Kashyap SR, Defronzo RA. The insulin resistance syndrome: physiological considerations. *Diab Vasc Dis Res* 2007;4(1):13-19.
- Rice S, Christoforidis N, Gadd C, Nikolaou D, Seyani L, Donaldson A, et al. Impaired insulin-dependent glucose metabolism in granulosa-lutein cells from anovulatory women with polycystic ovaries. *Hum Reprod* 2005;20(2):373-381.
- Fedorcsak P, Storeng R, Dale PO, Tanbo T, Abyholm T. Impaired insulin action on granulosa-lutein cells in women with polycystic ovary syndrome and insulin resistance. *Gynecol Endocrinol* 2000;14(5):327-336.
- Joost HG, Thorens B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol* 2001;18(4):247-256.
- Medina RA, Owen GI. Glucose transporters: expression, regulation and cancer. *Biol Res* 2002;35(1):9-26.
- Williams SA, Blache D, Martin GB, Foot R, Blackberry MA, Scaramuzzi RJ. Effect of nutritional supplementation on quantities of glucose transporters 1 and 4 in sheep granulosa and theca cells. *Reproduction* 2001;122(6):947-956.
- Nishimoto H, Matsutani R, Yamamoto S, Takahashi T, Hayashi KG, Miyamoto A, et al. Gene expression of glucose transporter (GLUT) 1, 3 and 4 in bovine follicle and corpus luteum. *J Endocrinol* 2006;188(1):111-119.
- Mueckler M. Family of glucose-transporter genes. Implications for glucose homeostasis and diabetes. *Diabetes* 1990;39(1):6-11.
- Maher F, Vannucci S, Takeda J, Simpson IA. Expression of mouse-GLUT-3 and human-GLUT-3 glucose transporter proteins in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;182(2):703-711.
- Burant CF, Davidson NO. GLUT-3 glucose transporter isoform in rat testis: localization, effect of diabetes mellitus, and comparison to human testis. *Am J Physiol* 1994;267(6 Pt 2):R1488-1495.
- Hauguel-de Mouzon S, Challier JC, Kacemi A, Cauzac M, Malek A, Girard J. The GLUT-3 glucose transporter isoform is differentially expressed within human placental cell types. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82(8):2689-2694.
- Xing AY, Challier JC, Lepercq J, Cauzac M, Charron MJ, Girard J, et al. Unexpected expression of glucose transporter 4 in villous stromal cells of human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(11):4097-4101.
- Bell GI, Kayano T, Buse JB, Burant CF, Takeda J, Lin D, et al. Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* 1990;13(3):198-208.
- Gaster M, Staehr P, Beck-Nielsen H, Schroder HD, Handberg A. GLUT-4 is reduced in slow muscle fibers of type 2 diabetic patients: is insulin resistance in type 2 diabetes a slow, type 1 fiber disease? *Diabetes* 2001;50(6):1324-1329.
- Rosenbaum D, Haber RS, Dunaif A. Insulin resistance in polycystic ovary syndrome: decreased expression of GLUT-4 glucose transporters in adipocytes. *Am J Physiol* 1993;264(2 Pt 1):E197-202.
- Pustovrh MC, Villarrol C, Arriagada C, Moñoz A, Kohen P, Devoto L. Glucotransporters expression and function in the human endometrium from normal and polycystic ovary syndrome women: Effect of metformin treatment. *Revista de la Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva* 2010;XVII(3).
- Grisouard J, Timper K, Radimerski TM, Frey DM, Peterli R, Kola B, et al. Mechanisms of metformin action on glucose transport and metabolism in human adipocytes. *Biochem Pharmacol* 2010;80(11):1736-1745.
- Zhang L, Liao Q. Effects of testosterone and metformin on glucose metabolism in endometrium. *Fertil Steril* 2010;93(7):2295-2298.

26. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004;81(1):19-25.
27. Declaration of Helsinki. *Law Med Health Care* 1991;19(3-4):264-265.
28. Pustovrh MC, Jawerbaum A, Capobianco E, White V, Lopez-Costa JJ, Gonzalez E. Increased matrix metalloproteinases 2 and 9 in placenta of diabetic rats at midgestation. *Placenta* 2005;26(4):339-348.
29. Mukherjee S, Maitra A. Molecular & genetic factors contributing to insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Indian J Med Res* 2010;131:743-760.
30. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* 1997;18(6):774-800.
31. Legro RS, Gnatuk CL, Kunselman AR, Dunaif A. Changes in glucose tolerance over time in women with polycystic ovary syndrome: a controlled study. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(6):3236-3242.
32. Poretsky L, Cataldo NA, Rosenwaks Z, Giudice LC. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocr Rev* 1999;20(4):535-582.
33. Bremer AA, Miller WL. The serine phosphorylation hypothesis of polycystic ovary syndrome: a unifying mechanism for hyperandrogenemia and insulin resistance. *Fertil Steril* 2008;89(5):1039-1048.
34. Diamanti-Kandarakis E. Polycystic ovarian syndrome: pathophysiology, molecular aspects and clinical implications. *Expert Rev Mol Med* 2008;10:e3.
35. Corbould A, Zhao H, Mirzoeva S, Aird F, Dunaif A. Enhanced mitogenic signaling in skeletal muscle of women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 2006;55(3):751-759.
36. Jensterle M, Janez A, Mlinar B, Marc J, Prezelj J, Pfeifer M. Impact of metformin and rosiglitazone treatment on glucose transporter 4 mRNA expression in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* 2008;158(6):793-801.
37. Wu XK, Zhou SY, Liu JX, Pollanen P, Sallinen K, Mäkinen M, et al. Selective ovary resistance to insulin signaling in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2003;80(4):954-965.
38. Nestler JE, Jakubowicz DJ, de Vargas AF, Brik C, Quintero N, Medina F. Insulin stimulates testosterone biosynthesis by human thecal cells from women with polycystic ovary syndrome by activating its own receptor and using inositolglycan mediators as the signal transduction system. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(6):2001-2005.
39. Willis D, Mason H, Gilling-Smith C, Franks S. Modulation by insulin of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone actions in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81(1):302-309.
40. Dunaif A, Xia J, Book CB, Schenker E, Tang Z. Excessive insulin receptor serine phosphorylation in cultured fibroblasts and in skeletal muscle. A potential mechanism for insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Invest* 1995;96(2):801-810.
41. Ciaraldi TP, el-Roeiy A, Madar Z, Reichart D, Olefsky JM, Yen SS. Cellular mechanisms of insulin resistance in polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75(2):577-583.
42. Phy JL, Conover CA, Abbott DH, Zschunke MA, Walker DL, Session DR, et al. Insulin and messenger ribonucleic acid expression of insulin receptor isoforms in ovarian follicles from nonhirsute ovulatory women and polycystic ovary syndrome patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(7):3561-3566.
43. Krentz AJ, Bailey CJ. Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs* 2005;65(3):385-411.
44. Sam S, Dunaif A. Polycystic ovary syndrome: syndrome XX? *Trends Endocrinol Metab* 2003;14(8):365-370.
45. Badawy A, Elnashar A. Treatment options for polycystic ovary syndrome. *Int J Womens Health* 2011;3:25-35.
46. Rice S, Pellatt LJ, Bryan SJ, Whitehead SA, Mason HD. Action of metformin on the insulin-signaling pathway and on glucose transport in human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(3):E427-435.
47. Qublan HS, Al-Khaderey S, Abu-Salem AN, Al-Zpoon A, Al-Khateeb M, Al-Ibrahim N, et al. Metformin in the treatment of clomiphene citrate-resistant women with polycystic ovary syndrome undergoing in vitro fertilisation treatment: a randomised controlled trial. *J Obstet Gynaecol* 2009;29(7):651-655.
48. Harris SE, Maruthini D, Tang T, Balen AH, Picton HM. Metabolism and karyotype analysis of oocytes from patients with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2010;25(9):2305-2315.