



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Departamento de Medicina y Cirugía, Psicología, Medicina Preventiva y  
Salud Pública e Inmunología Microbiológica Médica

**Efectos del resveratrol en la fisiología ovárica  
y su potencial aplicación en el síndrome de ovario  
poliquístico.**

**Tesis doctoral**

**Doctorando:** Israel Ortega Sánchez

**Directores de tesis:** Juan Antonio García Velasco

Antoni. J. Duleba

**Madrid, 2014**



*El trabajo experimental presentado en esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Ginecología y Obstetricia de la Universidad de California Davis (UCD), bajo la dirección del Doctor Juan Antonio García Velasco y el Doctor Antoni J. Duleba.*

*El autor ha disfrutado de una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador de la Fundación Alfonso Martín Escudero durante los años 2010-2011, según lo acordado en la convocatoria del 2009.*



**FUNDACIÓN  
ALFONSO MARTÍN ESCUDERO**





**D. Juan Antonio García Velasco, Doctor en Medicina, Profesor Titular de Departamento de Medicina y Cirugía, Psicología, Medicina Preventiva y Salud Pública e Inmunología Microbiológica Médica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Rey Juan Carlos de Madrid, y Co-director del Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) en Madrid.**

### **CERTIFICA**

Que **D. Israel Ortega Sánchez**, Licenciado en Medicina por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título **Efectos del resveratrol en la fisiología ovárica y su potencial aplicación en el síndrome de ovario poliquístico.**

Revisado el presente trabajo, expresa su conformidad para la presentación del mismo en el Departamento de Medicina de la Universidad Rey Juan Carlos de Madrid, por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctor en Medicina.

Y para que conste así a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Madrid a 12 de Marzo de 2014

Fdo. Prof. Juan Antonio García Velasco



**D. Antoni J. Duleba, Profesor de la Escuela de Medicina de UC San Diego (EE.UU), Jefe de Departamento de Medicina Reproductiva, sección de Endocrinología Reproductiva e Infertilidad.**

### **CERTIFICA**

Que **D. Israel Ortega Sánchez**, Licenciado en Medicina por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título **Efectos del resveratrol en la fisiología ovárica y su potencial aplicación en el síndrome de ovario poliquístico.**

Revisado el presente trabajo, expresa su conformidad para la presentación del mismo en el Departamento de Medicina de la Universidad Rey Juan Carlos de Madrid, por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctor en Medicina.

Y para que conste así a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Madrid a 12 de Marzo de 2014

Fdo. Prof. Antoni J. Duleba



El presente trabajo ha dado lugar hasta la fecha a las siguientes publicaciones que se recogen en el ANEXO:

## ABSTRACTS

- **Ortega I, Wong DH, Cress AB, Sokalska A, Stanley SD, Duleba AJ.** Effect of resveratrol on proliferation and steroidogenesis of rat ovarian theca-interstitial cells. Abstract ganador del Primer Premio a la mejor comunicación en formato de póster, 67<sup>th</sup> Reunión anual de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva, Orlando, FL, Octubre 15-19, 2011.
- **Ortega I, Wong DH, Cress AB, Villanueva JA, Stanley SD, Duleba AJ.** Effects of resveratrol on rat ovarian granulosa cells. 67<sup>th</sup> Reunión anual de la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva, Orlando, FL, Octubre 15-19, 2011.

## PUBLICACIONES

- **Ortega I, Villanueva JA, Cress AB, Wong DH, Sokalska A, Stanley SD, Duleba AJ.** Resveratrol reduces steroidogenesis in rat ovarian theca-interstitial cells by inhibiting Akt/PKB signaling pathway. *Endocrinology*. 2012 Aug;153(8):4019-29.
- **Ortega I, Wong DH, Villanueva JA, Cress AB, Sokalska A, Stanley SD, Duleba AJ.** Effects of resveratrol on growth and function of rat ovarian granulosa cells. *Fertil Steril*. 2012 Dec;98(6):1563-73.



A mi mejor amiga, Bárbara  
A mi hermano, Daniel  
A mis padres, Francisco y Rosa



En primer lugar, quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a los directores de esta tesis doctoral, Prof. Juan Antonio García Velasco y Prof. Antoni J. Duleba, mis máximos referentes en el trabajo, por su confianza en mí en todo momento y por su empeño para que esta tesis siguiera adelante.

A Juan Antonio García Velasco, por haber despertado mi interés por la investigación y por haber apostado en todo momento por mi formación. Gracias, Juancho, por haber sido mi mentor.

A Antoni J. Duleba, por haberme acogido en su laboratorio durante este tiempo y por haberme brindado todo su apoyo, conocimientos, eterna paciencia con la estadística y comprensión durante todo este camino. Gracias por tener siempre una respuesta a todas mis preguntas.

A Antonio Requena, por haber confiado en mi cuando ni siquiera había terminado la residencia para emprender una de las aventuras más apasionantes de mi vida.

A Jesús, por ser tan buena persona y buen amigo, por su infinita paciencia y ayuda en el laboratorio, y por todos esos buenos momentos que pasamos durante nuestras cirugías a ritmo de merengue y bachata. Muchas gracias a tí y a tu familia por haberme hecho sentir *tan cerca* estando *tan lejos* de casa.

A mis compañeras de laboratorio, Anna, Amanda por vuestros consejos y por haberme ayudado tanto en todo este proyecto. Gracias a vosotras he aprendido a ser mejor persona en muchos sentidos.

A Donna, por haberme enseñado tanto durante estos dos años y por haber sido tan buena amiga y confidente durante nuestras comidas de pasillo. Gracias por haber compartido tan buenos momentos conmigo y por inculcarme valores tan importantes como tu estricto ritual de asepsia.

Al equipo del Dr. Stanley, por su colaboración en la realización de este trabajo y por permitirme realizar los ensayos cromatográficos en su laboratorio.

A las más de 600 ratas que tuvieron que ser sacrificadas para el desarrollo de este trabajo. Aunque el fin no justifica los medios, me consuela pensar que su sacrificio haya podido contribuir a dar un pasito más en el campo de la investigación.

A María Cruz, Cristina Barbero y Alfonso Bermejo por haber colaborado en este trabajo en mis momentos de mayor estrés. Gracias por estar ahí.

A mis amigos de aquí y de allí, a todos, por haber compartido tan buenos ratos y por haberme hecho olvidar tan rápido los malos momentos. Sin vosotros esta experiencia no hubiera tenido ningún sentido.

A Bárbara, porque me faltan las palabras para agradecerte todo lo que has hecho para que este proyecto se hiciera realidad. Gracias por tu ayuda incondicional, por haber compartido conmigo tanto los buenos como los malos momentos y por haber estado al otro lado de la pantalla del ordenador durante nuestras interminables y diarias charlas en *Skype* a horas intempestivas.

A mi familia, porque de algún modo este trabajo lleva parte de vosotros y por haberme apoyado en todo momento a lo largo de todos estos años.

A mis padres, por haberme inculcado el sentido del esfuerzo, constancia y trabajo durante todos estos años y por haberos sacrificado tanto durante toda mi formación. Gracias por haberos volcado conmigo para que siguiera adelante con este proyecto y por haberme dado tanto, sin esperar nada a cambio. A vosotros os lo debo todo.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN .....</b>	<b>I</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>III</b>
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO.....</b>	<b>3</b>
1.1. BASES HISTÓRICAS. DEFINICIÓN.....	3
1.2. PREVALENCIA .....	6
1.3. ETIOLOGÍA .....	7
1.4. FISIOPATOLOGÍA.....	9
1.4.1. Sistema hipotálamo-hipofisario-gonadal (HHG).....	9
1.4.2. Nivel ovárico.....	12
1.4.2.1. Hiperproducción androgénica en SOP .....	12
1.4.2.2. Alteración en la maquinaria enzimática en las células de la teca .....	14
1.4.2.3. Metabolismo androgénico anormal en SOP .....	16
1.4.2.4. Disfunción ovulatoria .....	18
1.4.3. Nivel suprarrenal.....	22
1.4.4. Resistencia insulínica - Hiperinsulinemia.....	22
1.4.4.1. Efecto de la insulina a nivel ovárico.....	25
1.4.4.2. Efecto de la insulina a nivel hepático .....	27
1.4.4.3. Efecto de la insulina a nivel del eje hipotálamo-hipofisario ...	27
1.4.4.4. Efecto de la insulina a nivel suprarrenal.....	28
1.5. CLÍNICA .....	29
1.5.1. Oligo-amenorrea .....	29
1.5.2. Hiperandrogenismo .....	29
1.5.3. Infertilidad.....	29
1.5.4. Alteraciones metabólicas y cardiovasculares.....	30
1.5.5. Problemas psicológicos.....	30
1.5.6. Complicaciones a largo plazo .....	30

1.6. DIAGNÓSTICO .....	31
1.6.1. Historia clínica y exploración .....	31
1.6.2. Determinaciones hormonales .....	33
1.6.3. Ecografía .....	34
1.6.4. Evaluación del grado de resistencia a la insulina .....	35
1.6.5. Diagnóstico del síndrome metabólico .....	36
1.7. TRATAMIENTO .....	36
1.7.1. Tratamiento de las irregularidades menstruales .....	36
1.7.2. Tratamiento médico de los síntomas relacionados con hiperandrogenismo .....	37
1.7.3. Tratamiento de la infertilidad .....	39
1.7.3.1. Modificaciones del estilo de vida .....	39
1.7.3.2. Citrato de Clomifeno .....	40
1.7.3.3. Gonadotropinas .....	41
1.7.3.4. Cirugía ovárica laparoscópica .....	42
1.7.3.5. Fecundación in vitro .....	42
1.7.4. Tratamientos que mejoran la sensibilidad a la insulina .....	43
1.7.5. Otras terapias adyuvantes .....	45
<b>2. RESVERATROL .....</b>	<b>46</b>
2.1. INTRODUCCIÓN .....	46
2.2. NATURALEZA QUÍMICA .....	47
2.3. FARMACOLOGÍA .....	48
2.4. MECANISMO DE ACCIÓN .....	50
2.4.1. Activación de las sirtuinas .....	50
2.4.2. Inhibición de la vía NF-kappaB .....	52
2.4.3. Inhibición de la vía PI3K/AKT .....	52
2.4.4. Inhibición de la ciclooxigenasa .....	53
2.4.5. Acción sobre el metabolismo del óxido nítrico .....	54
2.4.6. Inhibición de la peroxidación de lípidos .....	54
2.4.7. Inhibición de la vía del mevalonato .....	54

---

2.5. FUNCIONES DEL RESVERATROL.....	57
2.5.1. Antienvjecimiento .....	57
2.5.2. Resveratrol y cáncer.....	58
2.5.3. Efecto cardioprotector.....	58
2.5.4. Efecto neuroprotector.....	59
2.5.5. Efecto del resveratrol en el metabolismo de la glucosa .....	60
2.5.6. Efecto del resveratrol en el ovario .....	61
<b>CAPÍTULO II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>63</b>
<b>CAPÍTULO III. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>67</b>
<b>1. ANIMALES Y ALOJAMIENTO .....</b>	<b>69</b>
<b>2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>70</b>
2.1. AISLAMIENTO CELULAR.....	70
2.1.1. Aislamiento de células teca intersticiales.....	70
2.1.2. Aislamiento de células de la granulosa .....	73
2.2. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE LA TINCIÓN CON TRYPAN BLUE .....	73
2.3. RECUENTO CELULAR.....	74
2.4. CULTIVO CELULAR.....	74
2.4.1. Cultivo células teca intersticiales.....	74
2.4.2. Cultivo células de la granulosa .....	75
2.5. MORFOLOGÍA CELULAR.....	77
<b>3. RT-PCR A TIEMPO REAL.....</b>	<b>77</b>
3.1 FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA.....	77
3.2. EXTRACCION DE RNA .....	78
3.3. SÍNTESIS DE DNA COMPLEMENTARIO (cDNA) .....	80
3.4. DETECCIÓN DEL PRODUCTO DE PCR.....	81
3.5. PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE DNA ..	82
3.6. MEDICIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	83
<b>4. DETERMINACION DE HORMONAS ESTEROIDEASPOR LC-MS.....</b>	<b>86</b>
4.1. FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA.....	86

4.2. PREPARACIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ESTEROIDES .....	87
4.3. CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDEAS: LC-MS .....	87
4.4. MEDICIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	88
<b>5. WESTERN BLOT.....</b>	<b>89</b>
5.1. FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA.....	89
5.2. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN Y LISIS PROTEICA.....	89
5.2.1. Células de la teca.....	89
5.2.2. Células de la granulosa .....	90
5.3. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE BRADFORD.....	91
5.4. PROTOCOLO DE ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA PROTEICA .....	92
5.5. MEDICIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	95
<b>6. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR MEDIANTE INCORPORACIÓN DE TIMIDINA TRITIADA.....</b>	<b>96</b>
6.1. FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA.....	96
6.2. PROTOCOLO DE ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR.....	97
6.3. MEDICIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	97
<b>7. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR (MTS).....</b>	<b>98</b>
7.1. FUNDAMENTE DE LA TÉCNICA .....	98
7.2. PROTOCOLO DE ENSAYO DE VIABILIDAD .....	98
7.3. MEDICIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	99
<b>8. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LA CASPASA-3/7 .....</b>	<b>99</b>
8.1. FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA.....	99
8.2. PROTOCOLO DE ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE LA CASPASA-3/7 .....	100
8.3. MEDICIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	101
<b>9. TINCIÓN CON DAPI Y ACTINA F .....</b>	<b>102</b>
9.1. FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA.....	102
9.2. PROTOCOLO DE TINCIÓN CON DAPI Y ACTINA F.....	102
9.3. MEDICIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	102

<b>10. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE HMGCR.....</b>	<b>103</b>
10.1. FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA.....	103
10.2. PROTOCOLO DE ENSAYO DE ACTIVIDAD DE HMGCR.....	103
10.3. MEDICIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	105
<b>11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>105</b>
<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS.....</b>	<b>107</b>
<b>1. SUBESTUDIO I.....</b>	<b>109</b>
1.1. EFECTO DEL RESVERATROL EN LA EXPRESIÓN DE MRNA DE LOS ENZIMAS ESTEROIDOGÉNICOS .....	109
1.2. EFECTO DEL RESVERATROL EN LA PRODUCCIÓN DE HORMONAS ESTEROIDEAS .....	110
1.3. EFECTO DE LOS SUSTRATOS DE ISOPRENILACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE MRNA DE LOS ENZIMAS ESTEROIDOGÉNICOS .....	112
1.4. EFECTO DE LOS SUSTRATOS DE LA ISOPRENILACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE HORMONAS ESTEROIDEAS.....	114
1.5. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LAS SIRTUINAS EN LA EXPRESIÓN DE MRNA DE LOS ENZIMAS ESTEROIDOGÉNICOS .....	116
1.6. EFECTOS DE LOS INHIBIDORES DE LAS SIRTUINAS EN LA PRODUCCIÓN DE HORMONAS ESTEROIDEAS.....	117
1.7. EFECTOS DE LA VÍA AKT/PKB EN LA ESTEROIDOGÉNESIS .....	118
1.8. EFECTO DEL RESVERATROL EN LA FOSFORILACIÓN DE AKT/PKB .....	120
<b>2. SUBESTUDIO II.....</b>	<b>121</b>
2.1 EFECTO DEL RESVERATROL EN LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS DE LA GRANULOSA .....	121
2.2. EFECTO DEL RESVERATROL EN LA VIABILIDAD CELULAR .....	122
2.3. EFECTO DEL RESVERATROL EN LA ACTIVACIÓN DE LAS CASPASAS .....	123
2.4. EFECTO DEL RESVERATROL EN LA MORFOLOGÍA CELULAR ....	124
2.5. EFECTO DEL RESVERATROL EN LA ESTEROIDOGÉNESIS DE LAS CÉLULAS DE LA GRANULOSA .....	126

2.6. EFECTO DE RESVERATROL EN LA EXPRESIÓN GÉNICA Y PROTEICA DE AMH .....	128
2.7. EFECTO DE RESVERATROL EN LA EXPRESIÓN GÉNICA Y PROTEICA DE VEGF. ....	130
2.8. EFECTO DEL RESVERATROL EN LA ACTIVIDAD HMGCR.....	132
<b>CAPÍTULO V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>133</b>
<b>CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>145</b>
<b>CAPÍTULO VII. ANEXOS.....</b>	<b>149</b>
<b>CAPÍTULO VIII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>175</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Imagen ecográfica de ovarios poliquísticos. ....	4
<b>Figura 2.</b> Regulación hormonal eje hipotálamo-hipofisario-gonadal en pacientes con SOP. ....	11
<b>Figura 3.</b> Enzimas implicadas en la esteroidogénesis ovárica y suprarrenal .....	15
<b>Figura 4.</b> Capacidad esteroidogénica de las células de la teca y granulosa en los ovarios poliquísticos .....	17
<b>Figura 5.</b> Diferencias en la foliculogénesis de ovarios normales y poliquísticos de mujeres anovuladoras [SOP (Anov)] .....	19
<b>Figura 6.</b> Funciones de la hormona AMH en la regulación de la foliculogénesis. ....	21
<b>Figura 7.</b> Mecanismos moleculares de la resistencia insulínica en SOP. ....	24
<b>Figura 8.</b> Diferentes mecanismos implicados en la patogénesis del SOP. ....	26
<b>Figura 9.</b> Escala de Ferriman-Gallwey modificada. ....	32
<b>Figura 10.</b> Algoritmo propuesto para el tratamiento de la infertilidad en mujeres con SOP .....	40
<b>Figura 11.</b> Estructura química del resveratrol. ....	48
<b>Figura 12.</b> Efecto de resveratrol sobre la activación de las sirtuinas. ....	51
<b>Figura 13.</b> Vía de señalización de Ras-Raf-Erk1/2. ....	55
<b>Figura 14.</b> Vía del mevalonato. ....	56
<b>Figura 15.</b> Efecto del resveratrol en la morfología de las células teca intersticiales de la rata. ....	62
<b>Figura 16.</b> Alojamiento y tratamiento de animales de estudio. ....	69
<b>Figura 17.</b> Aislamiento del ovario de la rata: procedimiento quirúrgico. ....	71
<b>Figura 18.</b> Secuencia de pasos en el aislamiento de las células teca intersticiales. ....	72
<b>Figura 19.</b> Cultivo primario de células teca intersticiales en distintos tiempos de estudio: 12 h (A), 24 h (B) y 48 h (C). ....	77
<b>Figura 20.</b> Proceso de extracción de RNA. ....	79
<b>Figura 21.</b> Esquema sobre la técnica de <i>SYBR Green</i> . ....	81
<b>Figura 22.</b> Esquema de la curva de amplificación de PCR a tiempo real. ....	85
<b>Figura 23.</b> Imagen del cosechador de células. ....	96
<b>Figura 24.</b> Fundamento del ensayo de la actividad de la caspasa-3/7. ....	100

<b>Figura 25.</b> Reacción de conversión de HMG-CoA en ácido mevalónico.....	103
<b>Figura 26.</b> Ensayo de cromatografía de capa fina.....	105
<b>Figura 27.</b> Efecto de resveratrol (10-50 $\mu$ M) en la morfología celular de las células de la granulosa.....	125

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Efecto de resveratrol(1-10 $\mu$ M) en la expresión de mRNA de <i>Star</i> (A), <i>Cyp11a1</i> (B), <i>Hsd3b1</i> (C) y <i>Cyp17a1</i> (D) en cultivos de células teca intersticiales.....	110
<b>Gráfico 2.</b> Efecto de resveratrol (1-10 $\mu$ M) en la producción de esteroides en cultivos de células teca intersticiales: progesterona (A), androstendiona (B) y androsterona (C). .....	111
<b>Gráfico 3.</b> Efecto de resveratrol (10 $\mu$ M), GGPP (30 $\mu$ M), y FPP (30 $\mu$ M) en la expresión de mRNA de <i>Star</i> (A), <i>Cyp11a1</i> (B), <i>Hsd3b1</i> (C) y <i>Cyp17a1</i> (D) en cultivos de células teca intersticiales.....	113
<b>Gráfico 4.</b> Efecto de resveratrol (10 $\mu$ M), GGPP (30 $\mu$ M) y FPP (30 $\mu$ M) en la producción de esteroides en cultivos de células teca intersticiales: progesterona (A), androstendiona (B) y androsterona (C).....	115
<b>Gráfico 5.</b> Efecto del inhibidor de Akt (1 $\mu$ M) en la producción de esteroides (A) y en la expresión de <i>Cyp17a1</i> mRNA (B) en cultivos de células teca intersticiales.....	119
<b>Gráfico 6.</b> Efecto de resveratrol (10 $\mu$ M) en la fosforilación de Akt/PKB en cultivos de células teca intersticiales.....	120
<b>Gráfico 7.</b> Efecto de resveratrol (10-50 $\mu$ M) en la proliferación de las células de la granulosa.....	121
<b>Gráfico 8.</b> Efecto de resveratrol (10-50 $\mu$ M) en la viabilidad de las células de la granulosa.....	122
<b>Gráfico 9.</b> Efecto de resveratrol (10-50 $\mu$ M) en la actividad de las caspasas efectoras 3 y 7 en las células de la granulosa.....	124
<b>Gráfico 10.</b> Efecto de resveratrol (10-30 $\mu$ M) en la producción de progesterona (A), estradiol (B) y expresión de <i>Cyp19</i> mRNA (C) en las células de la granulosa.....	127
<b>Gráfico 11.</b> Efecto de resveratrol (10-30 $\mu$ M) en la expresión de mRNA de AMH en las células de la granulosa.....	128
<b>Gráfico 12.</b> Efecto de resveratrol (10-30 $\mu$ M) en la expresión proteica de AMH en las células de la granulosa.....	129
<b>Gráfico 13.</b> Efecto de resveratrol (10-30 $\mu$ M) en la expresión de mRNA de VEGF en las células de la granulosa.....	130

**Gráfico 14.** Efecto de resveratrol (10-30  $\mu$ M) en la expresión proteica de VEGF en las células de la granulosa. .... 131

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Criterios diagnósticos del SOP. ....	5
<b>Tabla 2.</b> Secuencias de <i>primers</i> (directo y reverso). ....	83
<b>Tabla 3.</b> Listado de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en Western blot.. ...	94



## RESUMEN

**Israel Ortega Sánchez**

### **Efectos del resveratrol en la fisiología ovárica y su potencial aplicación en el síndrome de ovario poliquístico.**

Facultad de Ciencias de la Salud, Departamento de Medicina y Cirugía, Psicología, Medicina Preventiva y Salud Pública e Inmunología Microbiológica Médica

Área de conocimiento de Ginecología y Obstetricia

Universidad Rey Juan Carlos, Alcorcón, Madrid, España 2014

El síndrome de ovario poliquístico es una de las enfermedades endocrinas más frecuentes, afectando a un 5-10% de las mujeres en edad reproductiva. Los ovarios poliquísticos están aumentados de tamaño y se caracterizan por presentar una hiperplasia hipervascularizada de las células de la teca, con una excesiva producción de andrógenos secundaria a un aumento en la actividad esteroidogénica de estas células. Además, la funcionalidad de las células de la granulosa de los ovarios poliquísticos está alterada, presentando una menor actividad apoptótica, una tasa de proliferación aumentada y una mayor respuesta estrogénica a la estimulación con gonadotropinas.

El resveratrol (3,5,4'-trihidroxistilbeno) es un polifenol natural, presente en uvas, vino tinto, nueces y diversas plantas medicinales, que presenta múltiples propiedades bioquímicas y fisiológicas, tales como agente quimiopreventivo, antiinflamatorio y antioxidante, así como acciones cardio y neuroprotectoras. Esta fitoalexina ejerce efectos antiproliferativos, proapoptóticos, antiangiogénicos y antiesteroidogénicos en diferentes tipos celulares, por lo que podría tener potencial uso clínico en situaciones con hiperplasia altamente vascularizada de las células de la teca, exceso de andrógenos y angiogénesis anormal, tal y como sucede en el síndrome de ovario poliquístico.



## ABREVIATURAS

<b>ACHO</b>	Anticonceptivos hormonales orales
<b>ACTH</b>	Del inglés “ <i>Adrenocorticotropic hormone</i> ”. Hormona adrenocorticotrófica
<b>AMH</b>	Del inglés “ <i>Antimüllerian hormone</i> ”. Hormona antimülleriana
<b>AES</b>	Del inglés “ <i>Androgen Excess Society</i> ”. Sociedad de Exceso de Andrógenos.
<b>ASRM</b>	Del inglés “ <i>American Society for Reproductive Medicine</i> ”. Sociedad Americana de Medicina Reproductiva
<b>A<sub>2</sub></b>	Andrógenos
<b>BSA</b>	Del inglés “ <i>Bovine serum albumin</i> ”. Albúmina sérica bovina
<b>B2M</b>	β <sub>2</sub> -microglobulina
<b>cAMP</b>	Del inglés “ <i>3',5'-cyclic adenosine monophosphate</i> ”. Adenosín monofosfato-3',5' cíclico
<b>CC</b>	Citrato de clomifeno
<b>CCF</b>	Cromatografía de capa fina
<b>cDNA</b>	Del inglés “ <i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> ”. Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>CoA</b>	Coenzima A
<b>COX-1, 2</b>	Ciclooxigenasa-1, 2
<b>CRP</b>	Del inglés “ <i>C reactive protein</i> ”. Proteína C reactiva
<b>CYP11A1</b>	Gen que codifica la enzima P450 <sub>scc</sub>
<b>CYP17A1</b>	Gen que codifica la enzima P450 <sub>c17α</sub>
<b>CYP19</b>	Gen que codifica la enzima aromatasa
<b>DAPI</b>	4',6-diamino-2-fenilindol
<b>DHEA-S</b>	Sulfato de dehidroepiandrosterona
<b>DM</b>	Diabetes Mellitus
<b>DMT2</b>	Diabetes Mellitus tipo 2
<b>DNA</b>	Del inglés “ <i>Deoxyribonucleic acid</i> ”. Ácido desoxirribonucleico
<b>dNTPs</b>	Del inglés “ <i>Deoxynucleotide triphosphates</i> ”. Desoxirribonucleótido trifosfato

<b>dsDNA</b>	Del inglés “Double-stranded deoxyribonucleic acid”. Ácido desoxirribonucleico bicatenario
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>eNOS</b>	Del inglés “ <i>Endothelial nitric oxide synthase</i> ”. Óxido nítrico sintasa endotelial
<b>ER-<math>\alpha</math></b>	Del inglés “ <i>Estrogen receptor-<math>\alpha</math></i> ”. Receptor estrogénico- $\alpha$
<b>ER-<math>\beta</math></b>	Del inglés “ <i>Estrogen receptor-<math>\beta</math></i> ”. Receptor estrogénico- $\beta$
<b>ERK</b>	Del inglés “ <i>Extracellular signal-regulated kinase</i> ”. Quinasa regulada por señal extracelular.
<b>E<sub>2</sub></b>	Estrógenos
<b>FIV</b>	Fecundación <i>in vitro</i>
<b>FPP</b>	Farnesil pirofosfato
<b>FSH</b>	Del inglés “ <i>Follicle-stimulating hormone</i> ”. Hormona folículo estimulante
<b>GGPP</b>	Geranilgeranil pirofosfato
<b>GH</b>	Del inglés “ <i>Growth hormone</i> ”. Hormona de crecimiento
<b>GnRH</b>	Del inglés “ <i>Gonadotropin-releasing hormone</i> ”. Hormona liberadora de gonadotropinas
<b>HbA<sub>1C</sub></b>	Hemoglobina glicosilada
<b>hCG</b>	Del inglés “ <i>Human chorionic gonadotropin</i> ”. Gonadotropina coriónica humana.
<b>HDL</b>	Del inglés “ <i>High-density lipoprotein</i> ”. Lipoproteínas de alta densidad
<b>HHG</b>	Sistema hipotálamo-hipofisario-gonadal
<b>HHS</b>	Sistema hipotálamo-hipofisario-suprarrenal
<b>hMG</b>	Del inglés “ <i>Human menopausal gonadotropin</i> ”. Gonadotropina menopáusica humana
<b>HMG-CoA</b>	3-hidroxi-3-metilglutaril CoA
<b>HMGCR</b>	3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa
<b>HOMA</b>	Del inglés “ <i>Homeostasis Model Assessment</i> ”. Modelo de determinación de la homeostasis.
<b>HPLC</b>	Del inglés “ <i>High Performance Liquid Chromatography</i> ”. Cromatografía líquida de alta eficacia.

<b>HPRT</b>	Hipoxantina guanina fosforribosil transferasa
<b>HSC</b>	Hiperplasia suprarrenal congénita
<b>HSD3B1</b>	Gen que codifica la 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ $\Delta$ -5-4 isomerasa tipo I
<b>HSD3B2</b>	Gen que codifica la 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ $\Delta$ -5-4 isomerasa tipo II
<b>HTA</b>	Hipertensión arterial
<b>IAL</b>	Índice de andrógeno libre
<b>IGF-I</b>	Del inglés “ <i>Insulin-like growth factor-I</i> ”. Factor de crecimiento similar a la insulina tipo I
<b>IGF-II</b>	Del inglés “ <i>Insulin-like growth factor-II</i> ”. Factor de crecimiento similar a la insulina tipo II
<b>IGFBP-I</b>	Del inglés “ <i>Insulin-like growth factor-binding protein I</i> ”. Proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina tipo I
<b>IkappaB</b>	Inhibidor de kappaB
<b>IKK</b>	Del inglés “ <i>IkappaB kinase</i> ”. Quinasa de IkappaB
<b>IL-6</b>	Interleuquina-6
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>Inh Akt</b>	Inhibidor de Akt
<b>iNOS</b>	Del inglés “ <i>Inducible nitric oxide synthase</i> ”. Óxido nítrico sintasa inducible
<b>IRS 1-2</b>	Del inglés “ <i>Insulin receptor substrate 1-2</i> ”. Sustrato del receptor de insulina tipos 1 y 2
<b>LC-MS</b>	Del inglés “ <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i> ”. Cromatografía Líquida - Espectrometría de Masa
<b>LDL</b>	Del inglés “ <i>Low-density lipoprotein</i> ”. Lipoproteína de baja densidad
<b>LH</b>	Del inglés “ <i>Luteinizing hormone</i> ”. Hormona luteinizante
<b>MIS</b>	Del inglés “ <i>Müllerian inhibiting substance</i> ”. Sustancia inhibidora mülleriana
<b>MIV</b>	Maduración <i>in vitro</i>
<b>mRNA</b>	Del inglés “ <i>Ribonucleic acid messenger</i> ”. Ácido ribonucleico mensajero

<b>MS</b>	Del inglés “ <i>Mass Spectrometry</i> ”. Espectrometría de Masa
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido de hidrógeno
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>NF-1C</b>	Del inglés “ <i>Nuclear factor-1C</i> ”. Factor nuclear-1C
<b>NF-kappaB</b>	Del inglés “ <i>Nuclear factor kappaB</i> ”. Factor de transcripción nuclear-kappaB
<b>NICHD</b>	Del inglés “ <i>National Institute of Child Health and Human Development</i> ”. Instituto Nacional de Salud Infantil y Desarrollo Humano.
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PC-1</b>	Del inglés “ <i>Plasma cell membrane glycoprotein</i> ”. Factor de diferenciación de célula plásmatica
<b>PCR</b>	Del inglés “ <i>Polymerase chain reaction</i> ”. Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PGs</b>	Prostaglandinas
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	Del inglés “ <i>Peroxisome proliferator-activated receptor- gamma coactivator -1<math>\alpha</math></i> ”. Coactivador-1 $\alpha$ del peroxisoma proliferador-activado de receptor gamma
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaciclina
<b>PI3K</b>	Del inglés “ <i>Phosphoinositide 3-kinase</i> ”. Fosfatidilinositol-3-quinasa
<b>PKA</b>	Del inglés “ <i>Protein kinase A</i> ”. Proteína quinasa A
<b>PKC</b>	Del inglés “ <i>Protein kinase C</i> ”. Proteína quinasa C
<b>POR</b>	P450 oxidorreductasa
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Del inglés “ <i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i> ”. Peroxisoma proliferador-activado de receptor gamma
<b>PRL</b>	Prolactina
<b>P450c17<math>\alpha</math></b>	Enzima 17 $\alpha$ -hidroxilasa/17,20 desmolasa
<b>P450scc</b>	Del inglés “ <i>Cholesterol side-chain cleavage enzyme</i> ”. Enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol
<b>QUICKI</b>	Del inglés “ <i>Quantitative Insulin-Sensitivity Check Index</i> ”. Índice de sensibilidad cuantitativa a la insulina.

---

<b>RI</b>	Resistencia insulínica
<b>Res</b>	Resveratrol
<b>RT-PCR</b>	Del inglés “ <i>Real time polymerase chain reaction</i> ”. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.
<b>SERM</b>	Del inglés “ <i>Selective estrogen-receptor modulator</i> ”. Modulador selectivo de los receptores de estrógenos
<b>SHBG</b>	Del inglés “ <i>Sex hormone-binding globulin</i> ”. Proteína transportadora de esteroides sexuales
<b>SHO</b>	Síndrome de hiperestimulación ovárica
<b>SIRT</b>	Del inglés “ <i>Silencing Information Regulator</i> ”. Reguladores de la información de silenciamiento en mamíferos
<b>Sir2</b>	Del inglés “ <i>Silencing Information Regulator</i> ”. Reguladores de la información de silenciamiento en levaduras
<b>SOP</b>	Síndrome del ovario poliquístico
<b>SRM</b>	Del inglés “ <i>Selected reaction monitoring</i> ”. Monitoreo de la reacción seleccionada
<b>StAR</b>	Del inglés “ <i>Steroidogenic acute regulatory protein</i> ”. Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda
<b>TFC</b>	Del inglés “ <i>Turbulent Flow Chromatography</i> ”. Cromatografía de flujo turbulento
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Del inglés “ <i>Transforming growth factor-<math>\beta</math></i> ”. Factor de crecimiento transformante- $\beta$
<b>TI</b>	Teca intersticial
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Del inglés “ <i>Tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i> ”. Factor de necrosis tumoral- $\alpha$
<b>TTOG</b>	Test de tolerancia oral de glucosa
<b>TxA<sub>2</sub></b>	Tromboxano A <sub>2</sub>
<b>VEGF</b>	Del inglés “ <i>Vascular endothelial growth factor</i> ”. Factor de crecimiento del endotelio vascular
<b>3<math>\beta</math>-HSD</b>	Del inglés “ <i>3<math>\beta</math>-hydroxysteroid dehydrogenase</i> ”. Enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa



**CAPÍTULO I.**  
**INTRODUCCIÓN**



## 1. SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO

### 1.1. BASES HISTÓRICAS. DEFINICIÓN.

En 1935, *Irving Stein y Michael Leventhal* publicaron el clásico trabajo “*Amenorrea asociada a ovarios poliquísticos bilaterales*”, en el que se describe un complejo síndrome caracterizado por oligomenorrea, esterilidad, obesidad e hirsutismo, asociado a la presencia de ovarios con cambios morfológicos específicos: aumento de tamaño, engrosamiento de la túnica albugínea y múltiples microquistes situados periféricamente en la zona subcortical (1). En 1949, en una reunión informal se utiliza por primera el término síndrome de Stein y Leventhal, nombre con el que se le conoce aún en nuestros días.

Durante treinta años estos criterios diagnósticos permanecen inalterables hasta que en 1965, *Smith y col.* pusieron de manifiesto en un estudio de 301 casos que los límites de esta entidad no eran tan precisos, ya que hasta en un 40% de los casos el tamaño de los ovarios era normal y el 46% no presentaba engrosamiento de la túnica albugínea (2). En la década de los 70, *Rebar y col.* describen alteraciones en el eje hipotálamo-hipofisario en estas pacientes, lo que focalizó el diagnóstico de esta entidad en los criterios endocrinológicos, tales como la presencia de niveles elevados de hormona luteinizante (LH) junto a niveles bajos o normales de la hormona folículoestimulante (FSH) (3). En 1980, *Burghen y col.* describieron por primera vez la relación existente entre las complicaciones a largo plazo y la resistencia insulínica (RI) presente en muchas pacientes con síndrome de ovario poliquístico (SOP) (4).

El siguiente gran hito en la definición del síndrome tuvo lugar con el uso del ultrasonido para la descripción de ovarios poliquísticos. Entre los primeros investigadores se encontraban *Swanson y col.*, que en 1981 describieron ovarios aumentados de tamaño con folículos de entre 2 y 6 mm de diámetro, aunque no describieron el número de folículos ni las características del estroma (5). En 1985, *Adams y col.* definieron los ovarios poliquísticos como aquellos con 10 o más folículos de 2 a 8 mm de diámetro

observados en un solo plano, dispuestos periféricamente alrededor de un centro de estroma denso (en collar de perlas) o dispersos por el estroma, aumentado en cantidad (Fig. 1) (6). Estos criterios han jugado un papel muy importante en la definición del SOP, ya que han sido utilizados en estudios de screening ecográfico para detectar ovarios poliquísticos durante más de veinte años.

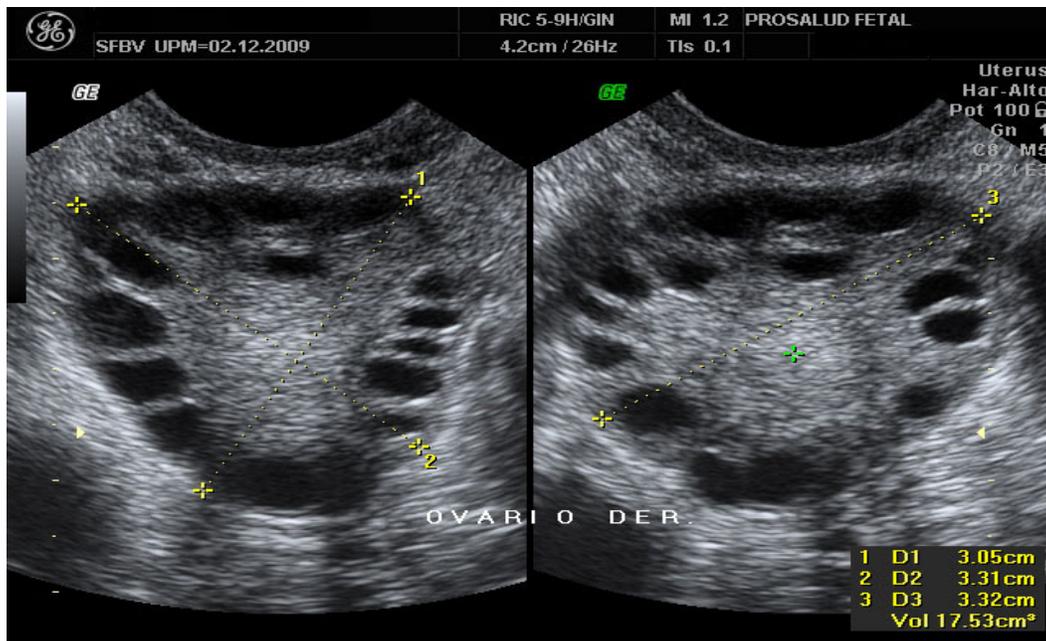


Figura 1. Imagen ecográfica de ovarios poliquísticos.

La gran cantidad de información existente requería un consenso tanto para la definición como para los criterios diagnósticos del SOP. De este modo, en 1990, en una reunión de expertos llevada a cabo en el *National Institute of Health and Human Development* (NICHD) en Bethesda (E.E.U.U), se definió al síndrome como la presencia de hiperandrogenismo clínico (hirsutismo, acné y alopecia con patrón androgénico) y/o bioquímico asociado a disfunción menstrual (oligo/anovulación) y la exclusión de otras alteraciones hormonales, como la hiperprolactinemia, la hiperplasia suprarrenal congénita no clásica, síndrome de Cushing y los tumores productores de andrógenos (7). Esta definición no contemplaba en ningún momento los criterios ecográficos de los ovarios de estas pacientes, aspecto que autores europeos como *Balen* han remarcado como de gran interés (8).

Aunque controvertidos, estos criterios sentaron las bases para la estandarización del diagnóstico del SOP. Durante la década de los noventa se publicaron numerosos trabajos basados en dichos criterios, al mismo tiempo que se hacía necesario un nuevo consenso que incluyera los criterios ecográficos en la definición del síndrome. De este modo, en mayo de 2003, en una reunión de expertos que tiene lugar en Rotterdam, se establecen unos nuevos criterios diagnósticos del SOP: presencia de oligo y/o anovulación, signos clínicos y/o bioquímicos de hiperandrogenismo y ovarios de apariencia ecográfica poliquística (se exige la presencia de alguno de estos dos criterios: presencia de 12 o más folículos de 2 a 9 mm de diámetro y volumen ovárico superior a 10 cm<sup>3</sup>). Se estableció que la presencia de dos de los tres criterios establecidos sería suficiente para el diagnóstico de SOP (9). De esta manera se añadieron dos nuevos fenotipos del síndrome: 1) ovarios poliquísticos con exceso de andrógenos y ausencia de disfunción ovulatoria; y 2) ovarios poliquísticos con disfunción ovulatoria y ausencia de exceso de andrógenos (**Tabla 1**).

<b>Criterios del NICHD</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Oligoovulación</li> <li>2. Hiperandrogenismo clínico y/o bioquímico</li> </ol>
<b>Criterios de Rotterdam</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Oligo y/o anovulación</li> <li>2. Hiperandrogenismo clínico y/o bioquímico</li> <li>3. Ovarios poliquísticos</li> </ol>
<b>Criterios de la AES</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Hiperandrogenismo: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hirsutismo y/o hiperandrogenemia</li> </ul> </li> <li>2. Anomalía ovárica: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Oligo-anovulación y/u ovarios poliquísticos</li> </ul> </li> </ol>
Exclusión de otras patologías como la hiperprolactinemia, hiperplasia suprarrenal congénita y tumores secretores de andrógenos	

**Tabla 1.** Criterios diagnósticos del SOP. Según los criterios del NICHD y AES, los puntos 1 y 2 deben estar presentes para el diagnóstico de SOP. Los criterios de Rotterdam requieren la presencia de 2 de los 3 puntos individuales. En todos los criterios es preciso descartar etiologías secundarias.

A finales del año 2006, la *Androgen Excess Society* (AES) definió unos nuevos criterios para el diagnóstico de SOP: presencia de hiperandrogenismo, definido por la presencia de hirsutismo y/o hiperandrogenemia, junto con disfunción ovulatoria, definida por la existencia de oligoovulación y/u ovarios poliquísticos, y la exclusión de patologías secundarias (10).

### 1.2. PREVALENCIA

A pesar de que el SOP es considerado el trastorno endocrino más frecuente en mujeres en edad reproductiva (10, 11), la estimación de su prevalencia es muy variable según los distintos estudios publicados, encontrándose entre un 2.2% y un 26% (12-16). Esta gran variabilidad se debe a la presencia de distintos factores. En primer lugar, la utilización de los distintos criterios diagnósticos comentados previamente en la identificación del síndrome induce diferencias notables en estudios de prevalencia. Así pues, distintos estudios han demostrado cómo la utilización de los criterios de Rotterdam casi duplica la prevalencia observada con los criterios de la NICHD (17, 18), debido a la inclusión de dos nuevos grupos fenotípicos, determinados por la presencia de ovarios poliquísticos e hiperandrogenismo en mujeres con ciclos menstruales normales y ovarios poliquísticos junto a anovulación en ausencia de exceso de andrógenos.

A esto se une la gran diversidad étnica a la hora de valorar las distintas manifestaciones clínicas de las pacientes con SOP (19). Previamente se ha demostrado como la prevalencia del síndrome basado en criterios de NICHD es alrededor del 5-10% en países occidentales (12-15), mientras que *Chen y col.* demostraron que la prevalencia de SOP en mujeres asiáticas es del 2.2% (20). Estas diferencias pueden ser explicadas debido al bajo índice de hirsutismo observado en este grupo étnico, probablemente debido a una actividad de la  $5\alpha$ -reductasa disminuida en el folículo piloso (21). De modo similar, *Dunaif y col.* demostraron que la prevalencia de SOP entre las mujeres hispano-caribeñas era mayor comparada con las mujeres afroamericanas (22), posiblemente influenciado por las mayores tasas de hirsutismo de las mujeres hispanas con respecto a las no hispanas (23). Sin embargo, los estudios publicados no parecen demostrar

diferencias en el grado de hirsutismo o prevalencia del síndrome entre mujeres de raza blanca y negra (13, 14). Todo ello indica que se trata de un grupo heterogéneo de pacientes, cuyas características clínicas y metabólicas se van a ver fuertemente influidas por el grupo étnico al que pertenecen.

### 1.3. ETIOLOGÍA

A pesar de que las causas del SOP son todavía desconocidas, parece que el desarrollo del síndrome viene condicionado por la interacción entre la predisposición genética y la exposición a distintos factores ambientales, tanto intra como extrauterinos, en este grupo de mujeres.

#### I. Predisposición genética

La teoría de susceptibilidad genética como causa de SOP se apoya en distintos estudios basados en agregación familiar, estudios de concordancia entre gemelos y asociación con otras enfermedades mendelianas. A pesar de la dificultad para llevar a cabo un análisis de segregación formal debido a la heterogeneidad del diseño de los estudios, diferentes criterios diagnósticos utilizados y la dificultad para obtener información fenotípica, la mayoría de los estudios publicados hasta el momento apuntan a la presencia de un patrón de herencia autosómica dominante como modo de herencia familiar ligado al síndrome (24-27). Además de existir una mayor prevalencia de hiperandrogenismo, ovarios poliquísticos y, en menor grado, oligoamenorrea en parientes de primer grado de pacientes con SOP (28, 29), existen estudios que demuestran una mayor prevalencia de RI y síndrome metabólico en parientes de primer grado de ambos sexos de mujeres afectas, sugiriendo el carácter hereditario no sexo-específico de los principales rasgos asociados al síndrome (30, 31).

Además, estudios llevados a cabo en gemelos han revelado una mayor prevalencia y penetrancia de los principales rasgos de SOP en gemelas monocigóticas que en dicigóticas. *Vink y col.* demostraron que la semejanza de rasgos del síndrome en gemelas

monocigóticas era dos veces superior a la observada en gemelas dicigóticas (32), mientras que *Jahanfar y col.* observaron una similitud en el perfil metabólico y hormonal y una gran discordancia en la presencia ecográfica de ovarios poliquísticos entre gemelas, siendo esta diferencia mayor en gemelas dicigóticas (29).

### II. Factores ambientales

El incremento de SOP en poblaciones con un *pool* genético relativamente constante confirma la hipótesis de que existen factores ambientales capaces de desencadenar el síndrome en individuos genéticamente susceptibles. Estudios previos en animales han demostrado como la exposición intraútero de fetos hembra a un exceso de andrógenos actúa como factor de reprogramación, desencadenando el desarrollo de características fenotípicas del SOP en la vida adulta (33, 34). En humanos, la prevalencia de SOP es dos veces mayor en mujeres con bajo peso para la edad gestacional al nacimiento comparado con aquellas con peso normal al nacer (35). Según la línea presentada en este trabajo, la presencia de distintos factores estresantes durante el desarrollo fetal puede dar lugar a un crecimiento intrauterino retardado y, subsiguientemente, recién nacidas pequeñas para su edad gestacional. En la adolescencia, estas niñas tenderían a presentar distribución grasa de distribución centripeta, alteraciones del metabolismo hidrocarbonado y síntomas asociados a SOP (36-38), mientras que ya en la vida adulta presentarían riesgo elevado de desarrollar síndrome metabólico, hipertensión (HTA) y diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) (39, 40). Esta predisposición individual programada desde la etapa fetal a desarrollar SOP podría desencadenarse por la presencia de factores externos tales como la adquisición de una vida sedentaria y trastornos en la dieta basados en una alimentación rica en grasas saturadas y pobre en hidratos de carbono.

La obesidad es uno de los factores más importantes que pueden desencadenar o exacerbar muchas de las características asociadas a SOP. Estudios en hermanas con SOP han demostrado como existen diferencias de peso entre los distintos fenotipos del síndrome: de este modo, las hermanas con hiperandrogenemia y ciclos irregulares tienen

mayor peso que las que presentan hiperandrogenemia y ciclos regulares, mientras que las hermanas sanas tienen menor peso que las hermanas afectas (41).

Además, distintos estudios han demostrado como determinados agentes infecciosos pueden producir una inflamación subclínica crónica y contribuir de este modo a la consecución de procesos patogénicos involucrados en el desajuste hormonal y metabólico de mujeres con SOP. *Morin-Papunen y col.* demostraron que aquellas mujeres afectas de SOP presentaban mayor cantidad de anticuerpos anti-*Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia trachomatis* junto con valores elevados de proteína C reactiva (CRP) que las mujeres sanas (42), insistiendo en el potencial efecto de los agentes infecciosos en desencadenar el desarrollo del síndrome al aumentar el grado de inflamación crónica, que ya de base está elevado en estas pacientes.

En resumen, podemos concluir diciendo que el SOP se trata de una entidad compleja de herencia poligénica que se ve influida por la presencia de distintos factores ambientales.

## **1.4. FISIOPATOLOGÍA**

Al igual que la definición de ovario poliquístico ha ido cambiando a lo largo del tiempo, las bases fisiopatológicas implicadas también se han ido modificando con los nuevos conocimientos sobre la regulación de la función ovárica. A continuación se expone la fisiopatología del SOP ordenada por los diferentes sistemas alterados:

### **1.4.1. Sistema hipotálamo-hipofisario-gonadal (HHG)**

Las mujeres con SOP presentan una secreción de gonadotropinas inadecuada caracterizada por concentraciones séricas elevadas de LH, aumento de la frecuencia y amplitud del pulso de LH y aumento del cociente LH/FSH (3, 43), contribuyendo de este modo a una excesiva estimulación del ovario en estas mujeres. Esta alteración

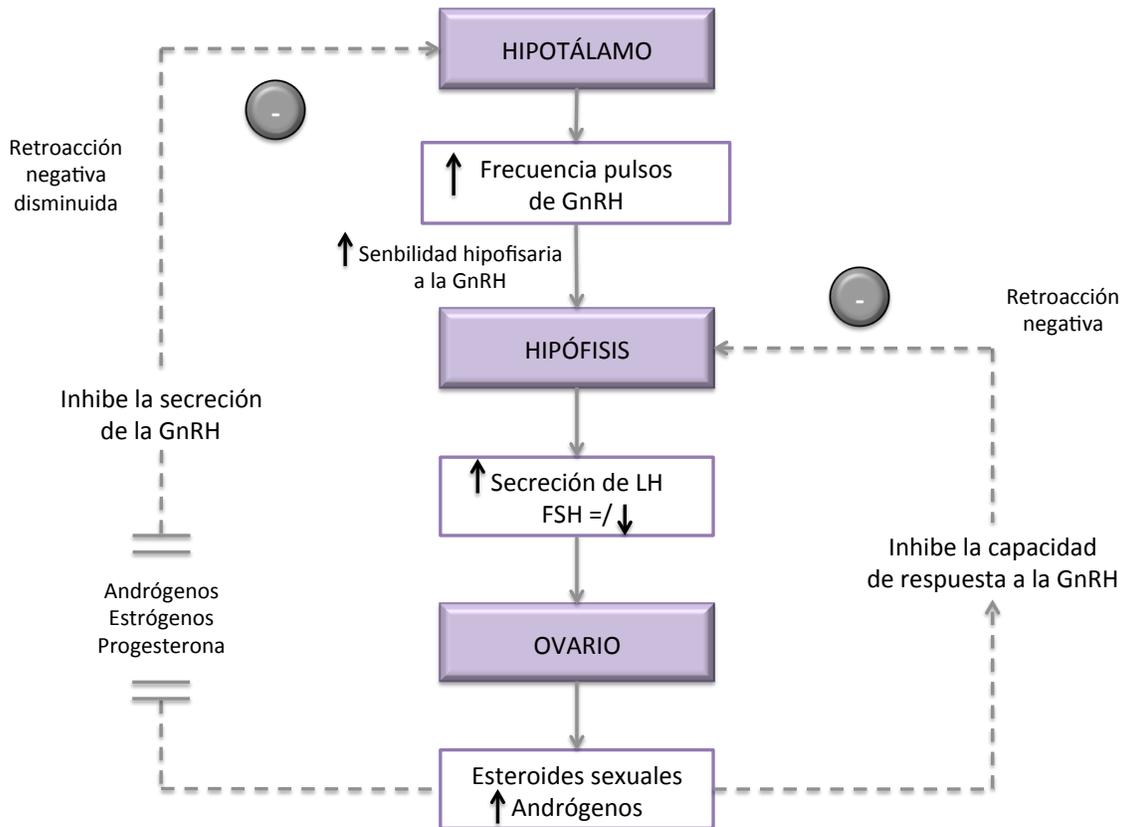
neuroendocrina es un rasgo típico del síndrome, presentando una prevalencia que oscila en el rango del 30% al 90 %, en función del momento en que se realiza la extracción de la muestra sanguínea en relación a la última menstruación (44-46).

La disfunción del eje HHG en el SOP se inicia en etapas tempranas del desarrollo, habiéndose demostrado una secreción anómala de LH en adolescentes con hiperandrogenemia antes y después de la menarquia. Mientras que el mecanismo responsable de este aumento en la secreción de LH permanece desconocido, actualmente se considera que podrían estar implicadas tanto una mayor respuesta hipofisaria a la GnRH así como alteraciones en el feedback negativo inducido por hormonas esteroideas (47).

En primer lugar, la actividad incrementada del generador de pulsos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) a nivel hipotalámico parece jugar un papel clave en la secreción anómala de LH. Estudios en roedores han demostrado un aumento en la expresión génica de LH $\beta$  en respuesta a la liberación rápida de GnRH (48, 49). Estos hallazgos han sido confirmados en estudios con humanos, donde se ha visto cómo la persistencia de rápidas frecuencias en el pulso de GnRH eleva las concentraciones plasmáticas de LH y disminuye las de FSH (50, 51), sugiriendo una mayor sensibilidad hipofisaria al estímulo con GnRH en las mujeres con SOP.

Otra alteración neuroendocrina que justifica el aumento de la secreción hipofisaria de LH en respuesta a la liberación de GnRH en mujeres con SOP es la reducción del *feedback* negativo inducido por las hormonas sexuales. *Pastor y col.* demostraron no sólo que el estradiol y la progesterona pueden inhibir la actividad del pulso generador de GnRH, sino que además, existe una insensibilidad hipotalámica a la inhibición inducida principalmente por progesterona en las mujeres con SOP (52). Otro factor que puede regular la actividad del pulso generador de GnRH es la hiperandrogenemia, habiéndose demostrado que los andrógenos pueden contribuir indirectamente en un aumento de la actividad del pulso de GnRH, aumentando la insensibilidad del mismo a la inhibición inducida por los esteroides ováricos en mujeres con SOP (53). Por tanto, una

insensibilidad del generador del pulso de GnRH al *feedback* negativo inducido por las hormonas sexuales de origen ovárico puede ser la responsable del incremento de la frecuencia del pulso de LH observado en mujeres con SOP.



**Figura 2.** Regulación hormonal eje hipotálamo-hipofisario-gonadal en pacientes con SOP. En estas pacientes existe un aumento en el generador de pulsos GnRH a nivel hipotalámico junto a una mayor sensibilidad hipofisaria a esta hormona, resultando en una mayor secreción de LH con niveles de FSH normales o relativamente bajos. Además, existe una reducción del feedback negativo inducido por las hormonas sexuales, aumentando de esta manera la secreción de LH.

La secreción de LH se ve modificada de modo inversamente proporcional por el índice de masa corporal en mujeres con SOP (54). Estudios previos han demostrado como las mujeres obesas con SOP tienen reducida la amplitud del pulso de LH sin modificaciones en la frecuencia del mismo en comparación con las mujeres delgadas con el síndrome, sugiriendo que el efecto de la obesidad en la secreción de LH es mediado a nivel hipofisario y no hipotalámico en mujeres con SOP (44-46).

Por último, los niveles relativamente reducidos de FSH (en relación a los de LH) son los responsables de un elevado cociente LH/FSH, y puede tener un papel indirecto en la hiperandrogenemia de las mujeres con SOP. Los relativos bajos niveles de FSH disminuyen la estimulación de la aromatasas, decreciendo de este modo la conversión de andrógenos en estrógenos y agravando, por tanto, el exceso andrógeno de estas pacientes.

#### **1.4.2. Nivel ovárico**

En mujeres con SOP, los ovarios son los responsables del 60% de la producción androgénica, mientras que las glándulas adrenales contribuyen en un 40% (55). Previamente se ha demostrado que las mujeres con SOP con bloqueo suprarrenal con dexametasona mostraron concentraciones superiores a las de las mujeres normales, sugiriendo un exceso de producción ovárica de andrógenos (56).

##### **1.4.2.1. Hiperproducción androgénica en SOP**

La cantidad total de andrógenos producida en el ovario viene determinada por dos factores principales: el número total de células teca intersticiales (TI) presentes en el ovario y por la capacidad esteroidogénica de cada una de ellas.

##### a) Proliferación excesiva de las células TI

Los ovarios poliquísticos, a diferencia de los normales, presentan gran número de folículos preantrales (2-8 mm de diámetro) dispuestos entorno al estroma ovárico en forma de “collar de perlas”. La mayoría de estos folículos presentan un estrato de células de la teca interna hipertrofiada, en el que puede distinguirse la presencia de más de 3-5 capas de células productoras de andrógenos, a diferencia de lo que ocurre en mujeres normales.

La proliferación de las células de la teca está regulada por distintos mecanismos. En primer lugar, la exposición de estas células a LH o hCG se traduce en un aumento en el número de células de la teca interna. Además, el factor de crecimiento IGF-1 y la insulina, ambos elevados en mujeres con SOP, no sólo inducen la proliferación de las células TI del ovario (57), sino que también previenen la entrada de dichas células en apoptosis (58). Otros factores de crecimiento intraováricos, tales como activina, factor de crecimiento epidérmico, TNF- $\alpha$  o TGF- $\alpha$  juegan también un papel muy importante en la regulación de la proliferación de las células de la teca.

#### b) Producción androgénica excesiva en células TI

Las mujeres con SOP se caracterizan por presentar una excesiva producción ovárica de andrógenos, causada por una elevada secreción de LH y un incremento en la respuesta de las células de la teca a la estimulación con gonadotropinas. Previamente se ha demostrado como las mujeres con SOP producen una mayor cantidad de andrógenos que las mujeres normales en respuesta a la administración de gonadotropina coriónica humana (hCG) (59) y hormona luteinizante (LH) (60).

Además, *Gilling-Smith et al.* demostró como, tras la supresión de LH sérica mediante la administración de agonistas de la GnRH, la producción ovárica de andrógenos era mayor en mujeres con SOP que en el grupo control (61), indicando la presencia de otros factores, intrínsecos o extrínsecos, relevantes en la regulación de la hiperproducción androgénica de estas pacientes. Para esclarecer esta situación, *Nelson y col.* cultivaron a largo plazo células de la teca de pacientes con SOP, demostrando que la esteroidogénesis excesiva en las células de la teca se mantenía tras sucesivos pases de cultivo y, por tanto, confirmando el “defecto intrínseco” en la actividad esteroidogénica de las células de la teca de los ovarios poliquísticos responsables de la producción excesiva de andrógenos (62).

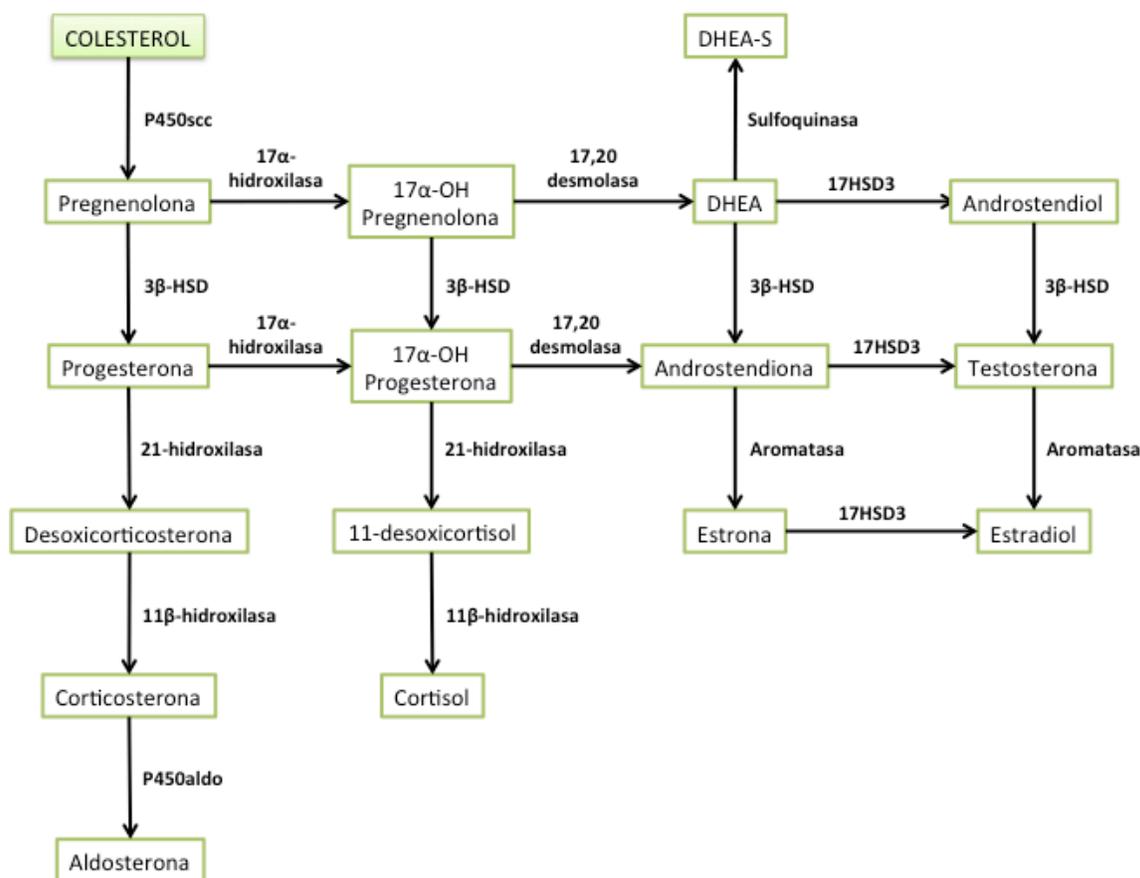
#### 1.4.2.2. Alteración en la maquinaria enzimática en las células de la teca

Este aumento del potencial esteroidogénico de las células de la teca en SOP se debe a un aumento de la expresión y actividad de las enzimas P450ssc (enzima de la escisión de la cadena lateral del colesterol), codificada por el gen *CYP11A1*, 3-β-HSD tipo II (3-β-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo II), codificada por el gen *HSD3B2* (*Hsd3b1* codifica 3-β-HSD tipo I, isoforma predominante en la rata), y P450c17α (17α-hidroxilasa/17,20 desmolasa), codificada por el gen *CYP17A1* (62, 63). En cambio, no se han observado diferencias en cuanto a la cantidad de mRNA y la actividad transcripcional del promotor de la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (*Star*) en células de la teca de mujeres con SOP con respecto a mujeres normales (63, 64).

Los primeros estudios moleculares llevados a cabo para estudiar la esteroidogénesis en el SOP se centraron en la enzima P450c17α, considerada la enzima limitante de la biosíntesis de andrógenos. Esta enzima lleva a cabo dos funciones: en primer lugar la actividad hidroxilasa cataliza la 17α-hidroxilación de la pregnenolona y progesterona, y posteriormente la actividad 17,20 desmolasa rompe el enlace entre C17-C20 de la 17α-hidroxi-pregnenolona y 17α-hidroxi-progesterona para formar DHEA y androstendiona, respectivamente (**Fig.3**). Las actividades catalíticas de P450c17α dependen de la donación de electrones de NADPH mediante la acción de una flavoproteína unida a membrana denominada P450 oxidorreductasa (POR) (65).

La regulación de la expresión génica de *CYP17A1* en células de la teca de mujeres SOP tiene lugar a distintos niveles. A nivel transcripcional, estudios de microarrays de DNA han demostrado como la expresión del promotor del gen *CYP17A1* es tres veces mayor en células de la teca de mujeres con SOP que en mujeres sanas (66). Una secuencia de 16 pares de bases (pb: -174 a -158) en este promotor es la responsable de la regulación de su función en el SOP, siendo modulado por la interacción de distintos factores nucleares (67). De este modo, el factor nuclear 1C (NF-1C), que inhibe la función del promotor, está disminuido mientras que otros factores de transcripción estimuladores

del promotor, tales como GATA6 y retinoides están sobreexpresados en células de la teca en el SOP (67-69). A nivel post-transcripcional, estudios moleculares han demostrado como la vida media del mRNA de *CYP17A1* en el SOP es el doble que en condiciones normales, produciéndose un aumento de la acumulación de mRNA de *CYP17A1* y subsiguientemente, un aumento en la producción enzimática en estas mujeres (70, 71).



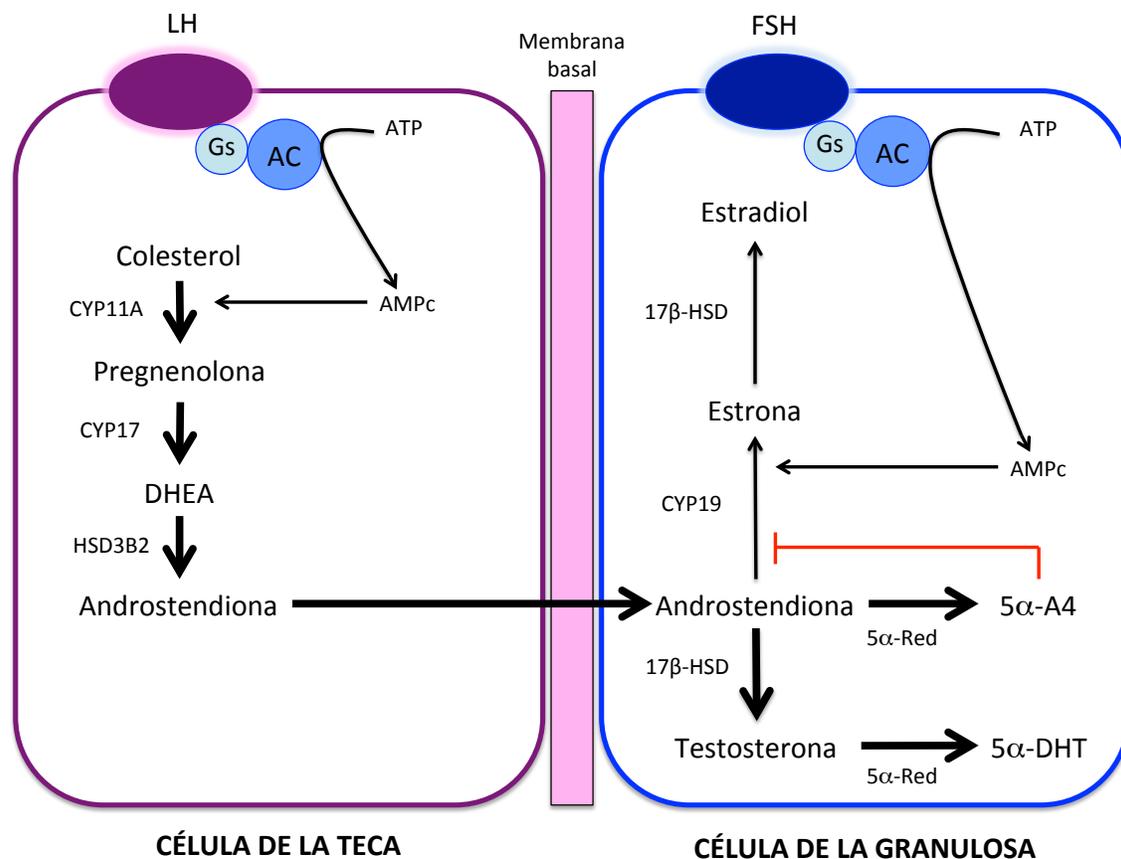
**Figura 3.** Enzimas implicadas en la esteroidogénesis ovárica y suprarrenal. La pregnenolona se convierte en androstenediol a través de la vía esteroidea  $\Delta$ -5, en progesterona a través de la  $3\beta$ -HSD, y en testosterona a través de la vía esteroidea  $\Delta$ -4. Las células de la teca expresan StAR, proteína que se encarga del transporte del colesterol a la membrana mitocondrial interna. Aquí su conversión a pregnenolona está catalizada por la proteína P450scc. Posteriormente, la enzima P450c17, convierte a la pregnenolona en  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona y DHEA (vía esteroidea  $\Delta$ -5, predominante en la glándula suprarrenal) y a la progesterona en  $17\alpha$ -hidroxiprogestero y androstendiona (vía esteroidea  $\Delta$ -4, predominante en el ovario). La expresión de *CYP11A*, *CYP17* y *HSD3B2* está aumentada en células de la teca de mujeres con SOP. Adaptado de referencia (68).

Posteriormente, los estudios se centraron en *CYP11A1*, demostrando que, al igual que ocurre con *CYP17A1*, la cantidad de mRNA de *CYP11A1* basal y estimulada, la estabilidad del mRNA y la actividad del promotor del gen están aumentados en cultivos prolongados de células de la teca provenientes de mujeres con SOP comparado con células de la teca de ovarios normales. También se observó que el área de unión del factor nuclear 1C2 (factor de transcripción) al promotor de *CYP11A1* estaba alterada en células de la teca de mujeres con SOP. Por tanto, podemos concluir diciendo que las células tecales en el SOP sobreexpresan *CYP11A1* debido a una combinación de un aumento en la actividad del promotor junto con un aumento en la vida media de mRNA de dicho gen (72).

#### **1.4.2.3. Metabolismo androgénico anormal en SOP**

El ovario normal metaboliza la mayor parte de la androstendiona producida en las células de la teca, transformándola en estrona y estradiol en las células de la granulosa. Sin embargo, los ovarios poliquísticos presentan folículos preantrales detenidos en su desarrollo, que producen cantidades mucho más bajas de aromatasa que las producidas por el folículo dominante en el ovario normal, dando lugar a una acumulación de androstendiona (73).

Los folículos preantrales, ya sean de ovarios poliquísticos o normales, se caracterizan por expresar ambas isoformas del enzima  $5\alpha$ -reductasa, aunque la isoforma tipo 1 es la predominante en el tracto reproductivo femenino (74). Aproximadamente en el momento en el que las células de la granulosa empiezan a expresar la aromatasa, la expresión de la  $5\alpha$ -reductasa empieza a decrecer hasta niveles indetectables. Es justo en este momento cuando el desarrollo folicular en mujeres con SOP se detiene, traduciéndose en una actividad elevada de la  $5\alpha$ -reductasa y en niveles elevados de andrógenos  $5\alpha$ -reducidos [ $5\alpha$ -androsteno-3, 17-diona ( $5\alpha$ -A4);  $5\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT)] tanto en líquido folicular como en suero de pacientes con SOP (75) (Fig.4).



**Figura 4.** Capacidad esteroidogénica de las células de la teca y granulosa en los ovarios poliquísticos. La hormona luteinizante (LH) estimula la expresión de CYP11A, CYP17 y HSD3B2 en las células de la teca por un mecanismo mediado por AMPc. Las células de la teca expresan poca 17β-HSD y, por tanto, producen poca testosterona. En el ovario normal, la androstendiona es transportada a las células de la granulosa, donde se transforma en estradiol. En cambio, en los ovarios poliquísticos, la androstendiona se transforma en testosterona, 5α-dihidrotestosterona (5α-DHT) y 5α-androsten-3,17-diona (5α-A4), induciendo un bloqueo de la actividad de la aromatasa. Adaptado de referencia (76).

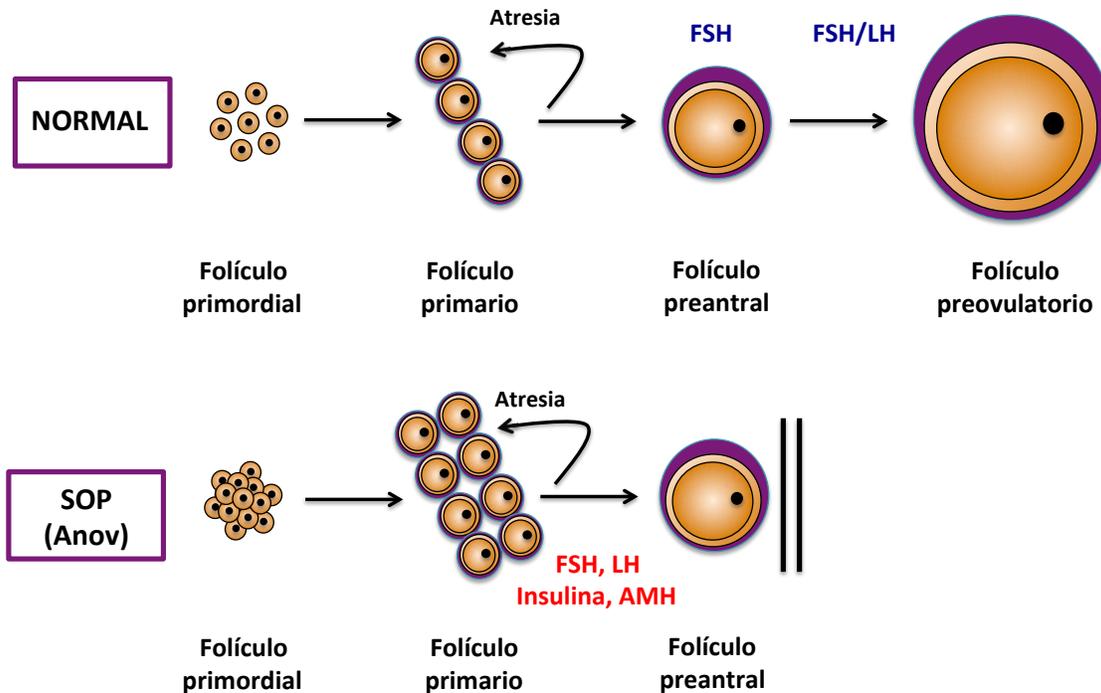
Aunque la concentración de 5α-A4 en folículos normales en desarrollo tiene poco efecto, las concentraciones presentes en el líquido folicular de los ovarios poliquísticos es lo suficientemente elevada como para suprimir la actividad de la aromatasa de modo competitivo, contribuyendo de esta manera al bloqueo del desarrollo del folículo dominante en pacientes con SOP. Además, la DHT contribuye al bloqueo folicular inhibiendo la proliferación de las células de la granulosa mediada por la acción de la FSH (77, 78).

#### 1.4.2.4. Disfunción ovulatoria

El inicio y desarrollo de las etapas precoces de la foliculogénesis se lleva a cabo en ausencia de gonadotropinas, mientras que las etapas tardías, así como la selección de la cohorte y el reclutamiento cíclico de folículos desde la fase antral, está notablemente regulada por la actividad de la FSH (79). Se ha postulado que la disfunción ovulatoria presente en el SOP puede deberse a una alteración en la secreción de FSH (**Fig. 5**). De hecho, las mujeres con SOP se caracterizan por la presencia de niveles de FSH en el rango normal-ligeramente disminuido y un cociente LH/FSH elevado. Sin embargo, las células de la granulosa de las mujeres con SOP expresan una mayor unión a FSH y son altamente sensibles a la administración de FSH, tanto *in vitro* como *in vivo* (80). Estos hallazgos han sido confirmados por ensayos clínicos en los que se ha visto cómo las pacientes con SOP que llevaron a cabo una estimulación ovárica con FSH exógena respondieron con mayores niveles de estradiol que las mujeres sanas (81, 82). En cambio, este aumento en la cifra de estradiol no se mantuvo en el tiempo en mujeres con SOP, mientras que en ovarios normales los niveles de estradiol persistieron durante 24 horas después del pico. Estos hallazgos sugieren la posibilidad de un defecto en actividad de la aromatasa (83).

Se ha postulado que la disfunción ovulatoria observada en el SOP puede ser debida al aumento en los niveles séricos de LH que tiene lugar en dicho síndrome (44). En un estudio llevado a cabo en células de la granulosa proveniente de folículos de ovarios poliquísticos y normal, se evaluaron los niveles de progesterona como marcadores de luteinización. Se observó que la producción de progesterona era evidente en células de la granulosa de ovarios normales en folículos mayores a 10 mm, mientras que la producción de esta hormona en ovarios poliquísticos era ya evidente en folículos de 4 mm, indicando la presencia de luteinización prematura (84). Teniendo en cuenta que durante la foliculogénesis espontánea el cese del crecimiento de las células de la granulosa ocurre inmediatamente después a la luteinización, los hallazgos anteriormente descritos podrían explicar el fallo de crecimiento folicular presente en el SOP. Además,

se ha descrito una sobreexpresión del receptor de LH en células de la granulosa de SOP comparado con ovarios normales (85), lo que reforzaría la teoría anteriormente expuesta.



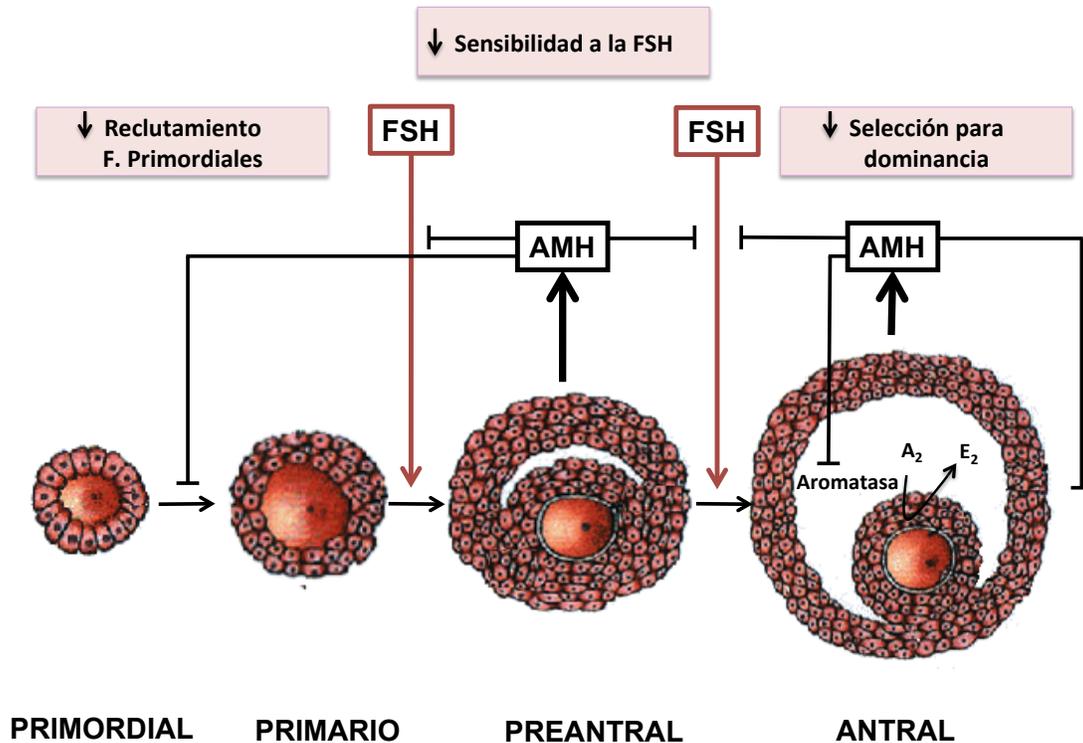
**Figura 5.** Diferencias en la foliculogénesis de ovarios normales y poliquísticos de mujeres anovuladoras [SOP (Anov)]. En el ovario normal, los folículos crecen hasta el estadio de folículo primario, durante el cual muchos sufren atresia. A continuación, bajo la influencia de la FSH, se producirá la selección folicular al adquirir los receptores de LH, produciéndose el proceso de diferenciación. En los ovarios poliquísticos de mujeres anovuladoras, los altos niveles de AMH inhiben el crecimiento folicular. Además la insulina sensibiliza a las células de la granulosa a la acción de la LH, induciendo una luteinización precoz y, por tanto, un cese precoz del crecimiento folicular. Adaptado de referencia (86).

La mejora de la sensibilidad a la insulina secundaria a la pérdida de peso en pacientes obesas con SOP se traduce en una restauración de los ciclos ovulatorios, indicando la estrecha relación existente entre la anovulación y la resistencia a la insulina (87). *Willis y col.* observaron que la insulina induce un bloqueo en el crecimiento folicular en el SOP como consecuencia de la luteinización prematura (84). La insulina sensibiliza prematuramente a las células de la granulosa frente a los efectos de la LH, de modo que son capaces de responder a la LH en folículos de tan solo 4 mm proveniente de

mujeres hiperinsulinémicas con SOP. Por tanto, la hiperinsulinemia secundaria a la RI observada en algunas de estas pacientes podría inducir un bloqueo en la foliculogénesis secundario a la luteinización prematura (86).

La hormona anti-mülleriana (*anti-müllerian hormone*, AMH), también llamada sustancia inhibidora mülleriana (MIS), es producida por las células de la granulosa de los folículos preantrales y antrales de pequeño tamaño. Esta proteína, cuya expresión aumenta a lo largo del desarrollo folicular y disminuye tras la selección folicular para la dominancia, se considera en la actualidad un marcador de reserva ovárica tanto en mujeres normales como en SOP (88). Estudios basados en modelos animales han puesto de manifiesto como la AMH interfiere en el crecimiento folicular temprano en el ovario mediante la inhibición del reclutamiento de folículos primordiales, disminución de la sensibilidad de los folículos a la FSH e inhibición de la expresión de la aromatasa inducida por FSH y LH en las células de la granulosa reduciendo, por tanto, la producción de estradiol (89) (**Fig.6**).

Esta capacidad de la AMH para alterar el crecimiento folicular en sus fases tempranas podría explicar el bloqueo en la maduración folicular observado en pacientes con SOP. De hecho, *Fallat y col.* demostraron que los niveles séricos de AMH en mujeres con SOP eran dos a tres veces más elevados que en mujeres con ovarios normales (90). Además, la producción de AMH en mujeres anovuladoras con SOP comparado con las mujeres normales era mayor, tanto en líquido folicular como cuantificado por célula de la granulosa, demostrando que el aumento en la producción de AMH en estas pacientes no sólo se debe a un aumento en el número de folículos, sino también a un aumento en la producción individual de hormona por folículo.



**Figura 6.** Funciones de la hormona AMH en la regulación de la foliculogénesis. La secreción de AMH inhibe el reclutamiento de folículos primordiales, disminuye la sensibilidad a la FSH e inhibe la expresión de la aromatasa. A<sub>2</sub> = Andrógenos. E<sub>2</sub> = Estrógenos. Adaptado de referencia (91).

Varios estudios han demostrado que existe una correlación entre los niveles séricos de AMH y la severidad de los rasgos diagnósticos de SOP: hiperandrogenismo, oligoanovulación y morfología ovárica poliquística (92, 93). Además los niveles de AMH están negativamente correlacionados con la edad, IMC, existiendo una correlación positiva entre los niveles de AMH y los niveles de LH, andrógenos, número de folículos y volumen ovárico (94). Existe un descenso en los niveles de AMH en respuesta al tratamiento inductor de la ovulación, observando que aquellas mujeres con los niveles más elevados tienen los peores resultados y presentan mayor resistencia al tratamiento (95, 96).

### 1.4.3. Nivel suprarrenal

Además del hiperandrogenismo de origen ovárico, aproximadamente el 20-60% de las mujeres con SOP tienen también un exceso de producción de andrógenos de origen suprarrenal que se extiende hasta etapas tardías de su edad reproductiva, caracterizado por niveles elevados de sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S), siendo ésta la forma sulfatada de la DHEA y principal andrógeno secretado por la glándula suprarrenal (97-99). Aunque el mecanismo exacto de dicha hipersecreción es desconocido, en la actualidad se piensa que la combinación de factores intrínsecos y extrínsecos a la glándula pudiera estar implicada.

Aunque las mujeres con SOP se caracterizan por presentar niveles de adrenocorticotropina (ACTH) en el rango normal, existe una respuesta inapropiadamente alta de la glándula suprarrenal a las pruebas de estimulación con ACTH (100, 101). Además, se han propuesto algunos polimorfismos o mutaciones en los genes que codifican las enzimas implicadas en la esteroidogénesis como responsables de la hipersecreción de andrógenos de origen suprarrenal, pero tan solo el aumento en la actividad de P450c17 parece jugar un papel relevante (102, 103).

El exceso de producción de andrógenos puede deberse a la presencia de determinados factores externos, tales como los andrógenos ováricos y la insulina. De hecho, la administración in vivo de testosterona en mujeres ooforectomizadas resulta en un cociente DHEAS/DHEA elevado, sugiriendo que la testosterona podría aumentar la sulfatación de DHEA en estas mujeres (104).

### 1.4.4. Resistencia insulínica - Hiperinsulinemia

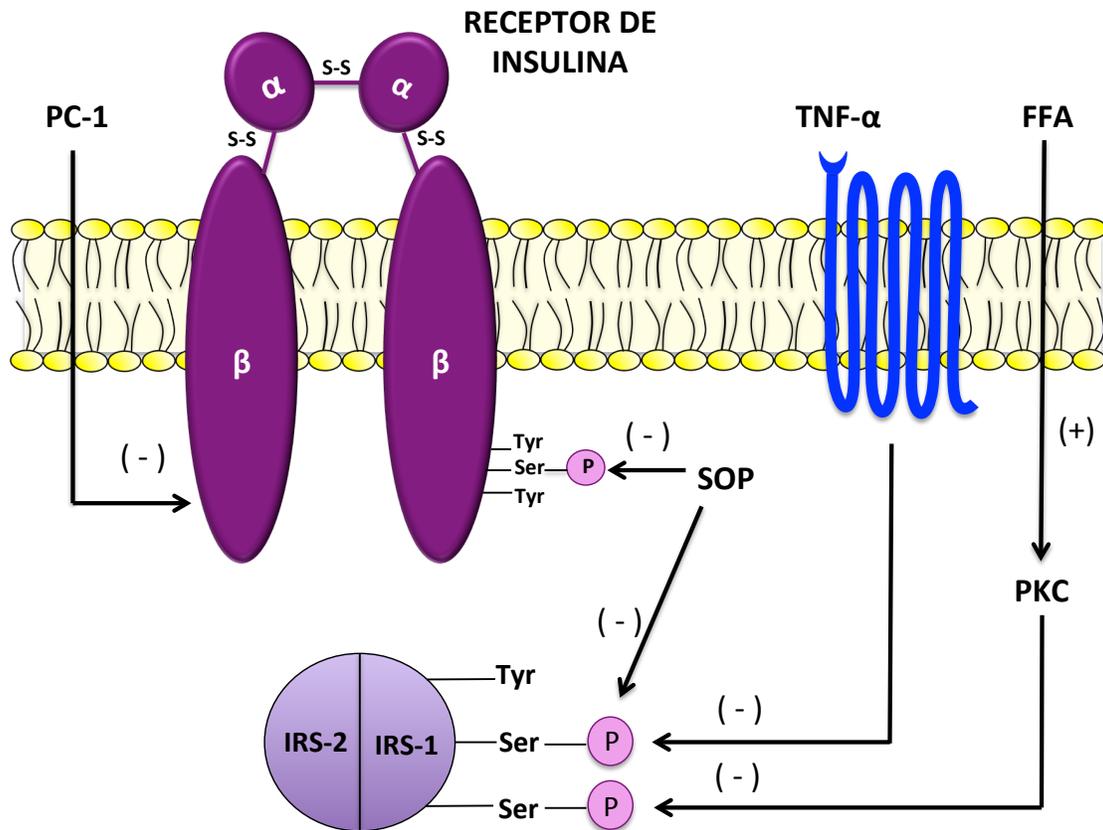
La RI se define como la alteración de la respuesta tisular a la acción de la insulina, produciéndose una menor captación de glucosa en diferentes órganos, siendo los más importantes el músculo, el hígado y el tejido adiposo. La presencia de RI en mujeres con SOP fue descrita por primera vez en 1980 por *Burguen* (4) siendo su prevalencia

aproximadamente del 50% en mujeres con SOP (105, 106). *Dunaif y col* demostraron que las mujeres obesas con SOP eran más insulín-resistentes que las delgadas y que, a su vez, las mujeres con SOP lo eran más que las mujeres sanas independientemente de su peso (107). Estos hallazgos sugieren que la presencia de RI en SOP es independiente de la obesidad, pero que puede agravarse por la presencia de la misma. El mecanismo por el cual la RI aparece en SOP todavía permanece desconocido.

En los últimos años, se han llevado a cabo numerosos estudios *in vitro* encaminados a demostrar posibles alteraciones a nivel del receptor de insulina y posterior transducción de señal. El receptor de insulina es un heterotetrámero compuesto por dos dímeros  $\alpha,\beta$ - unidos entre sí por puentes disulfuro y forma parte de la familia de receptores de factor de crecimiento. La subunidad  $\alpha$  es extracelular y contiene el dominio de unión a ligando mientras que la subunidad  $\beta$  atraviesa la membrana celular y posee un dominio citosólico con actividad tirosina quinasa intrínseca, que se activa mediante fosforilación específica de los residuos de tirosina tras la unión del ligando al receptor. Esta activación de la actividad tirosina quinasa intrínseca induce la fosforilación intracelular de los sustratos del receptor de insulina tipos 1 y 2 (IRS 1-2), que uniéndose a distintas moléculas darán lugar a la consecución de las señales de transducción, induciendo una serie de reacciones en cascada que provocarán, finalmente, las diferentes acciones de la insulina (108) (**Fig. 7**).

Estudios *in vitro* en adipocitos humanos han demostrado que no hay diferencias en el número y/o afinidad de los receptores de insulina entre las mujeres con SOP y el grupo control (109-111). No obstante, las tasas de transporte de glucosa, transportadores de glucosa GLUT4 e inhibición de la lipólisis fueron significativamente menores en adipocitos de mujeres con SOP que en mujeres normales, sugiriendo la existencia de un posible defecto a nivel post-receptor. *Dunaif y col.* observaron que el 50% de las pacientes con SOP presentaba un aumento en la fosforilación de los residuos serina del receptor de insulina, dando lugar a una inhibición de la actividad tirosina quinasa del receptor y, por tanto, a una disminución de las acciones biológicas de la insulina (112). En cambio los fibroblastos del 50% restante de mujeres estudiadas no presentaban dicha

alteración a pesar de presentar resistencia insulínica, sugiriendo la existencia de alguna otra alteración en la cascada de transducción de señales. Finalmente, estudios llevados a cabo en biopsias de músculo esquelético demostraron una interacción anómala entre IRS-1 con la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) (113). Todos estos estudios confirman la existencia de alteraciones en la cascada de transducción de señales del receptor de insulina y que estos defectos pueden ser tejido-específicos.



**Figura 7.** Mecanismos moleculares de la resistencia insulínica en SOP. Existe un defecto a nivel post-receptor responsable de la disminución en la sensibilidad a la insulina en los tejidos diana. Este defecto es debido a un aumento en la fosforilación de los residuos serina del receptor de insulina e IRS-1, dando lugar a una inhibición de la actividad tirosina quinasa del receptor y, por tanto, a una disminución de las acciones biológicas de la insulina. TNF- $\alpha$  y la PKC están implicados en la fosforilación de residuos de serina tanto del receptor de insulina como de IRS-1, mientras que PC-1 inhibe la actividad tirosina quinasa del receptor de insulina independientemente de la fosforilación de residuos de serina del receptor. Adaptado de referencia (114).

Se ha sugerido que la proteína quinasa C (PKC) podría ser un candidato para explicar la fosforilación de residuos de serina tanto del receptor de insulina como de IRS-1 (115, 116). Posteriormente se describió la presencia de otros factores extrínsecos que podrían interactuar con proteínas clave en la cascada de transducción inducida por la insulina. El factor de diferenciación de célula plásmatica (PC-1) inhibe la actividad tirosina quinasa del receptor de insulina independientemente de la fosforilación de residuos de serina del receptor (117). Por su parte, el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) induce RI mediante la fosforilación de serina de IRS-1, inhibiendo subsiguientemente la propagación de la señal (118) (**Fig. 7**).

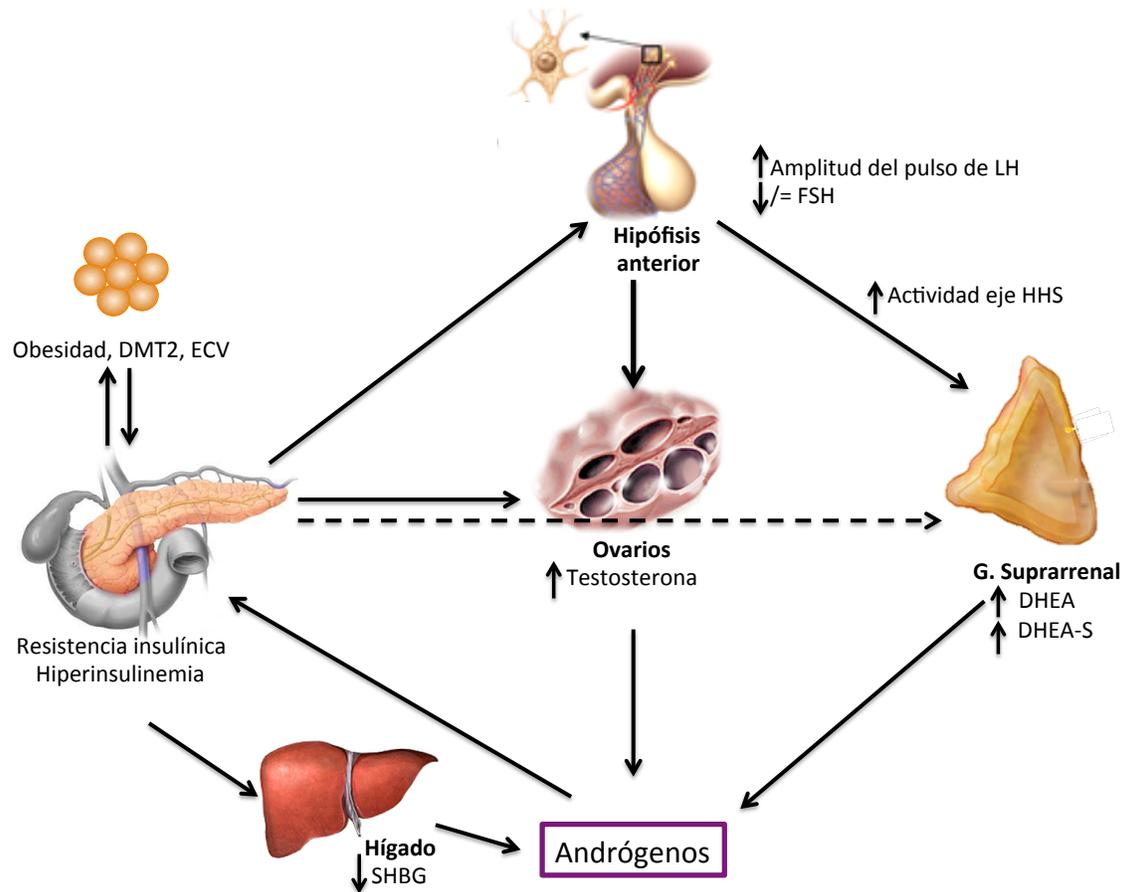
Independientemente del origen de la RI, se produce una respuesta compensadora pancreática dando lugar a la aparición de un hiperinsulinismo secundario que, a su vez, es agravado por la presencia de un menor aclaramiento hepático de insulina (119). Este exceso de insulina, además de actuar en sus órganos diana, puede afectar a diferentes glándulas y, por tanto, contribuir a la patogénesis del hiperandrogenismo en SOP.

#### **1.4.4.1. Efecto de la insulina a nivel ovárico**

La insulina estimula la síntesis de andrógenos, tanto basal como la estimulada por LH, en las células de la teca de mujeres con SOP (120, 121). Aunque pueden mediar sus efectos a través del receptor del factor de crecimiento insulínico-1 (IGF-1), la insulina también estimula la esteroidogénesis actuando directamente a través de su propio receptor, tanto en células de la teca como en células de la granulosa (122-124).

Estudios *in vitro* han demostrado como la insulina estimula la esteroidogénesis en las células de la teca mediante distintos mecanismos. En primer lugar, la insulina induce un efecto proliferativo (125) y antiapoptótico (126) en células tecales, aumentando así la proporción de células con potencial esteroidogénico. Además, aumenta la capacidad esteroidogénica de cada célula individual induciendo la actividad de las principales proteínas y enzimas que intervienen en la biosíntesis de andrógenos, tales como StAR (127), P450<sub>scc</sub> (128), 3 $\beta$ -HSD (129) y P450<sub>c17 $\alpha$</sub>  (123). Por último, estudios basados en

células de rata observaron que la insulina aumenta la expresión de los receptores de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en células de la teca, aumentando de este modo la concentración intracelular de colesterol y favoreciendo así la biosíntesis de andrógenos (130) (Fig. 8).



**Figura 8.** Diferentes mecanismos implicados en la patogénesis del SOP. En mujeres con SOP existe un aumento en la amplitud del pulso de LH y una mayor actividad del eje HHS, dando lugar a una mayor producción de andrógenos por parte del ovario y glándula suprarrenal. Además, la hiperinsulinemia secundaria a la resistencia insulínica contribuye a esta hiperandrogenemia y está estrechamente ligada con el desarrollo de obesidad, DMT2 y ECV en estas pacientes. Eje HHS: Hipotálamo-hipofisario-suprarrenal. ECV: enfermedad cardiovascular.

En las células de la granulosa, la insulina estimula la producción de progesterona y estradiol tanto basal como en respuesta a FSH y LH, además de aumentar la actividad de aromataasa, paso crucial para la formación de estrógenos a partir de los andrógenos producidos en las células de la teca. *Poretsky* ha hablado así de una acción gonadotropa de la insulina (131). Además, *Kayampilly y col.* han demostrado que la insulina estimula tanto la expresión como la actividad catalítica de la enzima  $5\alpha$ -reductasa tipo 1 en células de la granulosa de rata y humanas (132).

#### **1.4.4.2. Efecto de la insulina a nivel hepático**

Estudios *in vitro* han demostrado como la insulina inhibe la síntesis hepática de hormona transportadora de esteroides sexuales (SHBG) (133). Estudios *in vivo* han confirmando estos resultados, confirmando que la insulina inhibe la producción hepática de SHBG, provocando concentraciones elevadas de testosterona libre debido a una reducción en la tasa de unión de la hormona a su proteína transportadora (134).

Los niveles elevados de insulina también inhiben la secreción hepática de la proteína de unión al IGF-I (IGFBP-I), dando lugar a un aumento en la biodisponibilidad tanto de IGF-1 como de IGF-2, que son importantes reguladores de la maduración folicular ovárica y de la esteroidogénesis (135-137).

#### **1.4.4.3. Efecto de la insulina a nivel del eje hipotálamo-hipofisario**

En la actualidad, la relación existente entre los niveles de insulina y su interacción con las gonadotropinas es controvertida. Estudios *in vitro* han demostrado como la insulina estimula la actividad del promotor de la GnRH en un modelo animal de células hipotalámicas (138), así como la expresión de mRNA de FSH y LH basal y estimulada por GnRH en células hipofisarias de rata (139). Estos resultados sugieren que los niveles elevados de insulina podrían alterar la regulación del eje hipotálamo-hipofisario y elevar los niveles de LH, contribuyendo, por tanto, a la hiperandrogenemia asociada a SOP.

No obstante, estos resultados no se correlacionan con los observados en estudios *in vivo*. En primer lugar, la administración de insulina exógena en mujeres con SOP no alteró la secreción de LH. Además, el tratamiento de este grupo de mujeres con metformina no disminuyó la frecuencia del pulso de LH a pesar de inducir una mejora en los niveles de insulina (140). Estos hallazgos indican que la hiperinsulinemia asociada a SOP no induce, al menos directamente, anormalidades neuroendocrinas.

#### **1.4.4.4. Efecto de la insulina a nivel suprarrenal**

La asociación entre la insulina y síntesis de androgénos en la glándula suprarrenal es controvertida. Mientras que algunos estudios *in vitro* han demostrado un efecto estimulador de la insulina en la producción esteroidea adrenal (141), otros han demostrado efectos inhibidores (142). Por su parte, un gran número de estudios *in vivo* han observado no sólo una estimulación de la síntesis de andrógenos en la glándula suprarrenal por parte de la insulina (143-145), sino también una disminución de los niveles de andrógenos de origen adrenal en mujeres con SOP tras la normalización de los niveles de insulina con agentes sensibilizantes a la insulina (146-148). Sin embargo, existen otros estudios que han observado como la administración de insulina en mujeres con SOP puede disminuir los niveles de andrógenos adrenales (149-151). Actualmente algunos autores sostienen que la insulina aumenta la sulfatación intraadrenal de DHEA (144), por lo que dicha hormona podría ser la responsable de los niveles elevados de DHEAS observados en mujeres con SOP (104).

## **1.5. CLÍNICA**

El SOP se caracteriza por la presencia de una serie de síntomas y signos heterogéneos que se inician durante la menarquia y que pueden modificarse a lo largo del tiempo.

### **1.5.1. Oligo-amenorrea**

Las alteraciones menstruales de estas pacientes suelen ser las manifestaciones clínicas más precoces y frecuentes, con una prevalencia aproximada del 70% (152). Pueden presentarse en forma de oligomenorrea (sangrado que ocurre a intervalos >35 días), amenorrea (ausencia de sangrado durante más de 6 meses en mujeres en edad fértil) o sangrado uterino disfuncional como resultado de la anovulación crónica.

### **1.5.2. Hiperandrogenismo**

La siguiente manifestación clínica en aparecer es el hirsutismo, definido como el crecimiento de terminales pilosas en zonas andrógeno-dependientes, siendo utilizado como indicador clínico primario del exceso de andrógenos en la mujer. Las presentaciones más comunes en mujeres con SOP son el exceso de vello facial, en el tórax entre ambas mamas y en el hemiabdomen inferior. Otras manifestaciones clínicas derivadas del hiperandrogenismo son el acné que empeora en edad adulta y la calvicie androgénica, descrita como patrón progresivo de pérdida de pelo terminal en el cuero cabelludo de patrón masculino (de predominio frontoparietal).

### **1.5.3. Infertilidad**

La infertilidad de estas pacientes es un motivo habitual de consulta y se produce principalmente como consecuencia de la anovulación. Además, las mujeres con SOP presentan una mayor tasa de abortos precoces debido a alteraciones en el desarrollo

ovocitario y embriogénesis (153, 154), así como a una receptividad endometrial disminuida (155).

#### **1.5.4. Alteraciones metabólicas y cardiovasculares**

En cuanto a las manifestaciones metabólicas, la presencia de obesidad es uno de los signos clínicos más importantes del síndrome, presentando una prevalencia del 35-50% (156, 157). El aumento de la grasa corporal sigue un patrón de distribución centrípeta con un índice cintura-cadera incrementado. En la actualidad, se ha demostrado que este tipo de obesidad es un factor de riesgo de infarto de miocardio en mujeres con SOP (158). Además, la presencia de obesidad y RI en estas mujeres desemboca en la aparición de otras alteraciones metabólicas, tales como diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), HTA y dislipemia, agravando de este modo el síndrome metabólico y el riesgo de eventos cardiovasculares en las mujeres con SOP (159, 160).

#### **1.5.5. Problemas psicológicos**

Además de los síntomas y signos físicos comentados previamente, el 5-10% de las mujeres que padecen SOP experimentan algún tipo de alteración psicológica, manifestada principalmente como ansiedad y/o depresión. Este aumento de patología psicoafectiva en mujeres con SOP está especialmente marcado en la adolescencia y podría estar motivado por los síntomas que a menudo padecen, tales como hiperandrogenismo, obesidad e infertilidad, empeorando de manera notable su calidad de vida (161).

#### **1.5.6. Complicaciones a largo plazo**

Entre las complicaciones a largo plazo del SOP, destacan la hiperplasia y cáncer de endometrio como consecuencia de la secreción continua de estrógenos no compensada con progesterona (9). Además, la obesidad y la diabetes, que suelen formar parte del

síndrome, son factores de riesgo del cáncer de endometrio, aumentando de este modo el riesgo de aparición de esta patología en las mujeres con SOP (162).

## 1.6. DIAGNÓSTICO

Desde la publicación en 2004 del primer documento de consenso entre la sociedad europea (ESHRE) y americana (ASRM) de reproducción en 2004 (9), se han unificado los criterios diagnósticos del SOP en los siguientes:

- Oligovulación o anovulación.
- Hiperandrogenismo clínico o analítico
- Diagnóstico ecográfico de ovario poliquístico

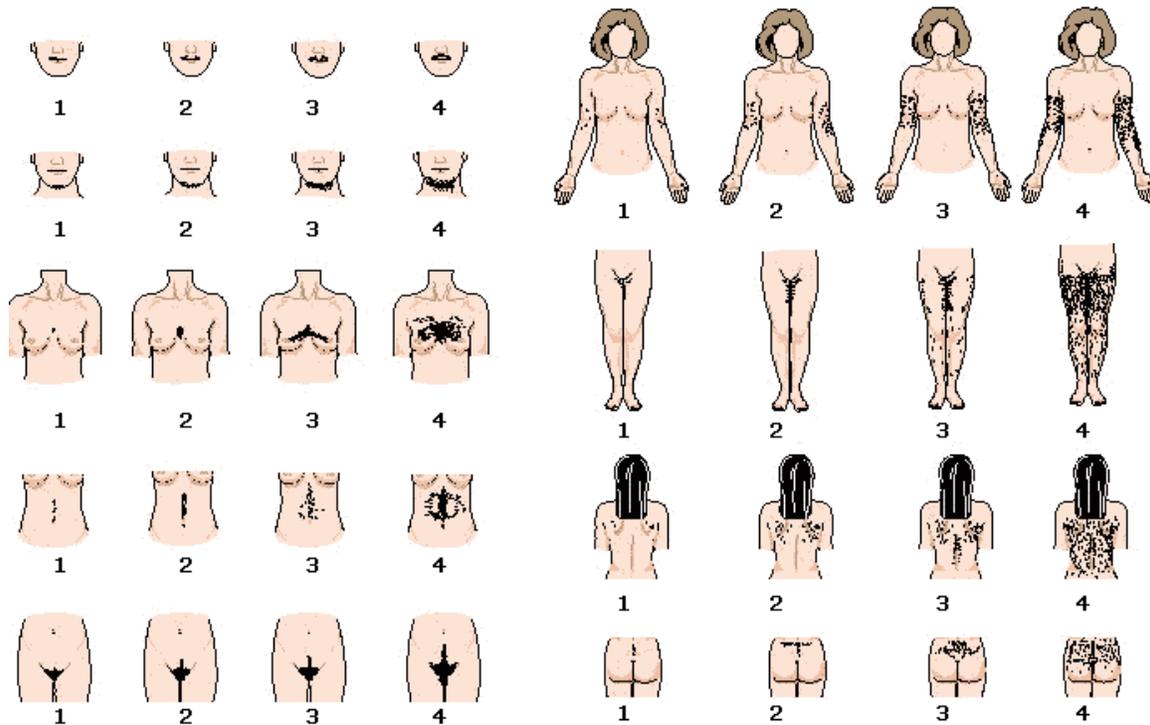
Para el diagnóstico se requiere la presencia de dos de los tres criterios y debemos excluir otras patologías que produzcan alteraciones ovulatorias asociadas a hiperandrogenismo. A continuación se detallarán los pasos a seguir para el diagnóstico de SOP.

### 1.6.1. Historia clínica y exploración

Los datos de la historia clínica resultan claves para poder realizar el diagnóstico de SOP. La asociación de alteraciones menstruales como consecuencia de la disovulación, junto al hirsutismo, que puede acompañarse de acné y/o seborrea, se consideran suficientes para poder realizar el diagnóstico.

Uno de los puntos más importantes en el diagnóstico es la evaluación clínica del grado de hiperandrogenismo, que también resulta de interés en el seguimiento y en la monitorización de las terapias instauradas. El principal problema en la valoración del hiperandrogenismo clínico radica en la falta de uniformidad, debido a variaciones étnicas, condiciones pre-estudio no estandarizadas y falta de objetividad del observador con los tests actuales. El test de *Ferriman* modificada por *Gallwey* es una escala analógica

semicuantitativa que puntúa de 0 a 4 (según el grado y características del pelo) hasta 11 áreas androgenosensibles. Clásicamente se ha considerado como normal una puntuación total inferior a 8 tras la suma de las diferentes áreas. No obstante, un porcentaje elevado de mujeres con SOP presenta puntuaciones entre 6 y 8 (**Fig. 9**) (163).



**Figura 9.** Escala de Ferriman-Gallwey modificada. Adaptado de referencia (164).

Otro dato de interés en la exploración de estas pacientes es la presencia de obesidad, ya que hasta el 50% de estas pacientes son obesas. Por ello, es necesario incluir en la exploración de estas pacientes tanto el índice de masa corporal [IMC: peso (kg)/talla<sup>2</sup> (m)] como el cociente entre el perímetro abdominal y el de la cadera, con el fin de diagnosticar la presencia de obesidad y el tipo (de predominio superior u “obesidad androide” o inferior u “obesidad ginecoide”). Según la OMS, se define sobrepeso cuando el IMC es superior a 25 kg/m<sup>2</sup>, obesidad si resulta superior a 30 kg/m<sup>2</sup>, llegando a ser mórbida si sobrepasa los 40 kg/m<sup>2</sup>. En cuanto al cociente entre el perímetro abdominal y el de la cadera, se considera que la obesidad es androide si el cociente es igual o superior a 0.85.

Otro signo a tener en cuenta en estas pacientes es la *acantosis nigricans*, ya que aparece hasta en un 5% de las mujeres que acuden para la evaluación de hiperandrogenismo (165). La *acantosis nigricans* se caracteriza por la presencia de lesiones verrugosas, aterciopeladas e hiperpigmentadas localizadas en nuca, axila, pliegue submamario y, ocasionalmente, en otros pliegues de la piel. A pesar de ser un marcador específico de resistencia insulínica (RI), su sensibilidad es baja ya que sólo un 30% de las mujeres con RI la presentan (166).

### 1.6.2. Determinaciones hormonales

Estas mediciones son de utilidad en el diagnóstico del hiperandrogenismo analítico y para poder realizar el diagnóstico diferencial con otras patologías.

#### a) Esteroides androgénicos y sus precursores

Existen estudios que sugieren que la testosterona total puede no ser un buen marcador para la detección de exceso de andrógenos en pacientes con SOP. Recientemente se ha observado que el mejor índice en la valoración del hiperandrogenismo analítico es el índice de andrógenos libres [IAL = Testosterona total (nmol/L) x 100/SHBG (nmol/L)], considerándose normal si  $IAL < 4$  (167). Con respecto a la dehidroepiandrosterona-sulfato (DHEA-S), es un esteroide de origen adrenal que puede estar normal o ligeramente elevado en pacientes con SOP, siendo obligado descartar la presencia de una tumoración adrenal en presencia de niveles  $> 800 \mu\text{g/dl}$  ( $21.7 \mu\text{mol/L}$ ) (168). También puede resultar de interés la androstendiona, que se encuentra elevada en el 40% de las mujeres con SOP.

La determinación de 17-hidroxiprogesterona puede ser útil para el diagnóstico diferencial de la Hiperplasia Suprarrenal Congénita (HSC). Niveles en ayunas, tomados a primera hora de la mañana, inferiores a  $200 \text{ ng/dL}$  ( $<6 \text{ nmol/L}$ ) en fase folicular excluye la deficiencia de 21-hidroxilasa. Con niveles  $>200 \text{ ng/dL}$ , valores  $>1.000 \text{ ng/dL}$  a los 30

minutos tras la estimulación con dosis intravenosa de 250 µg de ACTH se confirmaría el diagnóstico de HSC (169).

b) Gonadotropinas y otras hormonas hipofisarias

Hasta un 50% de las pacientes con SOP presentan una LH elevada como consecuencia del incremento en la amplitud y frecuencia de sus pulsos, pero actualmente no se considera criterio diagnóstico. A pesar de que clásicamente se ha considerado que un cociente LH/FSH >2 es sugestivo de SOP, este parámetro está en entredicho actualmente por su baja sensibilidad y especificidad (170). Este patrón de secreción de hormonas debe ayudarnos a hacer el diagnóstico diferencial con la amenorrea de origen hipotalámico, caracterizada por déficit de FSH, LH y bajos niveles de estradiol.

Hasta una cuarta parte de las pacientes con SOP presentan hiperprolactinemias leves, que se atribuyen al efecto conjunto del hiperestronismo y de las alteraciones presentes a nivel hipotalámico (dopamina, opiáceos endógenos, etc.). Al ser secundaria, la asociación de SOP e hiperprolactinemia leve no requiere estudios alternativos (resonancia magnética nuclear) y el tratamiento del hiperandrogenismo suele acompañarse de una normalización de las concentraciones de PRL. En cuanto al hipotiroidismo, hay que destacar que los niveles elevados de TSH pueden asociarse a hiperprolactinemias leves por inhibición de la acción dopaminérgica (171, 172).

### **1.6.3. Ecografía**

La ecografía como método diagnóstico del SOP se ha cuestionado durante muchos años por parte de algunos profesionales, debido al elevado porcentaje de falsos positivos (hasta un tercio de mujeres sanas tienen un ovario ecográficamente poliquístico), y negativos (sólo el 70% de las pacientes con SOP presentan una ecografía acorde) (173).

Según los criterios actuales, el diagnóstico ecográfico de ovario poliquístico se define como la presencia de > 12 folículos entre 2-9 mm de diámetro o un volumen

ovárico superior a 10 mL ( $0.5 \times \text{Longitud} \times \text{Anchura} \times \text{Altura}$ ). Con esta nueva definición se evita utilizar el estroma (anteriormente utilizado para el diagnóstico), que en muchas ocasiones es de difícil valoración, sustituyéndose por el volumen ovárico, que resulta más sencillo. Sólo es necesario que se cumplan estos criterios en uno de los ovarios y no es aplicable a mujeres que toman anticonceptivos hormonales o si se evidencia un folículo dominante ( $>10$  mm) o cuerpo lúteo (9).

#### **1.6.4. Evaluación del grado de resistencia a la insulina.**

El interés en la valoración de las alteraciones del metabolismo glucídico reside en la estrecha relación existente entre éstas y la gravedad y frecuencia de otras alteraciones presentes en mujeres con SOP, tales como las ovulatorias, el hiperandrogenismo y enfermedades cardiovasculares (174).

Existe una gran variedad de pruebas de laboratorio diseñadas con objeto de evaluar el grado de RI. El clamp euglucémico hiperinsulinémico sigue siendo la prueba “patrón oro” para el diagnóstico de la RI, pero de poca aplicación práctica debido a su gran complejidad. Por este motivo, se propone utilizar el cociente entre la glucemia y la insulina basales como método de cribaje, considerándose que existe una RI con valores  $>4.5$ . Siguiendo esta línea, se han propuesto otros índices, tales como el HOMA [glucosa (mmol/L)  $\times$  insulina ( $\mu\text{UI/mL}$ )/22.5] o el QUICKI [ $1/\log$  insulina ( $\mu\text{UI/mL}$ ) +  $\log$  glucosa (mg/dL)](175).

En cuanto a la valoración de la intolerancia a la glucosa y DMT2 en pacientes con SOP, su diagnóstico debe ser obligatorio en aquellas pacientes obesas o mujeres delgadas con SOP con edad materna avanzada ( $>40$  años), historia personal de diabetes gestacional o con antecedentes familiares de DMT2 (105, 176). El método utilizado para la valoración de la intolerancia a la glucosa es el test de tolerancia oral de glucosa (TTOG) con 75 g de glucosa y medición de glucemias a las 2 horas post-administración. Según la AES, aquellas pacientes con test normal deberían ser reevaluadas cada dos años o antes si se identifican factores de riesgo adicionales, mientras que las pacientes con intolerancia a

la glucosa deberían ser revisadas anualmente por el riesgo de desarrollar una DMT2 (177).

### 1.6.5. Diagnóstico del síndrome metabólico

El SOP es una enfermedad multisistémica que lleva asociado hasta en un 40% de los casos la presencia de un síndrome metabólico. Se debe hacer un despistaje precoz de dicho síndrome en todas aquellas pacientes con IMC > 27 kg/m<sup>2</sup> y en mujeres delgadas con RI o cuando tengan antecedentes familiares de diabetes mellitus. Actualmente se considera que el diagnóstico de síndrome metabólico está presente cuando se cumplen tres de los siguientes cinco criterios (9):

- Obesidad abdominal, con cintura > 88 cm.
- Determinación de triglicéridos séricos > 150 mg/dL.
- Determinación de colesterol-HDL sérico < 50 mg/dL.
- Presión arterial > 135/85.
- Glucosa en ayunas entre 110-125 mg/dL o a las 2 horas tras tolerancia oral de glucosa de 140-199 mg/dL.

## 1.7. TRATAMIENTO

### 1.7.1. Tratamiento de las irregularidades menstruales

El tratamiento de las irregularidades menstruales se hace necesario, no sólo para evitar las molestias que puedan ocasionar a las pacientes, sino por llevar asociado un riesgo tres veces mayor de desarrollar un carcinoma endometrial (178). El uso cíclico de progestágenos o de anticonceptivos a bajas dosis con estrógeno y progestágeno pueden ayudar a inhibir la proliferación endometrial (179).

El uso de **anticonceptivos hormonales orales (ACHO)** de baja dosis es altamente eficaz para reestablecer la normalidad de los ciclos menstruales, siendo la

primera opción de tratamiento hoy en día para mejorar la regularidad menstrual (180). Aunque las formulaciones actuales son más seguras que las antiguas, es necesario hacer una valoración individualizada antes de su indicación debido a su potencial efecto negativo sobre la sensibilidad a la insulina (181). Los ACHO no deberían ser indicados en aquellas pacientes con historia de trombosis venosa profunda o estados de hipercoagulabilidad ni en pacientes fumadoras de más de 35 años. Por último, es necesario una evaluación del perfil lipídico en ayunas antes del comienzo del tratamiento, ya que los ACHO pueden empeorar la hipertrigliceridemia.

Para aquellas pacientes que no deseen reglar todos los meses, la privación periódica con **progestágeno** puede ser una alternativa. El tratamiento durante 7-10 días con 10 mg diarios de medroxiprogesterona cada tres meses puede resultar en cuatro menstruaciones al año. Una ventaja de este tratamiento es que la paciente puede planear su ciclo, teniendo en cuenta que la menstruación tendrá lugar aproximadamente una semana después de finalizado el tratamiento.

Por último, la **pérdida de peso** guarda una estrecha relación con la regularidad de los ciclos menstruales. *Kiddy y col.* demostraron que una pérdida de peso de >5% mediante una dieta hipocalórica de 1000 kcal/día durante 6-7 meses es suficiente como para reestablecer la regularidad menstrual hasta en un 80% de los casos (182).

### **1.7.2. Tratamiento médico de los síntomas relacionados con hiperandrogenismo**

Los **ACHO combinados** son el tratamiento de elección para aquellas pacientes con hirsutismo y acné que no desean quedarse embarazadas. Los mecanismos por los que estos fármacos disminuyen los niveles de andrógenos son los siguientes: 1) promueven el *feedback* negativo sobre la producción de LH; 2) disminuyen los niveles circulantes de andrógeno libre al aumentar la producción hepática de SHBG; 3) disminuyen la secreción adrenal de andrógenos; y 4) inhiben la conversión periférica de testosterona en dihidrotestosterona, al mismo tiempo que bloquean la unión de ésta con los receptores androgénicos. Los nuevos ACHO contienen progestágenos con menor actividad

androgénica, tales como noretindrona, desogestrel y norgestimato (179). Otros progestágenos actúan como antagonistas de los receptores androgénicos, tales como el dienogest y la drospirinona, ésta última con actividad antimineralocorticoide. Actualmente, no hay diferencias en cuanto a la eficacia clínica de los distintos ACHO de baja dosis.

La **espirolactona** es una antagonista de la aldosterona que actúa como antiandrógeno al actuar directamente sobre los receptores androgénicos. Este compuesto también inhibe la esteroidogénesis ovárica y adrenal, la actividad 5- $\alpha$ -reductasa y compite por los receptores de andrógenos en los folículos pilosos (179, 180). Se suele administrar a dosis de 25-200 mg al día en una o dos dosis diarias. Teniendo en cuenta que el tratamiento en monoterapia puede ir asociado con irregularidades menstruales y riesgo de feminización en fetos varones, actualmente se recomienda su uso asociado a ACHO. Este fármaco puede producir hiperpotasemia, por lo que su uso debe estar restringido en pacientes con insuficiencia renal.

Otro antiandrógeno que cabe destacar es la **finasterida**, inhibidor competitivo de la 5- $\alpha$ -reductasa, resultando en la inhibición de la conversión de testosterona en dihidrotestosterona y en la disminución de los niveles séricos de dihidrotestosterona. Dado que este medicamento pertenece a la categoría X, las pacientes deben asociarlo al uso de ACHO, combinación que puede ofrecer efectos sinérgicos en el tratamiento del hirsutismo (180). Otros antiandrógenos utilizados para el tratamiento del hirsutismo son la flutamida y el acetato de ciproterona.

La **metformina** y las **tiazolidindionas** son fármacos insulinosensibilizantes que mejoran la RI, y por tanto, efectivos en la reducción de los niveles androgénicos. La reducción del grado de hirsutismo tras estos tratamientos es menor al 20%, significativamente menor que el obtenido con ACHO (183, 184). Hoy en día, el uso de metformina parece que tiene una mejor relación riesgo-beneficio al inducir pérdida de peso, a diferencia de las tiazolidindionas, que inducen una ganancia ponderal secundaria a la retención de líquidos (179). No obstante, es necesario destacar que los fármacos

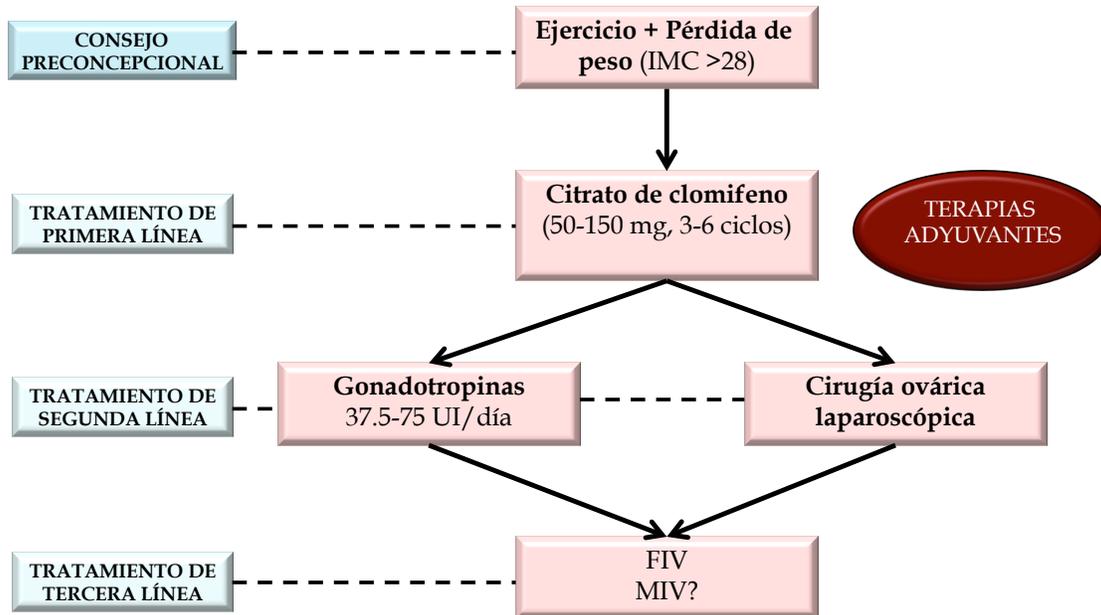
insulinosensibilizantes no deben ser indicados como tratamiento de primera elección para el tratamiento del hirsutismo, a no ser que haya contraindicaciones a otras terapias.

La **eflornitina** es una crema tópica que ha sido aprobada por la *US Food and Drug Administration* para el tratamiento del vello facial no deseado en mujeres (180). La eflornitina inhibe la enzima ornitina descarboxilasa en la piel, la cual inhibe la división celular y las funciones tróficas del pelo, reduciendo de este modo la tasa de crecimiento del mismo. Se debe aplicar dos veces al día, separadas al menos por ocho horas, sobre las zonas afectas de la región facial y barbilla.

### **1.7.3. Tratamiento de la infertilidad**

#### **1.7.3.1. Modificaciones del estilo de vida**

La obesidad está asociada a anovulación (185), abortos (186), y complicaciones durante el embarazo (preeclampsia, diabetes gestacional) (187), así como a un fallo o retraso en la respuesta a varios tratamientos indicado en SOP, tales como la administración de citrato de clomifeno (CC), gonadotropinas y cirugía ovárica laparoscópica. Por tanto, la pérdida de peso es un pilar básico en el tratamiento de estas pacientes, constituyendo el tratamiento de primera línea en pacientes obesas con SOP que buscan embarazo (**Fig. 10**). De hecho, diversos estudios han demostrado que la pérdida de tan solo un 5% del peso se relaciona con una mejora significativa en la tasa de ovulación y de embarazo (182, 188). El tratamiento de la obesidad es multifactorial, incluyendo consejos sobre estilo de vida, dieta y ejercicio, tratamiento farmacológico y cirugía bariátrica (189).



**Figura 10.** Algoritmo propuesto para el tratamiento de la infertilidad en mujeres con SOP. El consejo preconcepcional centrado en las modificaciones del estilo de vida (especialmente pérdida de peso) forma el pilar básico del tratamiento de estas pacientes. El tratamiento de primera línea para la inducción de la ovulación es el CC, recurriendo al uso de gonadotropinas o cirugía ovárica laparoscópica en caso de resistencia o fallo con esta terapia. Por último, el tratamiento de tercera línea lo constituye la FIV.

### 1.7.3.2. Citrato de Clomifeno

El citrato de clomifeno (CC) sigue siendo el tratamiento médico de primera elección para la inducción de la ovulación en mujeres anovuladoras con SOP. Es una medicación con un modo de administración sencillo, de bajo coste, requiere escasa monitorización y está asociada a pocos efectos secundarios. El CC es un fármaco antiestrogénico que bloquea los receptores de estrógenos del hipotálamo, bloqueando el feedback negativo y aumentando, por tanto, la secreción de FSH (190). Las dosis de inicio recomendadas de CC son de 50 mg/día durante 5 días, comenzando entre los 2-5 primeros días de una menstruación espontánea o inducida por progesterona (191). Se debe realizar una monitorización de la respuesta durante el primer ciclo de tratamiento, pudiendo repetir el mismo esquema hasta en seis ciclos posteriores (192). Aproximadamente el 80% de las pacientes con SOP ovulan después del tratamiento con CC (193), siendo la tasa de

embarazo de hasta un 22% por ciclo (194). Se puede repetir este esquema de tratamiento hasta en 6 ciclos, alcanzando unas tasas de gestación acumulada hasta de un 50-60%(195).

### 1.7.3.3. Gonadotropinas

Los protocolos de gonadotropinas a bajas dosis (37.5-75 UI/día) utilizados actualmente tienen como objetivo la inducción de la ovulación al igual que evitar el desarrollo de un número de folículos excesivo, disminuyendo las tasas de gestación múltiple y el riesgo de un síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) (196, 197). Actualmente, el tratamiento con bajas dosis de gonadotropinas representa el tratamiento de segunda línea en pacientes anovuladoras con SOP, distinguiendo dos tipos de protocolos:

- a) Régimen de dosis creciente o *step-up*: Es el más utilizado y consiste en utilizar incrementos de dosis de FSH para determinar el umbral de FSH necesario para el desarrollo folicular. Tras una semana de tratamiento sin respuesta ecográfica, se emplea el menor incremento posible de dosis (37.5 UI o menos) en intervalos de 7 días, hasta alcanzar el desarrollo folicular (198). Las dosis se reducen si el crecimiento folicular es excesivo o los valores de estradiol no son acordes con el crecimiento folicular.
- b) Régimen de dosis decreciente o *step-down*: Es un protocolo que requiere mayor entrenamiento y suele producir un mayor reclutamiento folicular. Consiste en alcanzar el umbral de FSH a través de una dosis de carga inicial (generalmente 100-150 UI) de gonadotropinas, con la subsiguiente reducción de dosis (37.5-50 UI) cada 2-3 días hasta conseguir un crecimiento folicular de 18 mm (199).

Diveros estudios han demostrado que tanto los regímenes *step-up* y *step-down* muestran tasas de desarrollo monofolicular similares (200). Sin embargo, *Christin-Maitrey col.* demostraron que el régimen *step-up* es más seguro y requiere un control

menos estrecho que el requerido para el régimen *step-down* (201). La duración de este tipo de tratamiento no debería ser mayor a seis ciclos ovuladores. En general, los regímenes de baja dosis inducen respuestas monofoliculares en un 70%, con una tasa de embarazo del 20% y una tasa de gestación múltiple del 5.7% (202).

### **1.7.3.4. Cirugía ovárica laparoscópica**

El *drilling* ovárico consiste en la punción ovárica múltiple (entre 4 y 10 punciones) mediante diatermia monopolar o láser, generalmente utilizando un abordaje laparoscópico (203). Este procedimiento está indicado en aquellas pacientes anovuladoras con SOP que presentan resistencia al CC, hipersecreción de LH en ciclo natural o en respuesta a CC, en pacientes a las que se le va a realizar una valoración laparoscópica de la pelvis o en pacientes que presentan problemas físicos para poder ser monitorizadas durante el tratamiento con gonadotropinas. En la actualidad, esta opción terapéutica ha quedado relegada a un segundo plano en mujeres con SOP resistentes a CC, ya que diversos ensayos clínicos han demostrado la ausencia de diferencias significativas en las tasas de embarazo evolutivo y de recién nacido vivo comparado con el tratamiento con gonadotropinas (204-206). Además, de este modo evitamos el potencial riesgo quirúrgico y anestésico de la laparoscopia, al mismo tiempo que minimizamos el riesgo de desarrollar un fallo ovárico prematuro en caso de que el *drilling* ovárico sea muy agresivo.

### **1.7.3.5. Fecundación *in vitro***

La fecundación *in vitro* (FIV) está indicada en aquellas pacientes con SOP que no han respondido a los tratamientos descritos anteriormente, incluyendo la pérdida de peso, tratamiento con CC o gonadotropinas, constituyendo el tratamiento de tercera línea en estas pacientes. Además, en pacientes con patologías asociadas, tales como factor tubárico, endometriosis severa o factor masculino, el tratamiento con FIV sería el tratamiento de elección. En los últimos años, numerosos estudios han propuesto diversos protocolos de estimulación para FIV en mujeres con SOP, incluyendo CC asociado con gonadotropinas menopáusicas humanas (hMG) (207), hMG sola (208), FSH recombinante

sola, protocolo con agonistas de la GnRH asociado a hMG o FSH recombinante, y antagonistas de la GnRH asociado a hMG o FSH recombinante (209). Actualmente, el tratamiento de primera elección en este tipo de pacientes es el protocolo con antagonistas de la GnRH ya que, a pesar de que no existen diferencias en la tasa de embarazo con respecto al protocolo con agonistas de la GnRH, la incidencia de SHO es menor (210, 211).

En un reciente metaanálisis llevado a cabo en mujeres con SOP que se sometieron a un tratamiento de FIV, se ha observado una mayor tasa de cancelación y un mayor número de ovocitos recuperados tras punción ovárica, mientras que no hay diferencias en las tasas de fecundación con respecto a mujeres sanas (212). En cuanto a la tasa de gestación, existen estudios que indican que no existen diferencias entre mujeres con SOP y mujeres sanas (213).

La complicación más importante en mujeres que se someten a FIV es el SHO, motivo que contribuye a una mayor tasa de cancelación en estas pacientes. Brevemente, consiste en una respuesta elevada al tratamiento hormonal, originando un crecimiento ovárico persistente y prolongado, asociado a la acumulación de líquido en las cavidades recubiertas por mesotelio (pelvis y abdomen) secundario a un incremento sérico del factor de crecimiento vascular derivado del endotelio (VEGF) (214). Este riesgo aumentado que presentan las pacientes con SOP de desarrollar un SHO, junto con el patrón ovárico caracterizado por múltiples folículos antrales precoces (accesibles para ser aspirados) las hacen candidatas para la aplicación de la maduración *in vitro* de ovocitos (MIV). No obstante, pese a la seguridad que ofrece, este programa no se utiliza de manera rutinaria por presentar tasas de embarazo menores a las observadas con FIV convencional.

#### **1.7.4. Tratamientos que mejoran la sensibilidad a la insulina**

La **metformina** es una biguanida de administración oral que inhibe la producción hepática de glucosa sin provocar hipoglucemia en pacientes normoglucémicas, ya que

incrementan el número de receptores sin incrementar la secreción de insulina (215). Además, este fármaco mejora el perfil glucémico disminuyendo la absorción intestinal de la glucosa, potenciando la acción de la insulina sobre los tejidos periféricos e inhibiendo la gluconeogénesis y glucogenólisis hepática. Aparte de su acción hipoglucemiante, la metformina presenta propiedades antiaterogénicas, ejerciendo efectos cardiovasculares favorables al reducir complicaciones macrovasculares en obesos y diabéticos tipo II (216). Las dosis recomendadas de metformina oscilan entre 1.500 y 2.350 mg/día, aconsejando incrementos de dosis de modo paulatino. En cuanto a su uso como agente inductor de la ovulación, *Legro y col.* llevaron a cabo un ensayo clínico en el que compararon el tratamiento con metformina con el CC, demostrando que el grupo tratado con metformina presentaba menores tasas de embarazo que el grupo tratado con CC (192). Además, no se observó un claro beneficio al asociar metformina al tratamiento con CC solo, siendo dudoso el papel de dicha asociación en mujeres con IMC > 35 kg/m<sup>2</sup> y en aquellas con resistencia al CC. No obstante, la evidencia actual indica que el uso de la metformina en pacientes con SOP debería restringirse a aquellas pacientes con intolerancia a la glucosa (217).

Las **tiazolidindionas** (rosiglitazona y pioglitazona), agonistas selectivos del peroxisoma proliferador-activado de receptor gamma (PPAR $\gamma$ ), son compuestos que mejoran la sensibilidad a la insulina en tejidos periféricos y ejercen efectos beneficiosos en la presión arterial, en la función endotelial y reducen la inflamación sistémica (218). Sin embargo, el uso de estos medicamentos está asociado a un incremento de peso, mientras que sus efectos en el tratamiento de la dislipidemia asociada a SOP han resultado ser decepcionantes (219). Además, existen estudios que sugieren un riesgo a largo plazo con el uso prolongado de esta medicación (219), por lo que hoy en día no parecen tener un papel relevante en el tratamiento de mujeres con SOP.

El **D-chiro-inositol** es un agente insulinosensibilizante de reciente comercialización que disminuye la testosterona libre y aumenta la SHBG, mejorando de este modo el perfil hormonal y metabólico de las pacientes con SOP (220). Diversos estudios han demostrado que dosis de inositol de 2 g/12 horas son suficientes como para mejorar las

tasas de ovulación y la regularidad de los ciclos menstruales (221, 222), aunque no se haya observado una mejora en las tasas de embarazo (223).

### 1.7.5. Otras terapias adyuvantes

Las terapias existentes hoy en día para el tratamiento del SOP presentan algunas limitaciones, no existiendo ninguna medicación capaz de mejorar la totalidad del espectro metabólico y endocrino de este tipo de pacientes. Por tanto, se hace necesario la búsqueda de terapias adyuvantes en el tratamiento de mujeres con SOP que sean simples, seguras, eficaces a largo plazo y con un buen perfil de tolerancia.

La **acarbosa** es un complejo oligosacárido que inhibe competitiva y reversiblemente la  $\alpha$ -glucosidasa, disminuyendo de este modo la digestión de polisacáridos, la absorción de glucosa y los niveles postprandiales de insulina (219). Sin embargo, los datos clínicos existentes sobre el efecto de la acarbosa en el perfil metabólico de mujeres con SOP son limitados y controvertidos (224, 225).

Las **estatinas**, inhibidores competitivos y reversibles de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A (HMG-CoA) reductasa, son compuestos eficaces en la mejora del perfil lipídico y cardiovascular en pacientes con SOP. Sin embargo, sus efectos secundarios (226), su potencial riesgo teratogénico (227), y su dudoso papel sobre el metabolismo glucídico las han puesto en entredicho (228).

La **naltrexona**, antagonista competitivo no selectivo de los receptores opiodes, reduce el apetito y ejerce profundos efectos en la liberación de la insulina (229).

Otras terapias, tales como el **orlistat** y la **vitamina D** mejoran la sensibilidad a la insulina, pero sus efectos en los perfiles lipídicos todavía permanecen sin ser esclarecidos (230, 231). En la actualidad, existe un gran interés por el estudio de algunas **terapias naturales** para el tratamiento de SOP, tales como el aceite de semilla de lino, vitex o resveratrol.

## 2. RESVERATROL

### 2.1. INTRODUCCIÓN

El resveratrol (3,5,4'-trihidroxistilbeno) es un polifenol natural, perteneciente al grupo de los estilbenos, sintetizado por más de 70 especies de plantas en respuesta al estrés biótico y abiótico, como pueden ser diversos tratamientos químicos, exposición a radiación ultravioleta e infecciones fúngicas. Este fitoestrógeno presenta propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y proapoptóticas, y ha cobrado importancia durante la última década por presentar efectos neuro y cardioprotectores, así como por su potencial efecto beneficioso en el tratamiento de varios tipos de cáncer (232-236).

El resveratrol fue identificado por primera vez en 1940 en la raíz del eléboro blanco (*Veratrum Grandiflorum O. Loes*) y más tarde en raíces secas de *Poligonum Cuspidatum*, siendo esta última una de las fuentes más ricas de resveratrol (237, 238). En 1976 se descubrió su existencia en la vid (*Vitis vinifera*), siendo el vino tinto la principal fuente alimentaria de resveratrol (239). Además, este bioflavonoide está presente en las partes leñosas del pino, en los frutos secos (nueces, cacahuetes), en las moras y en otros frutos silvestres.

La cantidad de resveratrol en las diferentes fuentes naturales en las que se encuentra es variable y depende de varios factores. En el caso particular de la vid, la piel de uva fresca contiene de 50 a 100 µg/g de *trans*-resveratrol. Durante el proceso de maceración de la uva, el resveratrol es liberado de la piel de la uva, pasando a estar presente en el vino. A lo largo de todo este proceso se produce mayor concentración de *trans*-resveratrol que *cis*-resveratrol, teniendo lugar una conversión de *trans* a *cis* cuando el vino está expuesto a la luz y al oxígeno (240). Se estima que el contenido de resveratrol en el vino tinto es de hasta 5 mg/L. No obstante, esta cifra varía en función de la variedad de uva, del tipo de cultivo, origen geográfico, condiciones climáticas y prácticas enológicas, entre otras (241).

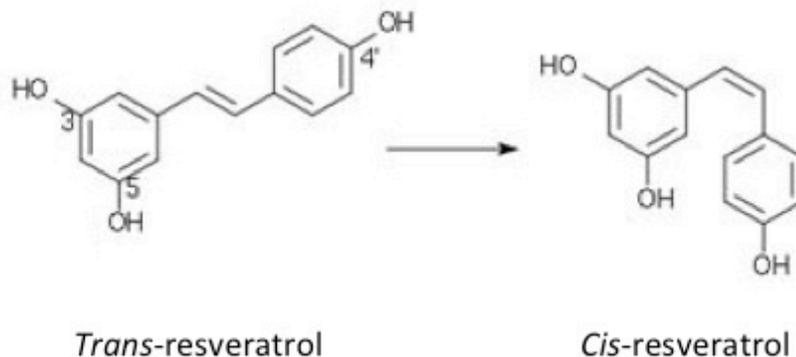
Por último, cabe destacar que el resveratrol puede también administrarse en forma de suplemento dietético, oscilando la dosis de los distintos preparados que existen en el mercado en la actualidad entre 8 mg y 1 g por gragea. Los suplementos de resveratrol varían en pureza, y pueden contener desde un 50% hasta un 99% de la sustancia. Como suplemento nutricional lo podemos encontrar como extracto de *Polygonum cuspidatum*.

## 2.2. NATURALEZA QUÍMICA

Entre los polifenoles más estudiados en los últimos años destacan los estilbenos. En la actualidad se conocen hasta 30 estilbenoides y estilben-glucósidos, que se encuentran distribuidos en diversas especies del reino vegetal, siendo el resveratrol uno de los estilbenos más abundantes.

Desde el punto de vista químico, resveratrol presenta un esqueleto estructural que consta de un puente vinílico (esqueleto estilbenoide), que sirve de unión entre los dos anillos aromáticos que presenta en su estructura. Además, la molécula de resveratrol contiene tres grupos hidroxilo fenólicos responsables de su alto potencial antioxidante. Esta estructura tan peculiar hace posible que resveratrol pueda sufrir reacciones reversibles de isomerización *cis/trans*, ciclaciones y dimerizaciones. De hecho, esta fitoalexina presenta dos isómeros geométricos (*cis* y *trans*) que aparecen de forma natural en la naturaleza, siendo generalmente el *trans*, la forma predominante y activa.

En general, los polifenoles son muy fotosensibles a la luz solar, se oxidan fácilmente en presencia de oxígeno, se descomponen a altas temperaturas y no son muy estables frente a variaciones de pH (**Fig. 11**). La exposición del *trans*-resveratrol a luz UV, a temperatura ambiente y en presencia de oxígeno, produce una transformación muy rápida de *trans*-a *cis*-resveratrol, perdiendo su actividad biológica (242).



**Figura 11.** Estructura química del resveratrol. *Trans*-resveratrol es la forma más abundante y activa; la exposición a luz UV, a temperatura ambiente o la presencia de oxígeno, induce una transformación muy rápida de *trans*-a *cis*-resveratrol, perdiendo su actividad biológica.

### 2.3. FARMACOLOGÍA

*Trans*-resveratrol es un compuesto bien tolerado que presenta una alta absorción y una baja biodisponibilidad (243). Estudios farmacocinéticos han demostrado que la concentración plasmática máxima tras la administración de bajas dosis de resveratrol se produce tras 30 minutos, mientras que la ingesta de dosis mayores se traduce en un retraso de dicho pico a 1.5-2 horas (244, 245). Además, las concentraciones de resveratrol son más altas por la mañana y decrecen a lo largo del día, indicando que la farmacocinética de este polifenol está sujeta a variaciones circadianas (246).

Dado su carácter lipofílico, *trans*-resveratrol presenta un gran volumen de distribución. Numerosos estudios en animales han demostrado que este bioflavonoide puede localizarse en órganos tan diversos como el hígado, intestino, cerebro y tejido adiposo (247, 248). Un reciente estudio en pacientes con cáncer de colon ha demostrado que tras la administración de *trans*-resveratrol a dosis de 1g/d durante 8 días, éste pudo concentrarse en tejido tumoral a dosis mayores que las plasmáticas (>600  $\mu$ M), indicando la poca correlación existente entre los valores detectables en plasma y los encontrados en los tejidos (249). Además, resveratrol tiene preferencia por localizarse en el hemicuerpo derecho (ciego, colon ascendente y ángulo hepático del colon) frente al hemicuerpo

izquierdo (ángulo esplénico, colon descendente, sigma y recto), debido a una mayor absorción en esa zona por la presencia de heces más líquidas con mayor cantidad de resveratrol.

Una vez absorbido, *trans*-resveratrol es rápidamente transformado en diversos metabolitos a nivel hepático e intestinal. Este proceso consiste en la conjugación de los grupos fenoles presentes en la molécula parental por moléculas de ácido glucorónico y sulfato, dando lugar a los siguientes compuestos: resveratrol monosulfato, dos isómeros del resveratrol monoglucurónido, dehidroresveratrol monoglucurónido, dehidroresveratrol monosulfato y dehidroresveratrol (250). Tras la ingesta de dosis pequeñas de resveratrol (5 o 50 mg), los derivados glucorónidos son los predominantes, mientras que los monosulfatos son los más abundantes en plasma y orina tras la administración de dosis mayores de resveratrol (>250 mg). Se ha sugerido que a pesar de que la biodisponibilidad sistémica del resveratrol es baja, es posible que se produzca una acumulación de este compuesto en las células epiteliales del tracto digestivo, y por tanto, los metabolitos derivados del resveratrol potencialmente activos puedan aún producir sus efectos beneficiosos una vez que el resveratrol ha sido metabolizado (243, 251).

En cuanto a su eliminación, resveratrol y sus derivados son eliminados a través de orina y heces, lo que explica las altas concentraciones alcanzadas de resveratrol en tejido colorrectal. Cabe destacar que la forma de administración de resveratrol puede influenciar su eliminación; así, por ejemplo, la vida media de resveratrol en su forma micronizada tras ingesta de 5 g es de 1.1 horas (252), mientras que llega a ascender a 8 horas para la misma dosis en su forma no-micronizada (253).

Por último, es importante subrayar que la toxicidad del resveratrol resulta prácticamente nula, no habiéndose observado efectos adversos graves en casos de ingesta alta y prolongada de este compuesto (246). Entre los efectos secundarios más frecuentes destacan el dolor abdominal, náuseas y flatulencia, todos ellos reversibles tras el cese del tratamiento.

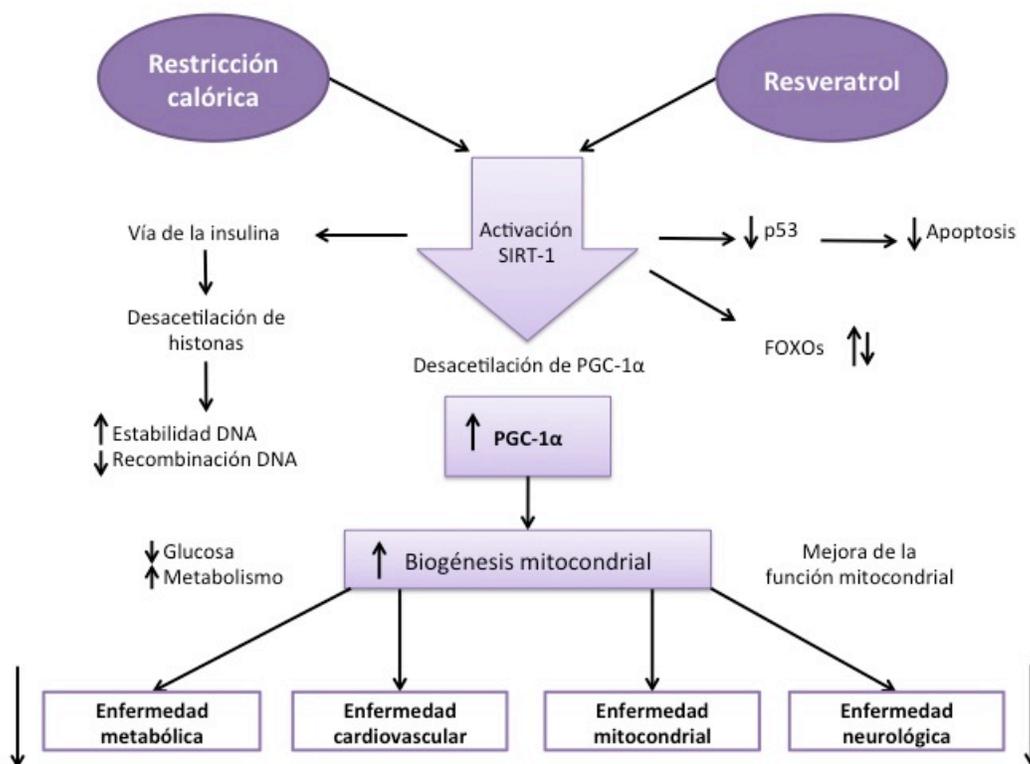
## 2.4. MECANISMO DE ACCIÓN

### 2.4.1. Activación de las sirtuinas

Las sirtuinas, descubiertas por primera vez en la levadura de la cerveza en 1979, son enzimas que intervienen en la regulación del material genético al eliminar ciertos grupos químicos de las histonas (clase III de desacetilasas). Estas enzimas son sintetizadas a partir de los genes denominados SIRT (Reguladores de la información de silenciamiento), localizados en gran cantidad de organismos, desde procariotas (genes denominados Sir2) hasta mamíferos (propriadamente SIRT) (254). En humanos poseemos 7 tipos de genes responsables de la síntesis de estas enzimas, desde SIRT-1 a SIRT-7, con localización diversa: SIRT-2 se encuentra en el citoplasma celular y SIRT-3, 4 y 5 en las mitocondrias. Las sirtuinas están implicadas en múltiples procesos celulares, incluyendo la estabilidad genómica (255), la reparación del DNA (256), silenciamiento génico transcripcional (257), apoptosis mediada por p53 (258), y adipogénesis (259). Dentro del grupo de las sirtuinas, SIRT-1 está relacionada con la reparación del DNA dañado, estando relacionada con el alargamiento de la vida en levaduras, gusanos y moscas (260, 261), sugiriendo que estas enzimas pueden actuar como reguladores universales del envejecimiento.

Resveratrol, activador de SIRT-1, reprime la transcripción génica, mantiene la estabilidad de DNA y alarga la esperanza de vida, efectos similares a los conseguidos en estados metabólicos de restricción calórica. Estos efectos están mediados a través de la desacetilación de histonas (262), proceso basado en la eliminación de grupos acetilo de proteínas en presencia de  $\text{NAD}^+$ , resultando en la producción de O-acetil-ADP-ribosa y nicotinamida (263). Esta actividad desacetiladora de las sirtuinas es especialmente importante en los telómeros, donde las histonas son más vulnerables al estar más acetiladas y, por tanto, las sirtuinas juegan un papel clave al proteger a los telómeros del acortamiento que se produce durante el proceso de envejecimiento.

Además, la activación de las sirtuinas induce la actividad de PGC-1 $\alpha$ , coactivador-1 $\alpha$  del peroxisoma proliferador-activado de receptor gamma (PPAR $\gamma$ ), regulador clave en el control transcripcional de la oxidación lipídica y del metabolismo mitocondrial. A través de la inducción de esta vía, resveratrol ejerce efectos beneficiosos en diversas enfermedades metabólicas, cardiovasculares y neurológicas (264, 265) (Fig.12).



**Figura 12.** Efecto de resveratrol sobre la activación de las sirtuinas. Tanto la restricción calórica como el resveratrol activan la vía de las sirtuinas (SIRT-1), dando lugar a una mayor estabilidad del DNA, silenciamiento génico transcripcional y aumentando la reparación del DNA. Además la activación de las sirtuinas induce la actividad de PGC-1 $\alpha$ , regulador clave en el control transcripcional de la oxidación lipídica y del metabolismo mitocondrial, induciendo efectos beneficiosos en diversas enfermedades metabólicas, caridiovasculares y neurológicas. Adaptado de referencia (266).

### **2.4.2. Inhibición de la vía NF-kappaB**

El factor de transcripción Nuclear Factor (NF)-kappaB juega un papel muy importante en la formación y progresión de tumores (267). NF-kappaB está compuesto por hetero- u homodímeros de proteínas de la familia NF-kappaB/Rel, que intervienen en la dimerización de proteínas, transporte nuclear y unión específica a DNA (268). En la mayoría de células, NF-kappaB es secuestrado en el citoplasma mediante su interacción con proteínas IkappaB (inhibidor de KappaB), permaneciendo de este modo inactivo. Una vez activado el complejo IKK (quinasa de IkappaB), IkappaB se fosforila y es degradado posteriormente por el proteosoma liberando NF-kappaB, que es transportado al núcleo para la transcripción de diversos genes diana, entre los que se encuentran genes antiapoptóticos. Por tanto, la inhibición de NF-kappaB puede ser una potencial terapia adyuvante para combatir procesos oncogénicos (269).

Parte de los efectos antiinflamatorio, antiproliferativo y anticarcinogénico del resveratrol se deben a su capacidad para interferir con la activación de NF-kappaB en respuesta a la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$  (267, 270, 271). Esta propiedad antiinflamatoria del resveratrol está mediada por la inhibición de la actividad quinasa IkappaB inducida por NF-kappaB, fosforilación y translocación nuclear de la subunidad RelA/p65 de NF-kappaB, así como transcripción del gen reportero dependiente de NF-kappaB (270, 271). Además resveratrol también bloquea la activación de NF-kappaB inducida por otros factores, tales como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lipopolisacárido, ceramida y ácido okadaico (271).

### **2.4.3. Inhibición de la vía PI3K/AKT**

La vía de señalización de la PI3K/AKT es crucial en numerosos aspectos del crecimiento y supervivencia celular. La vía de la PI3K es estimulada fisiológicamente como consecuencia de la activación de receptores de membrana tirosina quinasa, los cuales sufren procesos de autofosforilación, reclutando PI3K a la membrana plasmática, donde finalmente se activa AKT tras una secuencia de generación de fosfolípidos que

actúan como segundos mensajeros (272). Una vez activada, AKT regula gran cantidad de vías de señalización celular que intervienen en procesos tales como la proliferación celular, apoptosis, metabolismo glucídico o angiogénesis (273).

Resveratrol es un compuesto que puede interferir con la vía de señalización celular PI3K/AKT. En células epidérmicas JB6, se ha observado cómo derivados del resveratrol son capaces de bloquear la activación de PI3K y AKT inducida por factor de crecimiento epidérmico (EGF) (274). De modo similar, resveratrol bloqueó la activación de PI3K y, por tanto, la supervivencia y proliferación de células humanas de cáncer de mama sensibles a estrógenos (275). Por tanto, resveratrol ejerce efectos antiproliferativos debidos, al menos en parte, a la inhibición de la vía PI3K/AKT.

#### **2.4.4. Inhibición de la ciclooxigenasa**

Las prostaglandina H<sub>2</sub> sintasas, COX-1 y COX-2, intervienen en los primeros pasos de la síntesis de prostaglandinas (PGs), mediadores locales de la homeostasis vascular. Por ejemplo, tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) es un potente vasoconstrictor y un proagregante plaquetario sintetizado en plaquetas, mientras que la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) es un antiagregante plaquetario y potente vasodilatador sintetizado en las células endoteliales. La homeostasis vascular es el resultado del equilibrio dinámico entre TxA<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub>, ya que tienen acciones opuestas. Alteraciones en esta relación pueden explicar diversas situaciones patológicas, tales como la aparición de trombosis (276, 277).

Resveratrol ejerce acciones antiinflamatorias y antiagregantes a través de la inhibición de la prostaglandina H<sub>2</sub> sintasa (COX-1 y COX-2). Este bioflavonoide es un potente inhibidor de las actividades ciclooxigenasa y peroxidasa de COX-1, promoviendo el flujo sanguíneo y disminuyendo la formación de trombos. En cambio, resveratrol ejerce una inhibición débil en la actividad peroxidasa de COX-2 (278). El mecanismo mediante el cual resveratrol inhibe selectivamente ambas reacciones de COX-1 es todavía desconocido.

#### **2.4.5. Acción sobre el metabolismo del óxido nítrico**

Las alteraciones en la función endotelial pueden contribuir al desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Estudios previos han demostrado cómo resveratrol aumenta la biodisponibilidad del óxido nítrico al inhibir la actividad NADH/NADPH oxidasa, aumentando, por tanto, la vasodilatación dependiente de endotelio (279). Además, en un modelo animal *in vivo*, resveratrol aumenta la expresión de las variantes endotelial (eNOS) e inducible (iNOS) de la óxido nítrico sintasa, lo cual podría contribuir a la cardioprotección mediada por resveratrol (280). En humanos, se ha visto cómo el consumo regular de este bioflavonoide aumenta de manera dosis-dependiente la dilatación de la arteria humeral mediada por flujo en mayor medida que otros nutrientes vasoactivos.

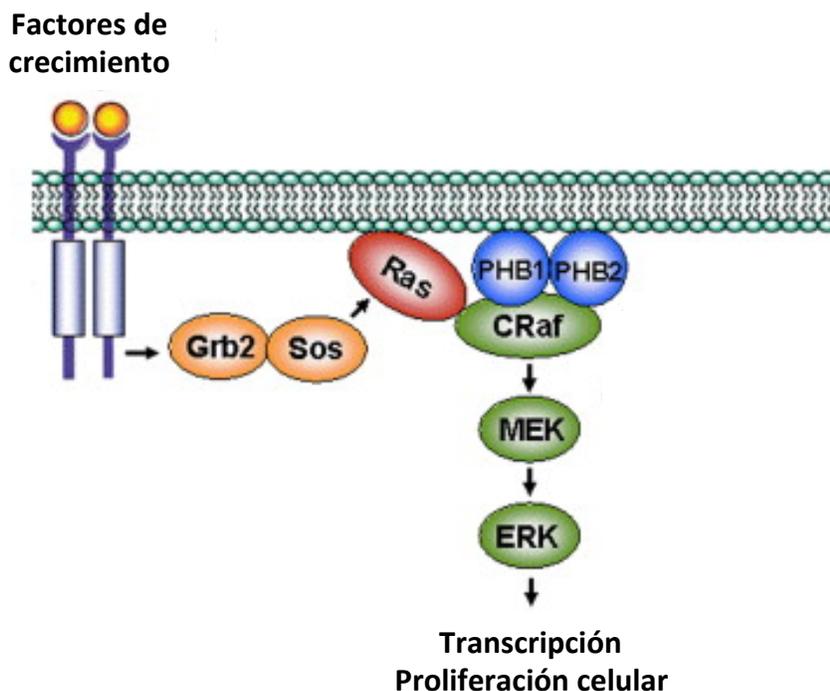
#### **2.4.6. Inhibición de la peroxidación de lípidos**

La oxidación de proteínas de baja densidad (LDL) es un marcador aterogénico que está directamente asociada a la probabilidad de sufrir enfermedades coronarias e infarto de miocardio (281). *In vivo*, resveratrol inhibe la peroxidación de LDL y mejora la homeostasis del colesterol (282). Siguiendo esta línea de investigación, en un ensayo clínico randomizado llevado a cabo por *Tomé-Carneiro y col.*, el consumo diario de 8 mg de resveratrol durante 6 meses resultó en una reducción en la oxidación de LDL y otros lípidos séricos, destacando su papel en la prevención primaria de enfermedades cardiovasculares (283).

#### **2.4.7. Inhibición de la vía del mevalonato**

La vía del mevalonato es una importante vía metabólica responsable de la biosíntesis del colesterol, cuyo paso limitante es la conversión de acetil-CoA a ácido mevalónico por parte de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa (HMGCR). Esta ruta metabólica proporciona a las células diversas moléculas, tales como colesterol, coenzima Q, dolicol y sustratos de la isoprenilación [farnesil

pirofosfato (FPP) y geranylgeranyl pirofosfato (GGPP)], todos ellos compuestos que juegan un papel crucial en diversas funciones celulares, tales como integridad de membrana, homeostasis celular y la isoprenilación de proteínas (284).

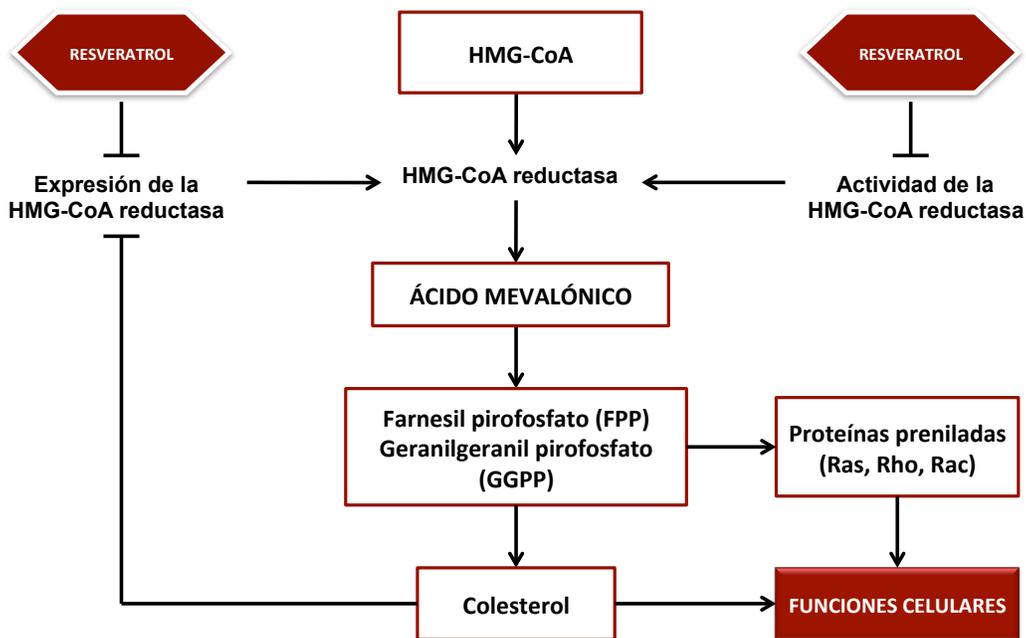


**Figura 13.** Vía de señalización de Ras-Raf-Erk1/2. Una vez que la proteína Ras asociada a la membrana es activada, recluta a la serina/treonina quinasa Raf y facilita su activación. Posteriormente, Raf fosforila y estimula la quinasa MEK, resultando en la fosforilación y activación de la quinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (Erk1/2). Adaptada de referencia (285).

La isoprenilación consiste en la incorporación de un grupo lipofílico FPP (farnesilación) o GGPP (geranyl-geranilación) al extremo carboxilo terminal de las proteínas, regulando de este modo la función de múltiples guanosinas trifosfatasa de pequeño tamaño, tales como la proteína Ras (**Fig. 13**). Una vez que esta GTPasa asociada a la membrana es activada, recluta a la serina/treonina quinasa Raf y facilita su activación. Posteriormente, Raf fosforila y estimula la quinasa MEK, que de hecho posee actividad de serina/treonina quinasa y tirosina quinasa, resultando en la fosforilación y activación de la quinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (Erk1/2). La vía de señalización

Ras-Raf-Erk1/2 regula una gran variedad de eventos intracelulares, incluyendo proliferación, diferenciación, respuesta al estrés, apoptosis y esteroidogénesis (286).

Previamente, *Wong y col.* demostraron por primera vez en un estudio *in vitro* que el resveratrol reduce la expresión y la actividad de HMGCR (enzima limitante de la vía del mevalonato) e inhibe la síntesis de colesterol (284). Además, similares efectos del resveratrol fueron observados en un estudio *in vitro* con células endometriales estromales de voluntarias sanas (287). Estos hallazgos también se han observado en modelos *in vivo*. En un trabajo previo realizado en hamsters, el resveratrol disminuyó el colesterol sérico y redujo tanto la expresión de mRNA como la actividad de HMGCR (288).



**Figura 14.** Vía del mevalonato. Resveratrol inhibe la expresión y la actividad de la HMG-CoA reductasa. Farnesil pirofosfato (FPP) y geranilgeranil pirofosfato (GGPP) se forman a partir del ácido mevalónico y mediante la prenilación de proteínas intervienen en multitud de funciones celulares. El colesterol inhibe la expresión de HMGCR. Adaptado de referencia (284).

Por tanto, podemos decir que resveratrol inhibe el paso limitante de la vía del mevalonato, reduciendo tanto la expresión como la actividad de HMGCR. Esta inhibición hace que los efectos de resveratrol puedan estar relacionados con una menor disponibilidad de los productos finales de esta vía metabólica, incluyendo FPP, GGPP, así como de colesterol, interfiriendo, por tanto, en múltiples funciones celulares.

## 2.5. FUNCIONES DEL RESVERATROL

En la última década, el tratamiento con resveratrol ha cobrado importancia debido a los potenciales efectos beneficiosos que puede tener sobre la salud humana. A continuación se detallan los beneficios más importantes de este compuesto a distintos niveles:

### 2.5.1. Antienvejecimiento

La restricción calórica puede retrasar el envejecimiento y la aparición de ciertas enfermedades relacionadas con la edad. El resveratrol, a través de la activación de las sirtuinas, es capaz de inducir un estado de mínimo consumo energético similar al creado en la restricción calórica, poniendo en marcha procesos metabólicos adaptativos relacionados con una menor incidencia de enfermedades metabólicas y una prolongación de la esperanza de vida (289, 290).

En *Saccharomyces cerevisiae* la sobreexpresión de Sir2 provoca un alargamiento de la vida de la levadura de un 30%. Una reducción de la alimentación de la levadura provoca un efecto similar a este, ya que produce un incremento de la actividad de Sir2. Por otra parte, eliminando el gen Sir2, se anula el alargamiento de la vida provocado por la restricción calórica (291). Ese efecto también se ha observado en estudios llevados a cabo con *Caenorhabditis elegans* y *drosophila melanogaster* (292).

### **2.5.2. Resveratrol y cáncer**

El resveratrol se ha mostrado eficaz en el tratamiento de diversos cánceres humanos al ser un compuesto activo frente a las tres principales etapas en el proceso de carcinogénesis: iniciación, promoción y progresión (293). El resveratrol resulta activo frente al cáncer de pulmón (294), colon (295), mama (296), estómago (297), piel (298), tiroides (299), próstata (300), páncreas (301), leucemia (302), hígado (303), y ovario (304). Tanto es así, que se ha discutido su uso en terapia combinada con fármacos citotóxicos o quimioterápicos para la prevención del cáncer (305).

Los mecanismos de acción por los que el resveratrol ejerce su efecto quimiopreventivo son complejos y variados. Se ha comprobado que resveratrol inhibe la proliferación de las células neoplásicas secundario al bloqueo del ciclo celular (306), induce la activación de las vías que conducen a la apoptosis en determinadas líneas celulares cancerogénicas (296), e inhibe la angiogénesis y las metaloproteinasas de la matriz que facilitan la invasión tumoral a los tejido (307). De este modo, resveratrol formaría parte del grupo de componentes de la dieta que pueden regular el ciclo celular y contribuir a la prevención del cáncer.

### **2.5.3. Efecto cardioprotector**

Clásicamente, el resveratrol ha sido propuesto como uno de los agentes causales de la *Paradoja Francesa*, término utilizado para describir la observación de que la población francesa presenta menor incidencia de enfermedades cardiovasculares a pesar de seguir una dieta rica en grasas saturadas, debido al alto consumo de vino tinto rico en este compuesto (308). Esta teoría está apoyada por el hecho de que la presencia de altos niveles de metabolitos de resveratrol en orina se han relacionado con una menor prevalencia de factores de riesgo cardiovascular en pacientes de alto riesgo (309). Se han descrito distintos mecanismos por los que resveratrol podría ejercer este efecto cardioprotector, tales como la inhibición de la agregación plaquetaria (310), producción

de óxido nítrico y su efecto antioxidante (280), aumento del colesterol HDL y disminución de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (283).

El resveratrol también parece ejercer un efecto cardioprotector interviniendo en procesos de remodelamiento vascular. El daño miocárdico por isquemia-reperfusión tras sufrir un infarto de miocardio es una causa importante de morbi-mortalidad en los países desarrollados. En un modelo murino de infarto de miocardio, resveratrol consiguió mejorar la funcionalidad cardíaca tras la inducción experimental de un daño por isquemia-reperfusión, reduciendo de este modo tanto la isquemia cardíaca como el tamaño del infarto (311). Este efecto cardioprotector de resveratrol también se ha observado en otros modelos animales (312, 313). En muestras de tejido cardíaco humano, este potente antioxidante inhibió significativamente la apoptosis secundaria al daño miocárdico por isquemia-reperfusión, confirmando la relevancia clínica de este compuesto en la prevención y tratamiento de procesos cardiovasculares (314).

#### **2.5.4. Efecto neuroprotector**

Varios estudios en modelos animales sugieren que resveratrol ejerce un efecto neuroprotector, debido principalmente a sus acciones antiinflamatorias (315), antioxidantes (316), y antiapoptóticas (317). Estas propiedades han hecho que este fitoestrógeno haya suscitado interés en el tratamiento de trastornos isquémicos vasculares y en la prevención de diversas enfermedades neurodegenerativas.

El resveratrol previene la agregación de placas de  $\beta$ -amiloides que tiene lugar en la Enfermedad de Alzheimer (318). Esta neuroprotección inducida por resveratrol es mediada, mayoritariamente, a través de la activación de SIRT-1, protegiendo a las neuronas frente al efecto deletéreo inducido por radicales libres de oxígeno, peróxidos, péptidos  $\beta$ -amiloides y otros agentes nocivos que están presentes en la fisiopatología de la dicha enfermedad (319). Además, la expresión de SIRT-1 inducida por resveratrol inhibe las actividades proapoptóticas de las proteínas FOXO (317), al mismo tiempo que inhibe la vía NF- $\kappa$ B en microglía y astrocitos, resultando en una protección contra la

toxicidad inducida por el  $\beta$ -amiloide (320). Por último, el resveratrol también ejerce efectos beneficiosos en otras enfermedades degenerativas, tales como la enfermedad de Parkinson (321), Corea de Huntington (322), y Esclerosis Lateral Amiotrófica (323).

#### **2.5.5. Efecto del resveratrol en el metabolismo de la glucosa**

En los últimos años, numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* llevados a cabo en roedores han demostrado los efectos beneficiosos del resveratrol en el metabolismo de la glucosa, incluyendo la DM. El tratamiento de esta compleja enfermedad metabólica se basa principalmente en tres aspectos: reducción de los niveles de glucosa, preservación de las células  $\beta$  y mejora de la acción de la insulina (en el caso de la DMT2). Estudios recientes indican que resveratrol puede ejercer efectos beneficiosos en la diabetes al actuar, precisamente, a estos tres niveles.

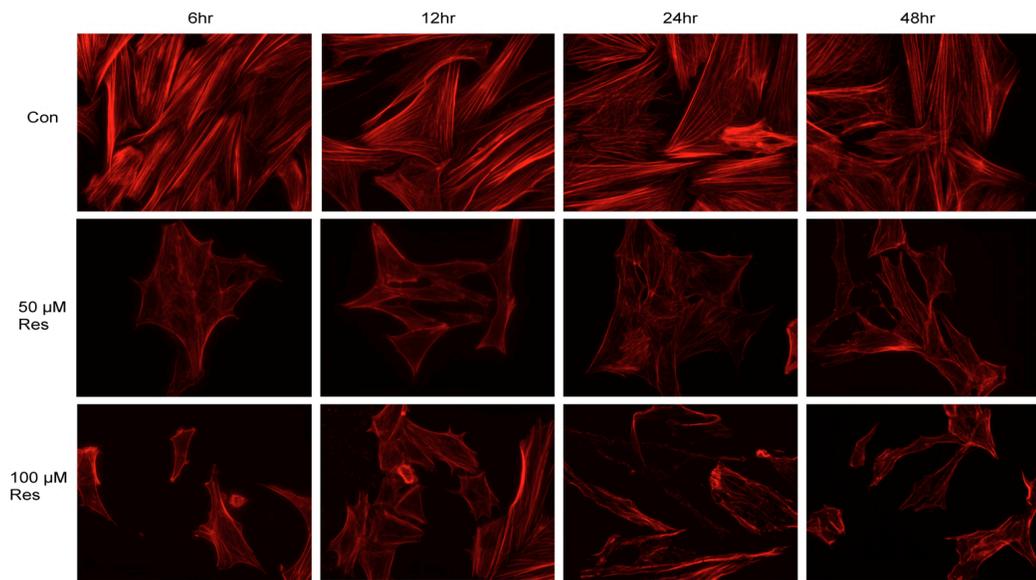
En primer lugar, numerosos estudios han demostrado el efecto antihiper glucemiante del resveratrol en modelos experimentales de diabetes (324-326), resultando en niveles disminuidos de hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1C</sub>), lo cual refleja una reducción prolongada de la glucemia (327). Este efecto antihiper glucemiante del resveratrol parece estar relacionado con una mayor expresión del transportador de glucosa dependiente de insulina, GLUT4 (328, 329). En segundo lugar, resveratrol contribuye a la preservación de las células  $\beta$  mediante la disminución de los niveles séricos de insulina (330-332), inhibición de la acción de las citoquinas inflamatorias (327) y reducción de los radicales libres de oxígeno (327). Por último, resveratrol reduce la RI asociada a la DMT2, mejorando la acción de la insulina en los tejidos diana (333). Estos estudios ponen de manifiesto las acciones pleiotrópicas del resveratrol en el metabolismo glucídico, indicando la relevancia clínica de este compuesto solo o en combinación con otras terapias en la prevención y tratamiento de la diabetes.

### 2.5.6. Efecto del resveratrol en el ovario

El resveratrol es un fitoestrógeno que tiene la capacidad de unirse a los receptores estrogénicos (ERs), subtipos ER- $\alpha$  y ER- $\beta$ , ejerciendo efectos biológicos similares a los inducidos por los estrógenos endógenos y sintéticos (334). Mientras que la mayoría de fitoestrógenos se unen preferentemente a ER- $\beta$ , resveratrol se une con igual afinidad a ER- $\alpha$  y ER- $\beta$ , siendo esta afinidad por los receptores menor que la que presentan la mayoría de fitoestrógenos (335-337). De este modo, resveratrol parece actuar como un modulador selectivo de los receptores estrogénicos (SERM), cuya acción mixta agonista/antagonista depende de la disponibilidad de isoformas de ER en los tejidos, tipo celular, tiempo de exposición y sexo del individuo (338).

En los últimos años se han publicado estudios para evaluar el efecto del resveratrol en la fisiopatología de SOP. En un estudio *in vitro* llevado a cabo en células teca intersticiales (TI) de la rata, resveratrol ejerció un efecto proapoptótico, reflejado por un aumento en la actividad de las caspasas efectoras 3 y 7 así como por la inducción de cambios morfológicos compatibles con apoptosis (**Fig. 15**). Además, resveratrol contrarrestó los efectos pro-proliferativos y anti-apoptóticos de la insulina en este tipo celular (235). En otro estudio en roedores, resveratrol potenció el efecto inhibitorio de la sinvastatina en la síntesis de DNA en células teca intersticiales, y esta inhibición fue secundaria a una inhibición tanto en la actividad como en la expresión de la HMGCR en la vía del mevalonato (284).

*In vivo*, en un modelo experimental de SOP inducido con dihidrotestosterona, el tratamiento con resveratrol a dosis de 400 mg/kg durante 5-6 semanas disminuyó la adiposidad y mejoró la ciclicidad estral en ratas-SOP previamente acíclicas, no ejerciendo efecto alguno sobre la sensibilidad a la insulina (339). A la luz de estos resultados, y siendo evidente un potencial efecto beneficioso en diversas manifestaciones clínicas del SOP, se hacen necesarios más estudios para conocer a fondo el efecto del resveratrol en la función de las células de la teca y de la granulosa.



**Figura 15.** Efecto del resveratrol en la morfología de las células teca intersticiales de la rata. El resveratrol induce cambios morfológicos compatibles con apoptosis, tales como el encogimiento celular y la pérdida de integridad ultraestructural de las organelas, de un modo dosis- y tiempo-dependiente. Con: control. Res: resveratrol. Adaptado de referencia (235).

**CAPÍTULO II.**  
**HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## **HIPÓTESIS DEL TRABAJO:**

### **SUBESTUDIO I:**

El resveratrol ejerce un importante efecto en la función de las células TI, inhibiendo tanto la expresión génica de las principales proteínas y enzimas implicados en la esteroidogénesis ovárica, como la producción de hormonas esteroideas.

### **SUBESTUDIO II:**

El resveratrol ejerce un modesto efecto citostático, pero no citotóxico, en las células de la granulosa, contribuyendo al mantenimiento de la integridad y función de este compartimento celular.

## **OBJETIVOS:**

### **SUBESTUDIO I:**

1. Determinar *in vitro* el efecto del resveratrol en la expresión génica de las principales proteínas y enzimas implicadas en la esteroidogénesis de las células TI de la rata.
2. Determinar *in vitro* el efecto del resveratrol en la producción de hormonas esteroideas en células TI de la rata.
3. Determinar *in vitro* el efecto de los intermediarios isopropanoides (GGPP y FPP) sobre la regulación del resveratrol en la esteroidogénesis de las células TI de la rata.
4. Determinar *in vitro* el efecto de los inhibidores de las sirtuinas sobre la regulación del resveratrol en la esteroidogénesis de las células TI de la rata.
5. Determinar *in vitro* el efecto de la vía de la Akt/PKB en la esteroidogénesis de las células TI de la rata, y su papel sobre la regulación del resveratrol en la esteroidogénesis de las células TI de la rata.

**SUBESTUDIO II:**

1. Estudio *in vitro* del efecto del resveratrol en la proliferación celular de las células de la granulosa.
2. Estudio *in vitro* del efecto del resveratrol en la viabilidad celular de las células de la granulosa.
3. Estudio *in vitro* del efecto del resveratrol en la apoptosis de las células de la granulosa mediante la determinación de la activación de las caspasas y la morfología celular.
4. Estudio *in vitro* del efecto del resveratrol en la esteroidogénesis de las células de la granulosa.
5. Estudio *in vitro* del efecto del resveratrol en la expresión génica y proteica de AMH en las células de la granulosa.
6. Estudio *in vitro* del efecto del resveratrol en la expresión génica y proteica de VEGF en las células de la granulosa.

**CAPÍTULO III.**  
**MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. ANIMALES Y ALOJAMIENTO

Los animales utilizados en los diferentes protocolos experimentales fueron ratas albinas hembras, de la cepa Sprague-Dawley, con un peso comprendido entre 45 y 50 g y adquiridas a la edad de 22 días en una granja multiplicadora (Charles River Laboratories, Wilmington, MA). Las ratas se alojaron en el animalario correspondiente al Departamento de Obstetricia y Ginecología de la Universidad de California Davis (UCD), dispuestas en grupos de tres por jaula, permitiéndoles libre acceso de agua y comida (comida estándar para ratas de laboratorio, Lab Diet 5001®) (**Fig. 16A-B**).

Los animales se mantuvieron bajo las siguientes condiciones ambientales: ventilación (75 renovaciones/hora), temperatura (20-23°C) y humedad (60-70%). El fotoperíodo durante todos los experimentos fue constante con 12 horas de luz/12 horas de oscuridad (luces encendidas desde las 7:00h). A la edad de 27, 28 y 29 días, las ratas fueran tratadas con 1 mg de  $17\beta$ -estradiol (Sigma-Aldrich) disuelto en 0.3 ml de aceite de sésamo, administrado por vía subcutánea, con el fin de estimular el desarrollo ovárico y el crecimiento de folículos antrales (**Fig. 16C**).



**Figura 16.** Alojamiento y tratamiento de animales de estudio. (A) Jaulas en el animalario de la UCD. (B) Detalle del acceso al agua (flecha blanca) y al comedero (flecha negra) en el interior de una jaula individual. (C) Imagen de la administración subcutánea de  $17\beta$ -estradiol en la rata.

Todos los experimentos se llevaron a cabo siguiendo las buenas prácticas para el manejo de animales de laboratorio, y de acuerdo con el Protocolo aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de California, Davis.

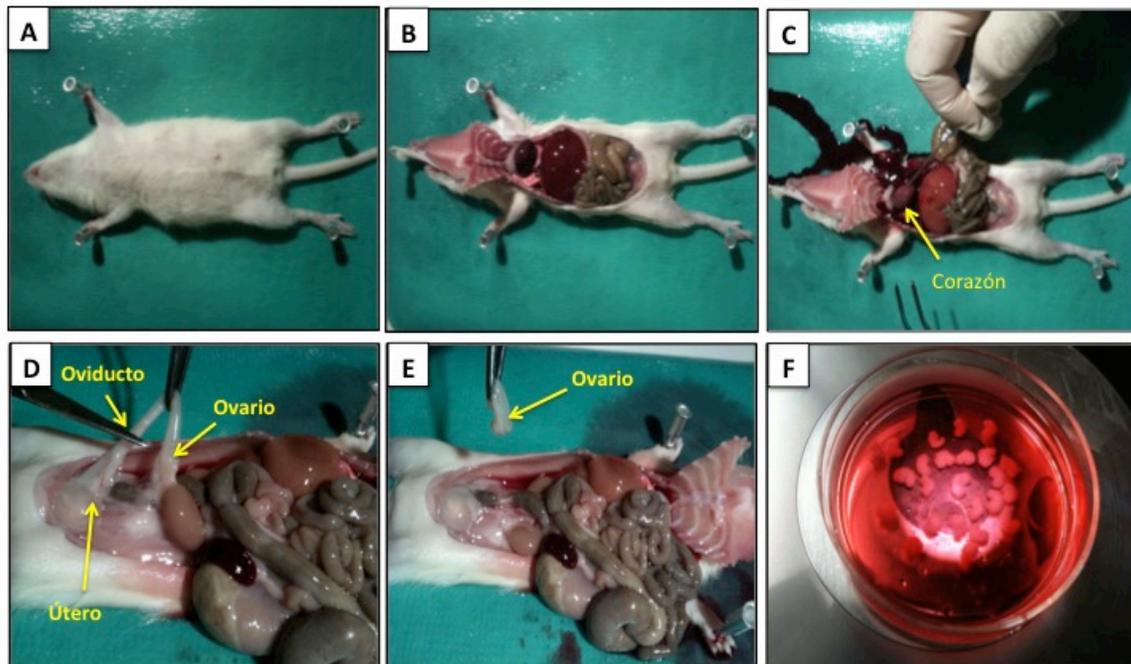
## 2. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 2.1. AISLAMIENTO CELULAR

#### 2.1.1. Aislamiento de células teca intersticiales

La obtención de las células TI se realizó siguiendo el método de *Magoffin y col*, descrito en 1988 (340). Un día más tarde de la última inyección, con un peso promedio de 90 g, las ratas fueron anestesiadas intraperitonealmente con ketamina (75 mg/kg) y xilacina (5 mg/kg). Posteriormente, a través de una laparotomía media anterior con extensión subcostal, las ratas se sacrificaron mediante una perfusión intracardiaca en el ventrículo izquierdo de salino al 0.9% con una aguja 18 G y posterior corte de aurícula derecha, determinando la muerte de la rata a los 30-60 segundos de realizar dicho procedimiento (**Fig. 17A-C**).

Una vez que las ratas fueron perfundidas con salino al 0.9%, se realizó la extracción de los anejos y se dispusieron en una placa de Petri de 10 cm de diámetro con 20 ml de medio de aislamiento M199, suplementado con 1% antibiótico/antimicótico, L-glutamina (2 mM), albúmina sérica bovina al 0.1%, HEPES (25 mM), NaOH (1 N) con pH de 7.25. Posteriormente, se disecaron los ovarios liberándolos de las trompas y tejido graso adyacente bajo microscopio óptico, colocándolos en una placa de Petri con medio de aislamiento (**Fig.17D-F**).

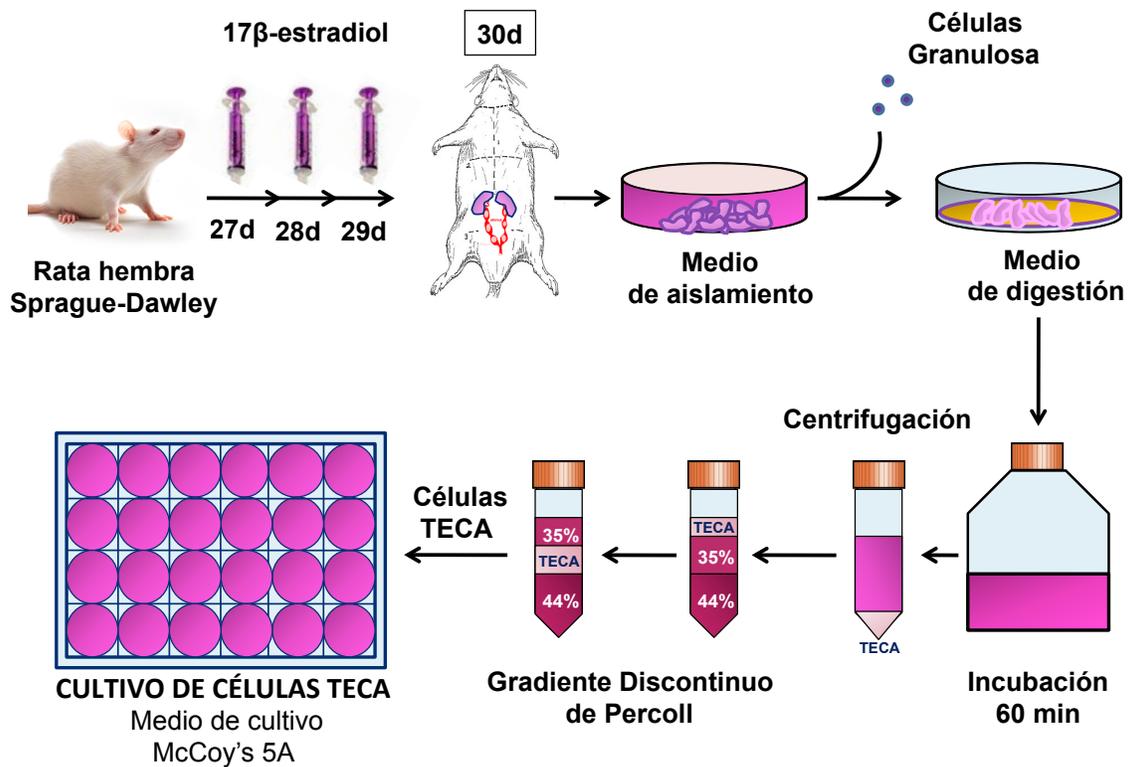


**Figura 17.** Aislamiento del ovario de la rata: procedimiento quirúrgico. (A) Rata en decúbito supino. (B) Tras realización de laparotomía media anterior con extensión subcostal. (C) Perfusión intracardiaca de salino al 0.9%. (D) Detalle de las principales partes del aparato reproductor femenino en la rata. (E) Pieza quirúrgica formada por ovario y parte de oviducto. (F) Imagen de ovarios en medio de cultivo tras el proceso de aislamiento.

A continuación, se puncionaron vigorosamente los folículos ováricos con una aguja estéril de 26G tras fijar los ovarios firmemente con pinzas, con el fin de liberarlos de las células de la granulosa, las cuales fueron a su vez purificadas para su posterior uso (Ver apartado 2.1.2). Posteriormente, los ovarios libres de células de la granulosa fueron transferidos a una nueva placa de Petri con medio de aislamiento y aclarados para eliminar la presencia de restos de células de la granulosa.

Los ovarios se colocaron entonces en una nueva placa de Petri y se trituraron con ayuda de un bisturí estéril en presencia de medio de digestión, elaborado con medio de aislamiento M199 (7.5 ml) suplementado con colagenasa (30 mg), DNasa (2.24 mg) y albúmina sérica bovina (75 mg). El producto obtenido se depositó en un frasco de cultivo

celular estéril de 25 cm<sup>2</sup>, incubándose posteriormente en un agitador de baño de agua a una temperatura de 37°C durante 60 minutos, mezclando la muestra cada 5-10 minutos con la ayuda de una pipeta Pasteur con el fin de evitar los acúmulos de células y, por tanto, homogeneizar la muestra. Pasado este tiempo, se filtró por un cedazo estéril de nylon de 100 µm y se centrifugó a 200 g durante 5 minutos en una centrífuga Centra CL2 (Thermo Scientific). Una vez finalizado este tiempo, se eliminó el sobrenadante y las células se volvieron a resuspender con medio de aislamiento para posteriormente ser sometidas de nuevo a centrifugación a 200 g durante 5 minutos (**Fig. 18**).



**Figura 18.** Secuencia de pasos en el aislamiento de las células teca intersticiales. Una vez tratadas con 17β-estradiol, las ratas fueron sacrificadas y los ovarios liberados de las trompas y tejido graso adyacente. A continuación, se puncionaron vigorosamente los folículos ováricos para liberarlos de las células de la granulosa, colocándose los ovarios puncionados en medio de digestión. Tras una incubación de 60 minutos, la muestra se centrifugó y posteriormente se aislaron y purificaron las células TI mediante la realización de un gradiente discontinuo de Percoll.

Tras el proceso de centrifugación, las células TI fueron posteriormente aisladas y purificadas mediante la realización de centrifugación en gradiente discontinuo de Percoll (**Fig. 18**). Para ello, el pellet reconstituido con 1 ml de medio de aislamiento se sometió a un gradiente de Percoll (35 %, 44 %) centrifugando a 200 g durante 30 minutos a 4°C. Las células TI migran a la interfase bien definida entre el 35 % y el 44 %, donde pueden ser recogidas y reconstituidas finalmente en 10 ml de medio de aislamiento, para su posterior centrifugación a 200 g durante 5 minutos.

### **2.1.2. Aislamiento de células de la granulosa**

Una vez finalizada la punción vigorosa de los ovarios, las células de la granulosa se centrifugaron a 200 g durante 10 minutos a 4°C. Una vez finalizado el proceso, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet. Posteriormente las células fueron cultivadas en los placas de cultivo.

## **2.2. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE LA TINCIÓN CON TRYPAN BLUE**

El *Trypan blue* es una tinción utilizada para determinar el conteo de las células viables *in vitro* de una suspensión celular. Este método se basa en el principio de que las células viables (vivas) no dejan entrar el colorante dentro de la célula, mientras que las no viables (muertas) tienen la membrana citoplasmática desestructurada o rota por lo que permiten que el colorante penetre dentro de la célula.

Se prepara una suspensión celular y se añade el mismo volumen (10 µl) de la solución de *Trypan blue* (0.4%) y pasados 15 minutos de incubación se realiza el conteo del número de células viables (no teñidas) en una cámara de Neubauer. Se determina la densidad celular en la suspensión madre teniendo en cuenta el factor de dilución.

En nuestro caso, la viabilidad celular de las células de la TI permaneció constante en el rango comprendido entre 90%-95%, mientras que la viabilidad celular para las

células de la granulosa se mantuvo en el rango de 40%-45%, similares ambos a los rangos descritos en estudios previos para dichos tipos celulares (235, 341, 342).

### 2.3. RECUESTO CELULAR

Se utilizó como método de recuento celular la cámara de Neubauer, con el objetivo de aumentos, que efectúa el recuento de las células en un área de  $1\text{mm}^2$  definida por las triples líneas paralelas de la cámara. El número de células por mililitro de suspensión permitió calcular el número de células total.

### 2.4. CULTIVO CELULAR

#### 2.4.1. Cultivo células teca intersticiales

Las células se distribuyeron en placas recubiertas de fibronectina humana de 24 pocillos (BD Biosciences, Bedford, MA) a una densidad de 400.000 células por pocillo y fueron incubadas a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5% durante 12, 24 y 48 horas en medio de cultivo MacCoy's 5A suplementado con 1% de antibiótico/antimicótico, 0.1% de albúmina sérica bovina y 2 mM de L-glutamina. Las células fueron incubadas en presencia de los siguientes tratamientos:

- Control: \_\_\_\_\_ MacCoy's 5A con 0.1% BSA
- Resveratrol: \_\_\_\_\_ 1, 3, 10  $\mu\text{M}$
- FPP: \_\_\_\_\_ 30  $\mu\text{M}$
- GGPP: \_\_\_\_\_ 30  $\mu\text{M}$
- Nicotinamida: \_\_\_\_\_ 1 mM
- Sirtinol: \_\_\_\_\_ 10  $\mu\text{M}$
- Inhibidor de Akt: \_\_\_\_\_ 1  $\mu\text{M}$
- Insulina \_\_\_\_\_ 0.1  $\mu\text{g/ml}$
- Inhibidor Akt \_\_\_\_\_ 1  $\mu\text{M}$

En los experimentos destinados a evaluar la fosforilación de Akt mediante la realización de experimentos de Western blot, las células se distribuyeron en tubos eppendorf a una densidad de  $2 \times 10^6$  células/tubo en ausencia (control) y en presencia de resveratrol (10  $\mu$ M), incubándose a 37°C/5% CO<sub>2</sub> durante 30 minutos. En el mismo set de experimentos se incluyeron insulina (0.1  $\mu$ g/ml) e inhibidor de Akt (1  $\mu$ M) como controles positivo y negativo, respectivamente, para controlar la especificidad de los anticuerpos.

Las concentraciones de estos tratamientos fueron escogidos en base a las dosis utilizadas en estudios previos (343, 344). Las cultivos de células teca intersticiales fueron incubadas en medio suplementado con LH (5 ng/ml) en todos los casos.

Todos los tratamientos anteriormente descritos se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) excepto el inhibidor de Akt (Akt Inhibitor VIII, Isozyme-Selective, Akti-1/2), adquirido de Calbiochem Co. (Gibbstown, NJ) y la LH, que se obtuvo del *National Hormone & Pituitary Program at the Harbor-UCLA Medical Center* (Torrance, CA).

#### **2.4.2. Cultivo células de la granulosa**

Las células se distribuyeron en placas recubiertas de fibronectina humana (BD Biosciences, Bedford, MA) y fueron incubadas a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% hasta períodos de 48 horas en medio de cultivo MacCoy's 5A suplementado con 1% de antibiótico/antimicótico, 0.1% de albúmina sérica bovina y 2 mM de L-glutamina. La concentración de células utilizada, el tiempo de incubación, así como el tipo de placa de cultivo a utilizar se escogió en función del diseño de cada experimento:

1. Experimentos de proliferación celular y viabilidad celular: se añadieron 35.000 células/pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos y se incubaron durante 24 y 48 horas.

2. Experimentos para determinar la actividad de las caspasas: se añadieron 20.000 células/pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos y se incubaron durante 3, 6, 12, 24 y 48 horas.
3. Experimentos de tinción nuclear con DAPI y Actina-F: se añadieron 16.000 células/pocillo en portas de cultivo de 8 pocillos y se incubaron durante 24 y 48 horas.
4. Experimentos RT-PCR: se añadieron 400.000 células/pocillo en placas de cultivo de 24 pocillos y se incubaron durante 24 y 48 horas.
5. Experimentos para cuantificación de proteína por Western Blot: se añadieron 2 millones células/pocillo en placas de cultivo de 6 pocillos y se incubaron durante 24 y 48 horas.
6. Experimentos para medir la actividad de HMGCoAR: se transfirieron 50 millones de células de la granulosa a tubos Falcon de 50 ml.

Las células fueron incubadas en presencia de los siguientes tratamientos:

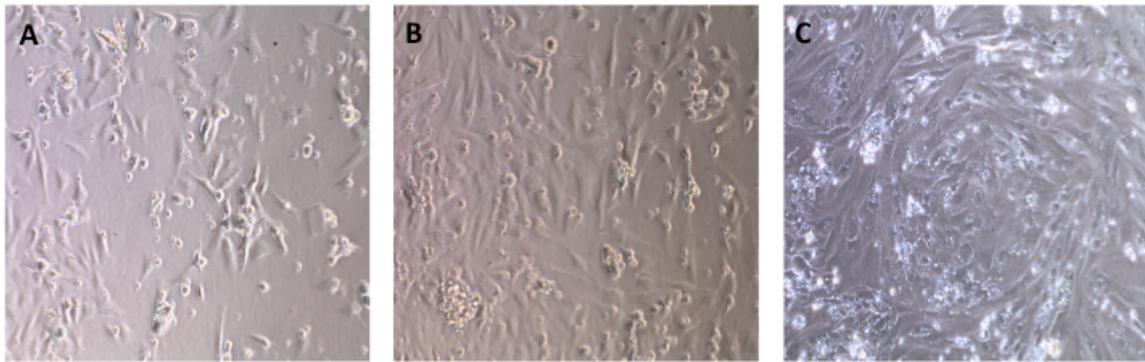
- Control: \_\_\_\_\_ MacCoy's 5A con 0.1% BSA
- Resveratrol: \_\_\_\_\_ 10, 30, 50  $\mu$ M

Las células de la granulosa fueron incubadas en medio suplementado con FSH (30 ng/ml) en todos los casos. En los experimentos destinados a evaluar la esteroidogénesis, los cultivos de células de la granulosa se suplementaron además con testosterona (0.5  $\mu$ M) para actuar como sustrato para la aromatasa.

Todos los tratamientos anteriormente descritos se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) excepto la FSH, que se obtuvo del *National Hormone & Pituitary Program at the Harbor-UCLA Medical Center* (Torrance, CA).

## 2.5. MORFOLOGÍA CELULAR

Durante todo el proceso de cultivo, las células fueron controladas observándolas al microscopio óptico invertido y descartando la posible contaminación por levaduras, hongos o bacterias. Con los objetivos de 10 y 20 aumentos se observó completamente todo el área de cultivo para controlar el correcto crecimiento de las células y su desarrollo (Fig. 19A-C).



**Figura 19.** Cultivo primario de células teca intersticiales en distintos tiempos de estudio: 12 h (A), 24 h (B) y 48 h (C). Visualización con microscopio óptico invertido y magnificación de 10 y 20X.

## 3. RT-PCR A TIEMPO REAL

### 3.1. FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de DNA durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima DNA polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el DNA en las células. Si en dicha reacción usamos como sustrato DNA genómico, entonces típicamente hablamos de una PCR, pero si usamos DNA complementario (cDNA) proveniente del mRNA se le conoce como RT-PCR (*Reverse Transcription-PCR*).

La PCR cuantitativa (*quantitative polymerase chain reaction*, qPCR o Q-PCR) o PCR en tiempo real (*real time PCR*, RT-qPCR o RT-Q-PCR) es una variante de la PCR convencional utilizada para amplificar y, simultáneamente, cuantificar el producto amplificado de DNA. Los elementos importantes en la reacción son el molde de DNA (cDNA), la enzima DNA polimerasa termoestable, los oligonucleótidos o primers (los cuales hibridan con la región complementaria al DNA que se desea amplificar), los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina) y una solución amortiguadora o buffer (que mantiene el pH de la reacción constante). A esta mezcla se añade un fluoróforo que, tras excitar a la longitud de onda apropiada, permite medir la tasa de generación de uno o más productos específicos en un termociclador que albergue sensores para medir fluorescencia.

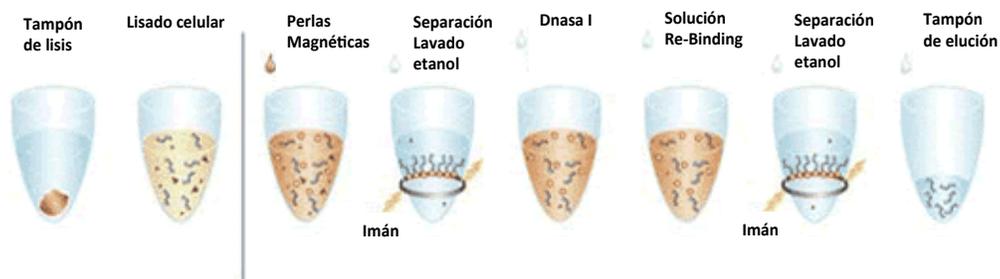
### **3.2. EXTRACCIÓN DE RNA**

El éxito de cualquier método de extracción de RNA consiste en evitar su degradación por parte de las ribonucleasas, enzimas muy resistentes y de gran actividad catalítica que degradan el RNA durante y después de la extracción, provocando bajos rendimientos de RNA de longitud completa. El método de extracción de RNA total utilizado en el presente trabajo se basó en una lisis celular mediante una solución con una elevada concentración de tiocinato de guanidina, que rápidamente desestabiliza las membranas celulares e inhibe la acción de las ribonucleasas. Posteriormente, se llevó a cabo el aislamiento del RNA mediante el uso de perlas magnéticas (MagMAX<sup>TM</sup>-96 Total RNA Isolation Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA) y el Kingfisher robot (Thermo Scientific, Vantaa, Finland).

Para ello, las placas recubiertas de fibronectina de 24 pocillos se sacaron del incubador una vez cumplidos los tiempos de incubación correspondientes a cada tratamiento, aspirando y congelando el medio de cada pocillo a -20°C hasta su posterior uso para la determinación de hormonas esteroideas.

La primera etapa de la extracción del RNA es la homogenización, en la que se aplica 175  $\mu$ l de tampón de lisis sobre la monocapa de células en la placa de cultivo provocando la lisis celular. Posteriormente se deja actuar al buffer de lisis durante 30-60 minutos en un agitador a temperatura ambiente con el fin de favorecer la desestructuración de las membranas celulares.

Posteriormente a la homogenización, las muestras de lisado celular se obtuvieron mediante raspado vigoroso de la superficie de la placa con una pipeta de punta ancha y se mantuvieron sobre hielo a 4°C contenidos en tubos eppendorf. A continuación, se dispusieron en una placa de 96 pocillos y se pusieron en contacto con 20  $\mu$ l de mezcla de perlas magnéticas, que permiten la unión selectiva a los ácidos nucleicos. De esta manera, los ácidos nucleicos son capturados magnéticamente por las perlas y lavados sucesivamente para eliminar los restos celulares, proteínas y otros contaminantes. A continuación, las muestras fueron tratadas con 50  $\mu$ l de desoxirribonucleasa *TURBO Dnasa*, compuesto que libera los ácidos nucleicos de las perlas magnéticas y degrada la porción de DNA genómico existente en la muestra. Seguidamente, la adición de 100  $\mu$ l *Rebinding Solution* une de nuevo el RNA a las perlas magnéticas y, tras una fase de lavado y secado, es purificado en un volumen de 25  $\mu$ l de tampón de elución (**Fig. 20**).



**Figura 20.** Proceso de extracción de RNA. Una vez finalizado el período de incubación, se procedió a la homogenización de las muestras mediante la aplicación del tampón de lisis. A continuación, las muestras de lisado celular se pusieron en contacto con una mezcla de perlas magnéticas, quedando retenidos los ácidos nucleicos. Tras subsiguientes lavados, las muestras fueron depuradas y el RNA obtenido tras una fase de lavado y secado.

La cantidad de RNA obtenida se cuantificó posteriormente mediante la lectura de un espectrofotómetro (NanoDrop 100, Thermo Scientific, Pittsburgh, PA). Su funcionamiento consiste, básicamente, en iluminar la muestra con luz blanca y calcular la cantidad de luz que refleja dicha muestra en una serie de intervalos de longitudes de onda. Los ácidos nucleicos presentan absorción (A) a 260 nm ( $A_{260}$ ) y las proteínas a 280 nm ( $A_{280}$ ). Una absorbancia de 1 unidad a 260 nm corresponde a 40  $\mu\text{g}$  de RNA/ml ( $A_{260}=1 = 40 \mu\text{g/ml}$ ). Para calcular la concentración de RNA total, se utilizó una dilución de 1:50 [2  $\mu$  de muestra: 98  $\mu\text{l}$  de agua DEPC (dietilpirocarbonato)], y en todas las mediciones se utilizó agua DEPC como control (blanco). Una vez obtenidos los valores de absorbancia de RNA, se pudo conocer la concentración exacta de cada muestra a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración total de RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (A_{260}) (\text{Dilución}) (40) / 1000$$

### 3.3. SÍNTESIS DE DNA COMPLEMENTARIO (cDNA)

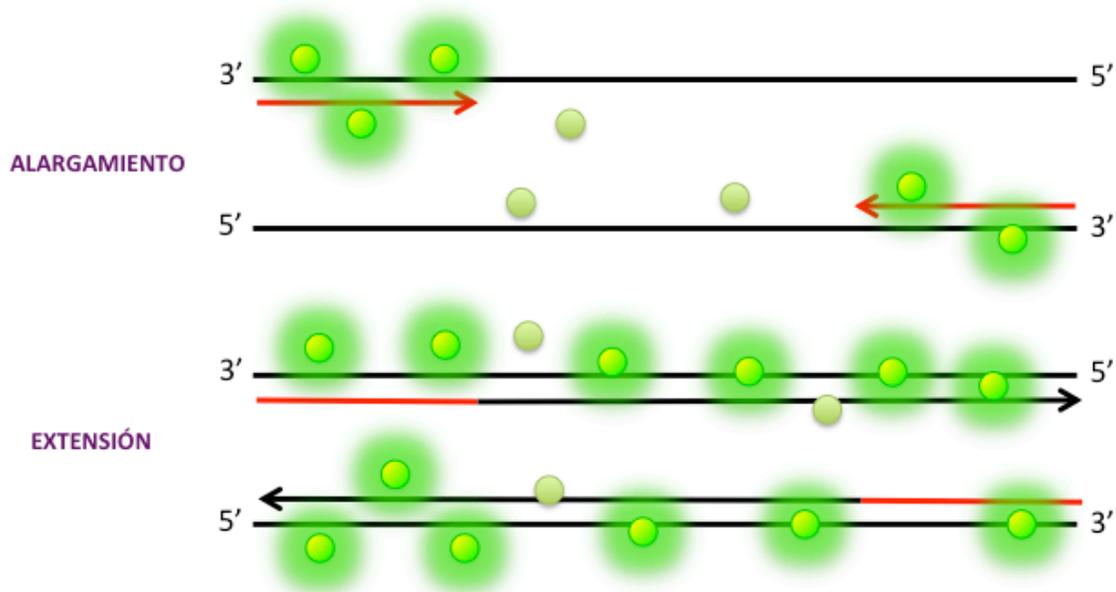
La síntesis de cDNA a partir de RNA se llevó a cabo por retrotranscripción empleando el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* para RT-PCR (Applied Biosystems, CA), siguiendo las instrucciones de uso.

La retrotranscripción se realizó utilizando 200 ng del RNA total diluido en agua DEPC tratada hasta conseguir un volumen de 20  $\mu\text{l}$ . A continuación se añadió por muestra analizada: 8  $\mu\text{l}$  *10x RT buffer*, 3.2  $\mu\text{l}$  de *25x dNTP* (100mM), 8  $\mu\text{l}$  de *10x RT random primers*, 4  $\mu\text{l}$  de *MultiScribe Reverse Transcriptase*, 4  $\mu\text{l}$  de *Rnase Inhibitor* y 12.8  $\mu\text{l}$  de agua DEPC, en un volumen final de 60  $\mu\text{l}$ . Se incubó en el termociclador (ABI 7300 Real-time PCR System, Applied Biosystems) a 25°C durante 10 minutos, posteriormente a 37°C durante 120 minutos y finalmente a 85°C durante 5 minutos. Por último, las muestras se congelaron a -80°C hasta el momento de su manipulación.

La cantidad de cDNA obtenida se cuantificó posteriormente mediante la lectura espectrofotométrica de la absorbancia a 260 nm.

### 3.4. DETECCIÓN DEL PRODUCTO DE PCR

La reacción de PCR a tiempo real consiste en monitorizar el progreso de la reacción de PCR a medida que va ocurriendo, desde el principio hasta el final. Existe una gran variedad de formatos de detección del producto de la PCR, divididos en específicos y en no específicos. El *SYBR-Green* es un fluoróforo basado en un mecanismo de detección no específica, ya que se une al surco menor de todos los fragmentos de DNA bicatenario (dsDNA) producidos durante la reacción de amplificación (ya sea producto específico, producto inespecífico o dímeros de cebadores) aumentando su fluorescencia unas 1.000 veces (Fig. 21).



**Figura 21.** Esquema sobre la técnica de *SYBR Green*. El *SYBR-Green* es un fluoróforo que se une al surco menor de todos los fragmentos de dsDNA producidos durante la reacción de amplificación aumentando su fluorescencia unas 1.000 veces.

Por tanto, a medida que el producto de la PCR se acumula, aumenta la cantidad de dsDNA y por tanto, la fluorescencia emitida. Entre sus ventajas destaca su fácil uso y sensibilidad, llegando a identificar la producción de una única molécula. El principal

inconveniente de este método de detección es que se une a cualquier fragmento de dsDNA existente en la reacción, incluyendo dímeros de cebadores y otros productos inespecíficos, pudiendo resultar en una sobreestimación de la concentración del producto diana.

### 3.5. PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE DNA

Para evitar la degradación de las enzimas utilizadas y de las muestras, la manipulación de los reactivos se llevó a cabo en todo momento sobre hielo. Se preparó un mix común para todas las muestras de la placa de 96 pocillos, donde se añadió a cada pocillo la cantidad necesaria del mix preparado junto con cDNA de cada muestra.

La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 28  $\mu$ l con 5  $\mu$ l de cDNA sintetizado, 4.5  $\mu$ l de cebador 900nM directo y reverso y 14  $\mu$ l de *2X SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). Las reacciones de PCR a tiempo real se llevaron a cabo en triplicados utilizando el *ABI 7300 Real-time PCR System* (Applied Biosystems). Se incluyeron distintas diluciones de cADN en cada reacción para generar curvas estándar. Los datos fueron analizados mediante SDS 1.4 software (Applied Biosystems).

Para poder identificar el gen cuya expresión permanece más estable bajo condiciones experimentales, diversos genes con potencial uso como controles endógenos, tales como hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HPRT),  $\beta_2$ -microglobulina (B2M) y  $\beta$ -actina fueron evaluados mediante el algoritmo NormFinder (345). Este sistema identificó el mRNA de HPRT como el más estable y fue, por tanto, el seleccionado como gen constitutivo o *housekeeping* en nuestros experimentos. En el presente trabajo se analizaron un total de 7 genes junto con el gen HPRT como gen constitutivo. Las secuencias de los cebadores utilizados aparecen en la tabla (**Tabla 2**) y han sido utilizados en estudios previos (346). Todos ellos fueron adquiridos de la casa comercial Invitrogen.

GEN	SENTIDO	SECUENCIA DE CEBADOR (5'-3')
<b>STAR</b>	Directo	GCC TGA GCA AAG CGG TGT C
	Reverso	CTG GCG AAC TCT ATC TGG GTC TGT
<b>CYP11A1</b>	Directo	GCT GGA AGG TGT AGC TCA GG
	Reverso	CAC TGG TGT GGA ACA TCT GG
<b>HSD3B1</b>	Directo	CCA GAA ACC AAG GAG GAA T
	Reverso	CCA GAA ACC AAG GAG GAA T
<b>CYP17A1</b>	Directo	ACT GAG GGT ATC GTG GAT GC
	Reverso	CCG TCA GGC TGG AGA TAG AC
<b>CYP19</b>	Directo	ACC ATC ATG GTC CCG GAA A
	Reverso	AGG CCC ATG ATC AGC AGA AG
<b>AMH</b>	Directo	GCT GCT GCT AGC GAC TAT G
	Reverso	AGA TGT AGG CTA GCA ACT G
<b>VEGF</b>	Directo	ACA GAA GGG GAG CAG AAA GCC CAT
	Reverso	CGC TCT GAC CAA GGC TCA CAG T
<b>HPRT</b>	Directo	TTG TTG GAT ATG CCC TTG ACT
	Reverso	CCG CTG TCT TTT AGG CTT TG

**Tabla 2.** Secuencias de *primers* (directo y reverso).

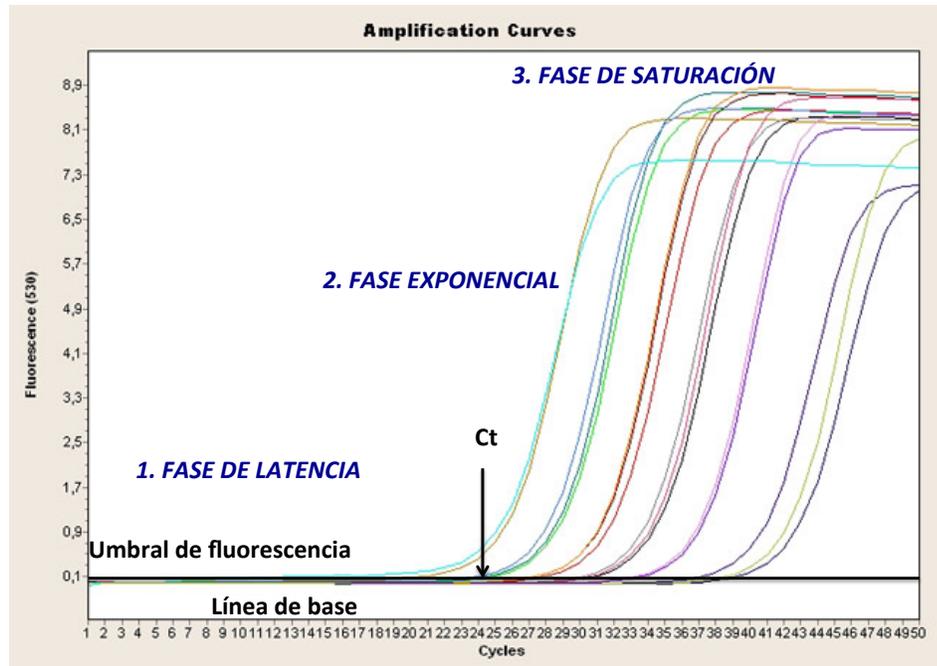
### 3.6. MEDICIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Para la cuantificación de cDNA, se mide en cada ciclo de PCR la cantidad de amplicón producido (cantidad de moléculas de DNA idénticas resultado de un proceso de PCR). La cuantificación del producto se produce mediante la adición de fluoróforos que se unen al amplicón de forma cuantitativa, de forma que a mayor producto mayor fluorescencia se emitirá. Los sistemas de PCR a tiempo real detectan la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de PCR y los *softwares* de análisis representan dicha fluorescencia gráficamente respecto al número de ciclos. La cantidad de amplicón

producido es proporcional al número de moléculas de RNA/DNA iniciales, de forma que en aquellas muestras con mayor expresión del gen el amplicón fluorescente aparecerá en ciclos anteriores.

Para el análisis cuantitativo del producto, se analizó la curva de amplificación emitida una vez finalizada la reacción, donde el eje vertical representa la cantidad de fluorescencia normalizada, y el eje horizontal el número de ciclos (**Fig. 22**). Esta curva está constituida por al menos tres fases distintas:

- 1) Fase de latencia: donde la acumulación de producto no se puede detectar. La *Baseline* o línea de base se refiere a los ciclos iniciales en los que no hay cambios detectables en la cantidad de fluorescencia, y sólo se detecta fluorescencia basal.
  
- 2) Fase exponencial: En esta técnica se marca un umbral de fluorescencia (*threshold*) en un punto donde la reacción de amplificación se encuentra en su fase exponencial. El ciclo que atraviesa este umbral de fluorescencia se denomina  $C_T$  (*threshold cycle*), y se define como el ciclo a partir del cual la fluorescencia es estadísticamente significativa por encima del ruido de fondo (*background*). El cálculo del  $C_t$  siempre se realiza en la fase exponencial de la curva.
  
- 3) Fase de saturación: en la que ya no se produce un incremento de DNA.



**Figura 22.** Esquema de la curva de amplificación de PCR a tiempo real. Se observan un total de 15 ciclos, indicando las fases de dicha curva, así como la línea de base (Baseline), el umbral de fluorescencia (Threshold) y los ciclos umbrales de cada muestra (Ct).

Una vez obtenidos los resultados de Ct de las muestras, se llevó a cabo la cuantificación de la expresión genética. Comúnmente se emplean dos estrategias para llevar a cabo dicha cuantificación con PCR en tiempo real: cuantificación absoluta y cuantificación relativa, siendo esta última la utilizada en el presente trabajo.

La cuantificación relativa se utiliza para obtener la magnitud de los cambios fisiológicos en los niveles de expresión genética de un gen de estudio en comparación con uno o más genes de referencia y no requiere estándares con concentraciones determinadas. Hay que tener en cuenta que la expresión de los genes de referencia debe ser constante en las células estudiadas. Por esta razón, las secuencias utilizadas para cuantificación relativa son generalmente genes *"housekeeping"*, debido a que suelen estar involucrados en funciones básicas en la supervivencia celular, lo cual suele implicar una expresión constitutiva. De este modo, efectuando en cada experimento la medición de los

genes de interés y dividiéndolos por la expresión del gen normalizador seleccionado es posible comparar los primeros aún sin conocer en términos absolutos su nivel de expresión.

Una vez obtenidos los datos de Ct de las muestras y del gen housekeeping (en este caso HPRT) se procedió a su normalización relativa. Para ello se dividió el valor Ct del gen diana entre el valor Ct del control endógeno (HPRT), obteniendo así un valor normalizado para el gen diana.

#### **4. DETERMINACION DE HORMONAS ESTEROIDEASPOR LC-MS**

##### **4.1. FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA**

La cuantificación de las hormonas esteroideas se llevó a cabo mediante Cromatografía Líquida - Espectrometría de Masa (LC-MS o HPLC-MS), técnica de química analítica que combina la capacidad de separación física de la cromatografía líquida (o HPLC) con la capacidad de análisis de masa de la espectrometría de masa (MS). LC-MS es un método potente con una alta sensibilidad y especificidad que tiene muchas aplicaciones, tales como la separación, detección e identificación de sustancias químicas de partículas en presencia de otras sustancias.

La Cromatografía líquida es una técnica analítica que permite separar físicamente los distintos componentes de una solución por la adsorción selectiva de los constituyentes de una mezcla. En toda cromatografía existe un contacto entre dos fases, una fija que suele llamarse estacionaria (que puede ser de alúmina, sílice o resinas de intercambio iónico), y una móvil (fase móvil) que fluye permanente durante el análisis, y que en este caso es un líquido o mezcla de líquidos. Los intercambiadores iónicos son matrices sólidas que contienen sitios activos con carga electrostática. De esta forma, la muestra queda retenida sobre el soporte sólido por afinidad electrostática. Dependiendo de la relación carga/tamaño unos constituyentes de la mezcla serán retenidos con mayor fuerza

sobre el soporte sólido que otros, es decir, serán adsorbidos, lo que provocará su separación. Las sustancias que permanecen más tiempo libre en la fase senil, avanzan más rápidamente en el flujo de la misma y las que quedan más unidas a la fase estacionaria o retenidas avanzan menos y, por tanto, tardarán más en salir o fluir.

La introducción de la espectrometría de masas (MS) ha supuesto un gran avance en las técnicas analíticas por su gran sensibilidad y su alto grado de fiabilidad. Su principal ventaja sobre otras técnicas de detección (visible-ultravioleta, fluorimetría, detección electroquímica) es, por un lado, su capacidad para suministrar información útil desde el punto de vista identificativo, de forma que el espectro de masas se presenta así como una prueba casi inequívoca de la identidad del compuesto a analizar. Por otro lado, se trata de un detector universal, basado en la separación de las especies cargadas de acuerdo con su relación masa/carga. La espectrometría de masas se presenta como uno de los métodos de detección más sensibles y específicos para el análisis molecular.

#### **4.2. PREPARACIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ESTEROIDES**

Cada muestra se estudió directamente, aplicando el siguiente procedimiento de extracción a cada espécimen por separado. Una vez descongeladas las muestras, se preparó una alícuota de muestra (300 µl) que se dispuso en un inyector automático de muestras, a la que se le añadieron 150 µl de solución interna estándar hasta completar un volumen total de 450 µl. La detección y cuantificación de todos los analitos se llevó a cabo mediante el uso del monitoreo de la reacción seleccionada (SRM).

#### **4.3. CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDEAS: LC-MS**

La determinación de hormonas esteroideas se realizó mediante Cromatografía de Flujo Turbulento (TFC) HPLC-MS/MS, técnica que permite la detección simultánea de androstendiona, androsterona, progesterona y estradiol. Consiste en un sistema de configuración multiplex Thermo Aria TLX-2 TFC (dos bombas de carga y dos bombas de elución, Shimadzu LC-10AD), basado en una cromatografía líquida de alta presión, y

un inyector equipado con un plato Peltier de 300 posiciones (Franklin, MA), acoplado a un espectrómetro de masa triple cuadrúpulo Thermo Scientific TSQ Vantage (San Jose, CA), equipado con una fuente de ionización por electrospray calentado. El instrumento se controló usando un software Aria (Versión 1.6.1). Se utilizó una columna de extracción termo-ciclón P para extraer la muestra del suero diluido y la separación HPLC se llevó a cabo a través de una columna ACE C18 de 2.1 x 100 mm, para partículas de 3  $\mu\text{m}$  de tamaño, localizada en el interior de un calentador de columna Hot Pocket (Thermo Scientific, San Jose) y protegida por un guarda cartucho de fase reversa (Mac-Mod, Chadds Ford, PA).

Tanto los iones precursores como los productos de cada analito diana se eligieron a través de transiciones SRM, mientras que los parámetros relacionados para los diferentes analitos se aislaron por el método de separación HPLC, basado en el siguiente gradiente de fase móvil: solvente A-agua con 0.1% de ácido fórmico; B-methanol; C-acetonitrilo/alcohol isopropílico/acetona en proporción 60/30/10; D- agua/acetonitrilo (98/2 v/v) con 0.1% de hidróxido de amonio.

#### **4.4. MEDICIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS**

La detección y cuantificación se llevó a cabo a través de transiciones de monitoreo de reacción seleccionada LC-MS/MS de la relación masa/carga de los iones precursores iniciales de androstendiona, androsterona, progesterona y estradiol, 287.2, 291.4, 315.2 y 255.2, respectivamente. A continuación, se determinó la respuesta para el mayor de los iones producto de cada uno de los analitos, y los picos correspondientes a cada tiempo de retención adecuado fueron integrados mediante el uso de LCQuan. Este software se utilizó para generar curvas de calibración y cuantificar los analitos en todas las muestras. La concentración de androstendiona, androsterona, progesterona y estradiol en cada muestra se determinó a través de un método estándar interno usando la relación área pico y análisis de regresión lineal. La respuesta para androstendiona, androsterona, progesterona y estradiol fue lineal, proporcionando coeficientes de correlación ( $R^2$ ) de 0.99 o mejor.

## **5. WESTERN BLOT**

### **5.1. FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA**

La detección de proteínas específicas se determinó mediante la técnica de Western Blot. Esta técnica se emplea para detectar, en una mezcla de proteínas o fragmentos de proteínas, aquellas que reaccionan con el mismo anticuerpo. El proceso comienza con la separación de la mezcla de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en medio disociante. Finalizada la trayectoria del gel, las proteínas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa e incubada con una solución de anticuerpos específicos dirigidos contra las proteínas de interés. Finalmente, se revela dicha reacción agregando una solución de un segundo anticuerpo dando lugar a una banda visible.

### **5.2. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN Y LISIS PROTEICA**

Antes de llevar a cabo el proceso de electroforesis, es necesario lisar las células para poder extraer las proteínas. Para ello, se incuban las células con tampón de lisis suplementado con inhibidores de la proteasa (Pierce). Existe gran cantidad de protocolos para la extracción y lisis proteica, teniendo en cuenta si las proteínas que se quieren determinar aparecen a nivel citoplásmico o incluidas en la membrana.

#### **5.2.1. Células de la teca**

Las células se distribuyeron en tubos eppendorf a una densidad de  $2 \times 10^6$  células/tubo en ausencia (control) y en presencia de resveratrol ( $10 \mu\text{M}$ ), incubándose a  $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$  durante 30 minutos. En el mismo set de experimentos se incluyeron insulina ( $0.1 \mu\text{g/ml}$ ) e inhibidor de Akt ( $1 \mu\text{M}$ ) como controles positivo y negativo, respectivamente, para controlar la especificidad de los anticuerpos.

Al final del tratamiento, las muestras contenidas en tubos eppendorf se centrifugaron a 7.000 rpm durante tres minutos a 4°C. Una vez transcurrido este tiempo, el sobrenadante fue retirado con ayuda de una aguja y jeringa, y se añadió 50 µl de tampón de lisis (Invitrogen) junto con una pastilla de inhibidor de proteasa (mantenido a 4°C) por cada tubo y se mezcló bien mediante vórtex. A continuación, se sonicaron las muestras dos veces durante 30 segundos, centrifugándose finalmente a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C con el fin de eliminar membranas y organelas celulares. Se separó el sobrenadante (purificado de proteínas) y se congelaron las muestras a -80°C hasta nuevo uso.

### **5.2.2. Células de la granulosa**

Tras el período de incubación, se retiró el medio de cultivo de cada pocillo y se lavaron las células con 2 ml de PBS. Posteriormente se añadió 0.5 ml de Tripsina (Gibco) al 0.25% por pocillo y se incubó el plato durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se agitó el plato y se añadió 1 ml de medio de cultivo de McCoy por pocillo para inactivar el efecto de la tripsina. Se rascó la superficie del pocillo con un rascador de células y se usó una punta de pipeta ancha (1 ml) para aspirar el medio y almacenarlo en un tubo Falcon de 15 ml. Este procedimiento se repitió sucesivamente hasta que los pocillos quedaron completamente libres de células.

Posteriormente, estos tubos se centrifugaron a 1.500 rpm durante 10 min a 10-15°C. Una vez eliminado el sobrenadante, se añadieron 0.5 ml de medio de cultivo. Tras mezclar el contenido con la pipeta Pasteur, se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó durante 3 minutos a 7.000 rpm a 4°C. Una vez transcurrido este tiempo, el sobrenadante fue retirado con ayuda de una aguja y jeringa y los pellets se almacenaron a -80°C.

Una vez descongeladas, se añadió 50 µl de tampón de lisis (Invitrogen) junto con una pastilla de inhibidor de proteasa (mantenido a 4°C) por cada tubo y se mezcló bien mediante vórtex. A continuación, se sonicaron las muestras dos veces durante 30

segundos, centrifugándose finalmente a 13.000 rpm durante diez minutos a 4°C para separar membranas y organelas. Se separó el sobrenadante (purificado de proteínas) en tubos eppendorf y se eliminaron los pellets.

### **5.3. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE BRADFORD.**

El método utilizado en el presente trabajo para la determinación de proteínas es el Método de Bradford. Brevemente, se trata de un ensayo colorimétrico en el que, a través de la adición de una sustancia química (Coomassie Brilliant Blue G250), es capaz de reaccionar con determinados residuos aminoácidos mediante una medida de absorbancia. Posteriormente, para determinar la concentración de proteínas totales de la muestra y analizar los resultados de absorbancia se interpola a una curva de calibración construida utilizando una proteína estándar, por lo general albúmina sérica bovina (BSA, *bovine seric albumin*), cuya concentración es conocida.

Para realizar la curva de calibración se prepararon por duplicado ocho diluciones en buffer de lisis de la proteína estándar (BSA), entre 0.05 mg/ml a 0.4 mg/ml, incorporando también a la curva el valor "blanco" (tampón de lisis solo). A continuación se pipetearon por duplicado 5 µl de cada muestra de lisado celular en una placa de 96 pocillos y posteriormente se añadió 200 µl del reactivo de Bradford diluida en una proporción 1:5 con agua destilada a cada pocillo.

Por último, la placa se incubó a temperatura ambiente por un mínimo de 15 minutos (y un máximo de 45 minutos), procediéndose a continuación a la medición de la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas (Fluostar Omega; BMG Lab Technologies).

#### 5.4. PROTOCOLO DE WESTERN BLOT

##### *a) Electroforesis:*

En una cámara de electroforesis (Invitrogen), una vez montado el sistema de fijación de los cristales, se llevó a cabo un corrimiento de un gel de poliacrilamida continuo con dodecil sulfato de sodio (SDS) al 12% como medio disociante (PAGE-SDS) en presencia de un tampón TRIS-Glicina-SDS (Tris-HCl 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1% w/v). Para cargar las muestras de proteínas en cada pocillo, se calculó el volumen exacto de muestra necesario para cargar 65 µg de proteínas/pocillo en un volumen total de 20 µl (es fundamental cargar la misma cantidad de proteína en cada carril para poder comparar las concentraciones de cada muestra).

Previo a la carga de las muestras dentro del gel, las muestras se incubaron (20 min. a 70°C) en tubos eppendorf de 1.5 ml en un tampón de carga TRIS-HCl, 31.25 mM, pH 6.8, SDS 1%, glicerol 12.5%, naranja G 0.05% (LI-COR) y β-mercaptoetanol 10%, con el fin de desnaturalizar las proteínas. Una vez preparadas, las muestras corrieron a través de un gel de electroforesis separando las proteínas en función del peso molecular durante dos horas a 100 voltios. Finalizado el corrimiento, se extrajo el gel de la cámara de electroforesis.

##### *b) Transferencia:*

Una vez separadas las proteínas en un campo eléctrico, se transfirieron a un soporte más asequible, para facilitar su manipulación, y poner en contacto las muestras con los anticuerpos.

Para ello, el gel, la membrana de transferencia (LI-COR Biosciences) y dos papeles filtro se equilibraron en un tampón de transferencia formado por 700 ml de H<sub>2</sub>O mili-Q, 200 ml de metanol y 100 ml tampón 10XTRIS-glicina (Tris-HCl 25 mM, Glicina 192 mM) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se colocó un papel secante sobre

el cátodo del Trans-Blot y sobre éste se colocó el gel, la membrana y otro papel secante, colocando el conjunto entre dos esponjas de 3 mm de espesor, quedando preso a su vez en una pieza plástica con perforaciones en ambos lados. Se colocó el ánodo y se añadió el buffer de transferencia restante en la cubeta. Finalmente, la transferencia se realizó en frío (a 4°C) durante 1 hora y 15 minutos con un voltaje continuo de 110 voltios, con el fin de permitir el posterior acceso de los anticuerpos a las proteínas.

**c) Bloqueo:**

Con el fin de bloquear las uniones no específicas entre el anticuerpo primario y las proteínas retenidas en la membrana, es preciso realizar un bloqueo de la membrana con una solución rica en proteínas.

Una vez finalizada la transferencia, la membrana se bloqueó incubándola con un tampón de bloqueo (*Odyssey Blocking Buffer*, LI-COR Biosciences) durante una hora a temperatura ambiente con agitación constante. Posteriormente, se lavaron las muestras con tampón de lavado (PBS 1x/Tween 20 0.1%).

**d) Incubación con anticuerpo primario y secundario**

Una vez bloqueadas las membranas, se llevó a cabo la incubación con los anticuerpos primarios en tampón de incubación (*Odyssey Blocking Buffer*/Tween 20 0.1%) durante toda la noche a 4°C con agitación constante. En el caso de la  $\beta$ -Actina, la incubación se llevó a cabo en las mismas condiciones anteriormente descritas pero durante tan solo una hora. En cada caso se utilizó un anticuerpo específico para la proteína a detectar, que podía proceder de distintas especies, distinta naturaleza y ser utilizados a distintas concentraciones (**Tabla. 3**).

ANTICUERPO	TIPO DE ANTICUERPO	ESPECIE	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN
<b>Anti-Akt fosforilado</b>	Monoclonal	Conejo	Cell Signaling Technology	1:500
<b>Anti-rabbit</b>	Policlonal	Cabra	LI-COR Biosciences	1:10.000
<b>Anti-Akt total</b>	Monoclonal	Ratón	Cell Signaling Technology	1:500
<b><math>\beta</math>-Actina</b>	Monoclonal	Ratón	Sigma Aldrich	1:40.000
<b>Anti-mouse</b>	Policlonal	Cabra	LI-COR Biosciences	1:40.000
<b>AMH</b>	Policlonal	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	1:250
<b>VEGF</b>	Policlonal	Cabra	Santa Cruz Biotechnology	1:200
<b>Anti-goat</b>	Policlonal	Burro	LI-COR Biosciences	1:5000
<b>Anti-mouse</b>	Policlonal	Burro	LI-COR Biosciences	1:40.000

**Tabla 3.** Listado de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en Western blot. Se pueden visualizar el tipo de anticuerpo, especie, casa comercial y dilución empleadas.

A la mañana siguiente, la membrana se lavó 3-4 veces durante 5 minutos cada una tras la incubación con tampón de lavado (PBS 1x/Tween 20 0.1%). A continuación se prepararon los anticuerpos secundarios a la concentración deseada con un tampón de incubación (*Odyssey Blocking Buffer*/Tween 20 0.1%), incubándose las membranas junto con estos anticuerpos durante una hora a temperatura ambiente con agitación constante. Posteriormente, se lavaron las muestras 3-4 veces durante 5 minutos cada una con tampón de lavado (PBS 1x/Tween 20 0.1%).

## **5.5. MEDICIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS**

Para la detección del complejo antígeno-anticuerpo, se utilizó un Sistema de Imagen de Infrarrojos Odyssey (LI-COR Biosciences), capaz de generar imágenes a partir de excitación y emisión de moléculas fluorescentes en el rango infrarrojo cercano (IR). La radiación infrarroja, radiación térmica o radiación IR es un tipo de radiación electromagnética de mayor longitud de onda que la luz visible, pero menor que la de las microondas. Es decir, tiene menor frecuencia que la luz visible y mayor que las microondas. Este sistema permite el análisis de muestras “Multiplex” gracias a sus dos canales de detección, es decir, permite generar y cuantificar dos imágenes totalmente independientes y superponibles de fluorescencia (fluoróforos con absorción en 685 nm y/o 785 nm), permitiendo estudios de colocalización en un solo paso, como los necesarios para Western Blots de las formas fosforiladas y sin fosforilar de una proteína. En síntesis, este sistema utiliza la gran sensibilidad de la fluorescencia infrarroja para obtener imágenes con la máxima relación señal/ruido para la detección y/o cuantificación.

Para la cuantificación de la densidad de cada banda que corresponde a una proteína obtenida por el escáner, se empleó el programa informático Odyssey V3.0 (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE), de modo que sobre las imágenes digitalizadas de las membranas se fue seleccionando cada banda para su posterior cuantificación. Una vez medida la intensidad de cada banda, se realizó la normalización de los datos utilizando medidas relativas de los datos de cada banda de la proteína deseada respecto a las señales de  $\beta$ -actina.

## 6. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR MEDIANTE INCORPORACIÓN DE TIMIDINA TRITIADA

### 6.1. FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

En la actualidad existen numerosos métodos disponibles para estudiar la proliferación celular, pudiendo ser métodos de medición directos o indirectos. En el presente trabajo hemos utilizado un método directo de proliferación celular, ya que se trata de métodos más fiables al medir directamente la síntesis de DNA.

El ensayo de proliferación celular mediante la incorporación de timidina tritiada (timidina-<sup>3</sup>H) es un método directo basado en la medición de la incorporación de este nucleósido radiactivo en la replicación de las hebras de DNA producida durante la mitosis. Durante cada división celular, las células incorporan timidina-<sup>3</sup>H en su DNA, de modo que a mayor número de divisiones (mayor tasa de proliferación), mayor radiactividad será incorporada en el DNA.



**Figura 23.** Imagen del cosechador de células (PHD Harvester; Cambridge Technology, Inc., Watertown, MA).

## 6.2. PROTOCOLO DE ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Las células de la granulosa se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano, a una densidad de 35.000 células/pocillo e incubadas a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 48 horas. Posteriormente, se añadió 1 µCi/pocillo de timidina-<sup>3</sup>H (GE Health Sciences, Pittsburgh, PA) 24 horas antes del final del período de incubación. Una vez finalizado éste, se lavaron las células de los pocillos con agua destilada, provocando la fragmentación de las organelas y de las células, con la subsiguiente liberación de DNA. A continuación, los fragmentos celulares y el DNA se filtraron a través de una membrana de fibra de vidrio con un cosechador automático [PHD Harvester; Cambridge Technology, Inc., Watertown, MA. (**Fig.23**)], de modo que tan solo las partículas menores de 1.5 µm pueden pasaron a su través. Por tanto, el DNA marcado intacto (con una longitud en el rango de los milímetros o incluso centímetros) no pudo atravesar la membrana y quedó, por tanto, atrapado en el filtro. A mayor tasa de proliferación celular durante la incubación, mayor número de células serán cosechadas y mayor DNA radiactivo será capturado en el filtro de fibra de vidrio. Una vez secos, estos filtros con DNA radiactivo serán colocados posteriormente en viales de contaje con 3 ml de líquido de centelleo (SL 4000; Intertechnique, Fairfield, NJ).

## 6.3. MEDICIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Finalmente, tras un período de 12 h, se determinó la incorporación de timidina-<sup>3</sup>H en un contador de centelleo (Wallac 1409; Perkin-Elmer). Se trata de un contador de centelleo beta que mide la radiactividad en el DNA recuperado de las células contenidas en cada una de las muestras con el fin de poder determinar el grado de división celular que ha ocurrido en respuesta al tratamiento de estudio durante el período de incubación.

Mediante el uso de este aparato se pueden determinar las cuentas por minuto (c.p.m) de las celdas duplicado y los resultados finales evaluados como índice de estimulación (I.E) dado por la relación entre la lectura del control y la muestra.

## 7. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR (MTS)

### 7.1. FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

El estudio de viabilidad celular es un parámetro importante para evaluar respuestas de una población celular frente a estímulos químicos (citotoxicidad). La técnica de viabilidad mediante MTS (tetrazolio/formazán) permite analizar de forma directa la viabilidad celular, mediante una determinación colorimétrica de la actividad metabólica de las células. Se trata de una técnica de cuantificación espectrofotométrica, que se basa en la reducción del compuesto tetrazolio MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-ol)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio; Reactivo de Owen] por parte de NADPH o NADH producidos en reacciones de deshidrogenación en células metabólicamente activas. Al reducirse, se produce un producto coloreado (formazán) soluble en medio de cultivo y cuya producción es, por tanto, directamente proporcional al número de células viables.

### 7.2. PROTOCOLO DE ENSAYO DE VIABILIDAD

La determinación de la viabilidad celular se determinó utilizando el kit comercial *CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Este kit está diseñado para cuantificar de forma no radiactiva y espectrofotométricamente la viabilidad celular en poblaciones celulares usando placas de cultivo de 96 pocillos.

Las células de la granulosa se sembraron a una densidad de 35.000 células/pocillo en placas recubiertas de fibronectina de 96 pocillos y fueron incubadas a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% hasta períodos de 24 y 48 horas. Dos horas antes de finalizar el tiempo de cultivo, se añadió 40 µl del reactivo MTS en cada pocillo. Como control (blanco) se utilizó medio de cultivo sin estímulo junto con el reactivo MTS. Dependiendo del tipo celular debe dejarse reaccionar durante 1-4 horas. En nuestros experimentos, las

muestras se incubaron durante las 2 últimas horas de cultivo a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

### **7.3. MEDICIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS**

Pasadas 2 horas de incubación, las placas se agitaron para homogeneizar las muestras y se procedió a cuantificar la absorbancia del producto de formazán a 490 nm usando un lector de microplacas (Fluostar Omega; BMG Lab Technologies). La absorbancia medida se correlaciona directamente con el número de células viables. Para validar el ensayo, se creó una curva estándar con un número conocido de células y se verificó una correlación lineal ( $r^2 = 0.99$ ;  $P < 0.001$ ).

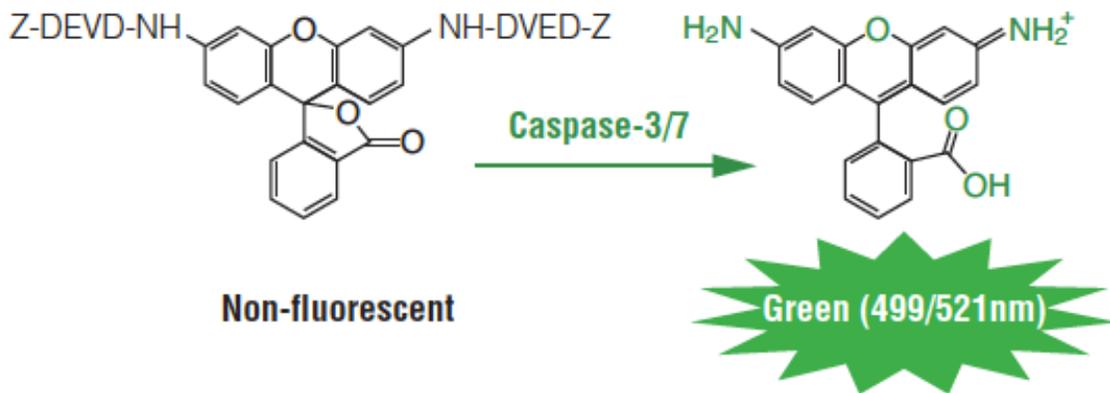
## **8. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LA CASPASA-3/7**

### **8.1. FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA**

La apoptosis juega un papel importante en la fisiología celular, incluyendo la muerte celular programada asociada con el desarrollo, homeostasis de tejidos y algunos aspectos del envejecimiento. Las caspasas pertenecen a una familia de cistein-proteasas que dividen sus sustratos específicamente después del ácido aspártico. Se han identificado 14 caspasas en mamíferos implicadas en la apoptosis. Son sintetizadas como proenzimas (zimógenos de 30-50 Kda) y requieren un proceso de proteólisis para ser activadas, que comprende una cascada de precursores y coenzimas, en la que las caspasas constiuyen los componentes centrales de la maquinaria proteolítica.

De todas las caspasas, la caspasa-3 ha sido caracterizada como la más estrechamente vinculada a la apoptosis. Se ha sugerido que la expresión de la caspasa-3 aumenta la vulnerabilidad a la apoptosis o activa por sí misma la cascada de la apoptosis. Este tipo de caspasa, al igual que la caspasa-7, tiene especificidad por dividir a sus sustratos en el extremo C-terminal en el residuo de aspartato de la secuencia DEVD (Asp-Glu-Val-Asp).

El ensayo de actividad de la caspasa-3/7 permite analizar la apoptosis celular mediante una determinación de fluorescencia. El experimento requiere el uso de un reactivo que se obtiene a partir de la combinación de un tampón y el sustrato profluorescente de rodamina 110, bis-(N-CBZ-L-aspartil-L-glutamil-L-valil-L-ácido aspárticoamida); Z-DEVD-R110). Una vez mezclados y añadido el reactivo resultante a la muestra, se produce la subsiguiente división y retirada de los péptidos DEVD por la actividad de las caspasas-3/7, convirtiéndose el producto resultante en un compuesto altamente fluorescente bajo una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 520 nm (Fig.24).



**Figura 24.** Fundamento del ensayo de la actividad de la caspasa-3/7. División del sustrato no fluorescente de la caspasa Z-DEVD-R110 por las caspasas-3/7 y formación del compuesto fluorescente Rodamina 110.

## 8.2. PROTOCOLO DE ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE LA CASPASA-3/7

La determinación de la actividad de las caspasas-3/7 se llevó a cabo utilizando el kit comercial *Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay* (Promega), siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Las células de la granulosa se sembraron a una densidad de 20.000 células/pocillo en placas recubiertas de fibronectina de 96 pocillos y fueron incubadas a 37°C en una

atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% hasta períodos de 3, 6, 12, 24 y 48 horas. Dado que la actividad de las caspasas-3/7 se evaluó en función del número total de células viables, se añadió 20 µl del reactivo MTS en cada pocillo dos horas antes de finalizar el tiempo de cultivo. Como control (blanco) se utilizó medio de cultivo sin estímulo junto con el reactivo MTS. Una vez finalizado el período de incubación, se procedió a cuantificar la fluorescencia en un lector de microplacas (Fluostar Omega; BMG Lab Technologies).

Posteriormente, se elaboró el reactivo Apo-ONE® Caspase-3/7 mezclando 9.900 µl de buffer Apo-ONE® Caspase-3/7 con 10 µl de sustrato profluorescente de caspasa (proporción 1:100). Una vez hecha la mezcla, se añadió 100 µl por pocillo y se dejó incubar durante 2 horas en un agitador a temperatura ambiente. Como control (blanco) se utilizó medio de cultivo sin estímulo junto con el reactivo Apo-ONE® Caspase-3/7. Pasado este tiempo, se midió la intensidad de fluorescencia en el lector de microplacas (Fluostar Omega; BMG Lab Technologies). Finalmente, se transfirió el medio a una placa negra para evitar interferencias y se repitió la medición en el mismo lector de microplacas.

### **8.3. MEDICIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.**

Pasadas 2 horas de incubación, se midió la fluorescencia de las placas en un lector de microplacas (Fluostar Omega; BMG Lab Technologies) en una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 520 nm. La actividad de las caspasas-3/7 se expresó por el número total de células viables.

## **9. TINCIÓN CON DAPI Y ACTINA F**

### **9.1. FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA**

La tinción de la cromatina nuclear se ha realizado empleando 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina, preferiblemente en secuencias de dsDNA. DAPI puede pasar a través de la membrana celular, debido a eso, se utiliza para teñir células vivas y también células fijadas. La excitación de DAPI con luz ultravioleta permite localizar la cromatina nuclear que aparece de color azul al microscopio de fluorescencia. DAPI es también utilizado como contracoloración de tinción nuclear en el marco de técnicas fluorescentes multicolor. En nuestro trabajo, la tinción del citoesqueleto se ha realizado mediante la tinción de Texas rojo-Faloidina, que permite visualizar de color rojo los filamentos de actina-F bajo el microscopio de fluorescencia.

### **9.2. PROTOCOLO DE TINCIÓN CON DAPI Y ACTINA F**

Las células de la granulosa se sembraron a una densidad de 16.000 células/pocillo en portas de cultivo de 8 pocillos (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) y fueron incubadas a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% en medio enriquecido con suero durante toda la noche. Al día siguiente se cambió el medio de cultivo (450 µl), se añadieron los tratamientos y se incubaron las muestras durante 24 y 48 horas. Una vez finalizado el período de incubación, se llevó a cabo la fijación de las células en un porta con paraformaldehído al 4% en PBS durante 30 minutos. A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS y finalmente se tiñeron con Texas rojo-Faloidina y DAPI (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA).

### **9.3. MEDICIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS**

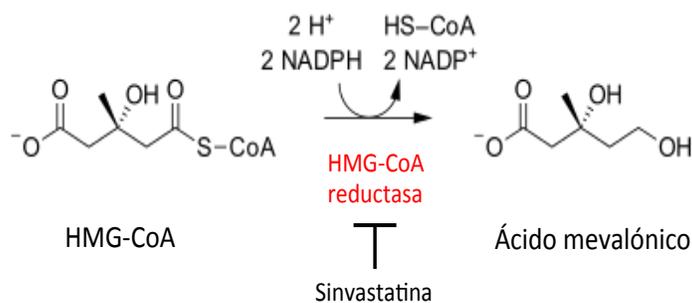
Las placas se examinaron con un microscopio de fluorescencia Olympus BX61 con un aumento 40X (Olympus America, Melville, NY, USA). La apoptosis celular se

definió morfológicamente tanto por la presencia de encogimiento nuclear y condensación o fragmentación de la cromatina a nivel de núcleo como por la presencia de filamentos de actina-F desorganizados y/o desestructurados en el citoesqueleto.

## 10. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE HMGCR

### 10.1. FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

La determinación enzimática de la actividad HMGCR se basa en la reducción de HMG-CoA ácido mevalónico en los microsomas de las células de la granulosa, proceso que requiere la cesión de cuatro electrones a partir de dos moléculas de NADPH (**Fig. 25**). El sustrato HMG-CoA se marca radioactivamente con  $^3\text{H}$  o  $^{14}\text{C}$  y se cuantifican los productos de la reacción. En el presente trabajo, se llevó a cabo dicho ensayo mediante la determinación con sustrato marcado con carbono 14, siguiendo el método descrito anteriormente por *Wong y col.* (284).



**Figura 25.** Reacción de conversión de HMG-CoA en ácido mevalónico. Dicho proceso es catalizado por la enzima HMGCR, inhibida competitivamente por la sinvastatina.

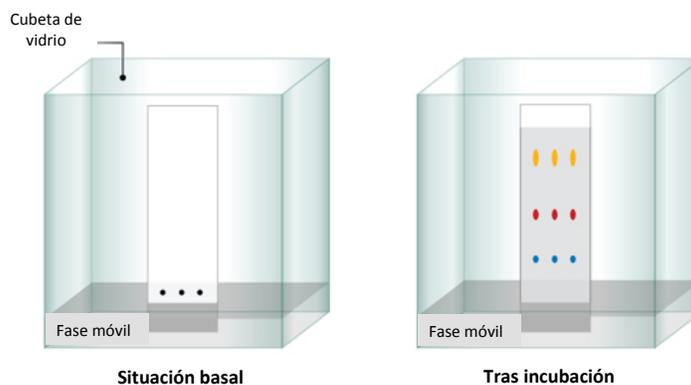
### 10.2. PROTOCOLO DE ENSAYO DE ACTIVIDAD DE HMGCR

Inmediatamente después del aislamiento de las células de la granulosa, se procedió a separar la fracción microsomal de las mismas. Para ello, se transfirieron las

células de la granulosa a tubos Falcon de 50 ml para ser centrifugados a 200 g durante 10 minutos. Tras la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el pellet resultante se resuspendió en 1 ml, se sonicó y se centrifugó nuevamente a 20.000 g a 4°C. Una vez finalizado el proceso, se eliminó el pellet y el sobrenadante se centrifugó a 105.000 g a 4°C, para separar los microsomas del citosol. El sobrenadante fue eliminado y la porción microsomal contenida en el pellet fue resuspendida en un tubo de microcentrífuga.

Una vez aislada, se incubó 30-45 µg de proteína microsomal en ausencia (control) o presencia de resveratrol (30-50 µM) o sinvastatina (1 µM), utilizada como control positivo. Además se añadieron en la reacción 10 µl de NADP 25 mM, 200 mM de glucosa-6-fosfato, 40 µl de fosfato de potasio 200 mM a pH 7.4, y 1 µl (1 U/µl) de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente, se añadió 11 µl de sustrato (500 µl de 10 µCi [3-<sup>14</sup>C]-HMG-CoA con 46 µl de 2.5 mg/ml de HMG-CoA fría) para iniciar la reacción. La reacción se desarrolló durante 60 minutos a 37°C y finalizó añadiendo 10 µl de HCl 5 M seguido de 1 µl (1 mg/µl) de lactona de ácido mevalónico, compuesto que sirvió como estándar interno de la reacción. La reacción se desarrolló durante 30 minutos más a 37°C. A continuación las muestras se centrifugaron a 21.000 g durante 5 minutos. Con ello se consiguió que en la separación cromatográfica de los productos radioactivos, el HMG-CoA y la lactona de ácido mevalónico, sirvieran tanto para visualizar la separación como para aportar masa, actuando como transportadores de los productos radioactivos.

La separación de los productos radiactivos se realizó según el método propuesto por *Shapiro y col.* (347). Alícuotas de 75 µl procedentes de las muestras lactonizadas, enfriadas y centrifugadas, se cromatografiaron en un soporte de silicagel, en capa fina (CCF), en placas de 20x20 cm (Merck, Rahway, NJ). Las placas se activaron previamente por calefacción en estufa a 100°C durante 1 hora. La cromatografía fue de tipo ascendente y se desarrolló en una cubeta de vidrio utilizando como fase móvil cloroformo:acetona a partes iguales (**Fig. 26**).



**Figura 26.** Ensayo de cromatografía de capa fina. Las muestras lactonizadas se cromatografiaron en un soporte de silicagel de manera ascendente en un cubeta de vidrio utilizando una fase móvil de cloroformo:acetona a partes iguales durante la incubación.

### 10.3. MEDICIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Finalizada la cromatografía, las placas se dejaron secar en corriente de aire y se visualizó la separación de las bandas de lactona de ácido mevalónico con ayuda de la tinción de vapor de yodo (Fisher). La zona del silicagel que contenía las bandas de lactona de ácido mevalónico se separó con una espátula metálica y se depositó en viales de contaje con líquido de centelleo (SL 4000; Intertechique, Fairfield, NJ). Finalmente, tras remover suavemente los viales se dejaron reposar unos minutos y se realizó el recuento radiactivo utilizando un contador de centelleo líquido para radiaciones  $\beta$  (Wallac 1409; Perkin-Elmer).

### 11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa informático JMP 9.0 software (SAS, Cary, NC). Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar. Las medias se compararon mediante análisis de la varianza seguido de post-hoc testing utilizando Tukey's HSD Test, considerándose estadísticamente significativos para \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.001$ , como se indica en cada caso. Se realizó transformación logarítmica cuando estimado oportuno.



**CAPÍTULO IV.**  
**RESULTADOS**



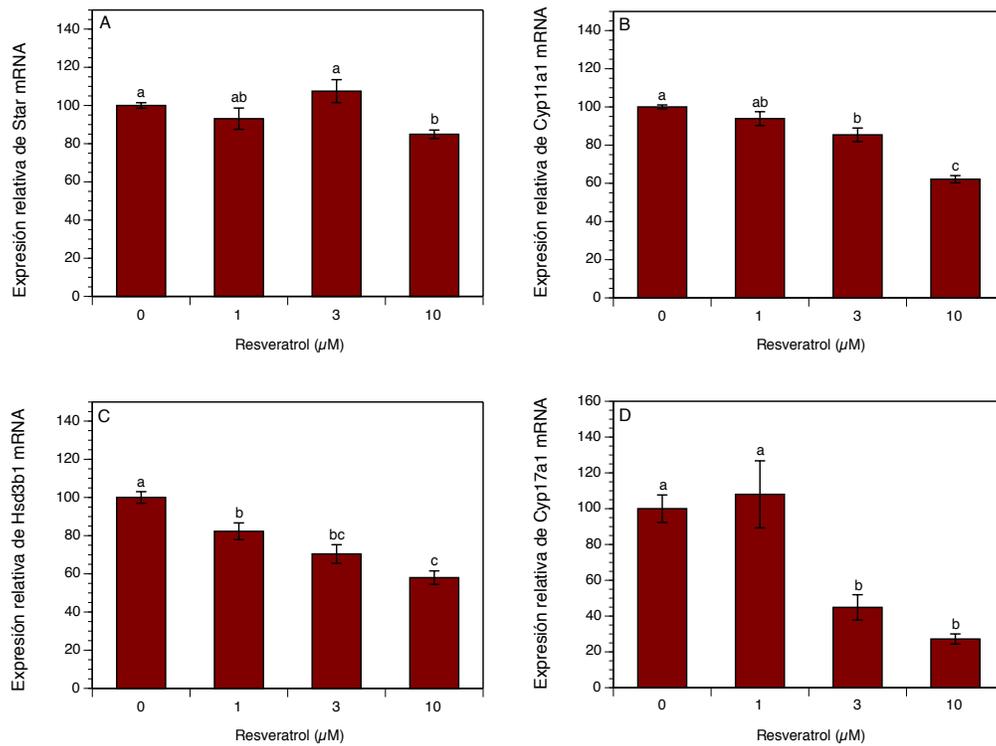
## 1. SUBESTUDIO I

### 1.1. EFECTO DEL RESVERATROL EN LA EXPRESIÓN DE mRNA DE LOS ENZIMAS ESTEROIDOGÉNICOS

Para estudiar el efecto del resveratrol en la expresión génica de las proteínas y enzimas clave en el proceso de esteroidogénesis, las células TI de rata se cultivaron durante 48 horas en ausencia (control) y en presencia de resveratrol a diferentes concentraciones (1-10  $\mu$ M). Para ello se utilizó PCR a tiempo real con los DNAC obtenidos por la retrotranscripción del RNA extraído de los cultivos tratados con resveratrol.

Como se muestra en el **Gráfico 1A**, resveratrol no indujo ningún efecto significativo en la expresión de mRNA de *Star*, excepto un ligero descenso del 15% ( $P < 0.05$ ) comparado con control con la dosis de 10  $\mu$ M. En los mismos experimentos, la exposición de las células al resveratrol indujo un descenso dosis-dependiente en los niveles de mRNA de *Cyp11a1* y *Hsd3b1*, descendiendo en un 38% ( $P < 0.001$ ) y un 42% ( $P < 0.001$ ), respectivamente, con la dosis más alta de resveratrol (**Gráfico 1B-C**).

Sin embargo, la inhibición más potente del resveratrol en la expresión de mRNA se encontró en *Cyp17a1*. Como se observa en el **Gráfico 1D**, resveratrol a dosis de 10  $\mu$ M indujo un descenso significativo de un 73% ( $P < 0.001$ ) en los transcritos de *Cyp17a1* comparado con control.

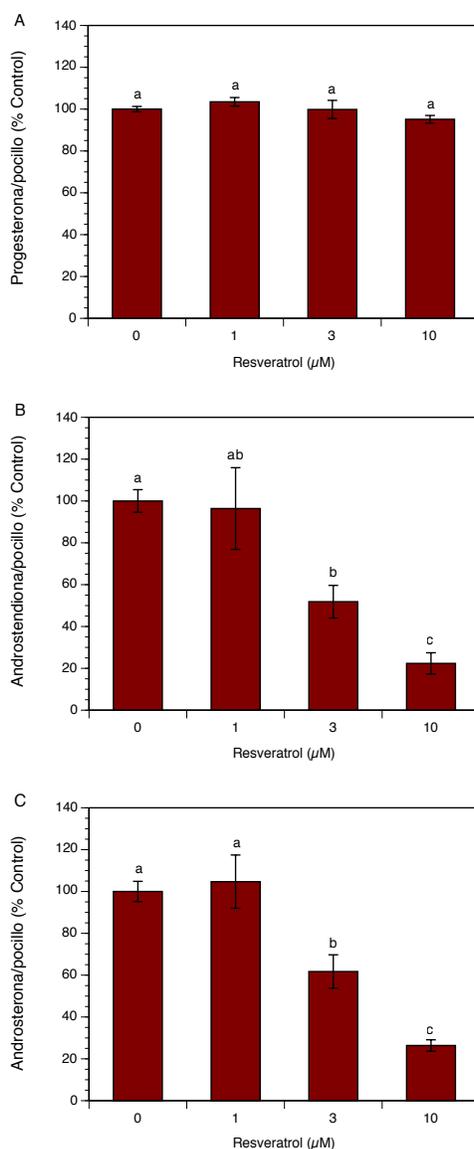


**Gráfico 1.** Efecto de resveratrol (1-10 µM) en la expresión de mRNA de *Star* (A), *Cyp11a1* (B), *Hsd3b1* (C) y *Cyp17a1* (D) en cultivos de células teca intersticiales. Estas fueron cultivadas en medio suplementado con LH (5 ng/ml) durante 48 horas en ausencia (control) o en presencia de resveratrol. Una vez aislado el RNA celular total, la expresión de mRNA se determinó mediante reacciones de PCR a tiempo real, siendo normalizados con mRNA de *Hprt*. Los resultados se muestran como porcentaje de control. Cada barra representa la media ± error estándar de la media de tres experimentos independientes (cuatro réplicas por experimento). Las medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (P<0.05).

## 1.2. EFECTO DEL RESVERATROL EN LA PRODUCCIÓN DE HORMONAS ESTEROIDEAS

El análisis del efecto de las diferentes concentraciones del resveratrol (1-10 µM) en la producción de hormonas esteroideas de las células de la teca intersticiales de rata se llevó a cabo mediante LC-MS. Esta técnica permitió, a partir de los sobrenadantes de medio de cultivo obtenidos del experimento descrito en el apartado anterior, realizar la

determinación de niveles de hormonas esteroideas (progesterona, androstendiona y androsterona) tras períodos de incubación de 48 horas.



**Gráfico 2.** Efecto de resveratrol (1-10 µM) en la producción de esteroides en cultivos de células tecales intersticiales: progesterona (A), androstendiona (B) y androsterona (C). Las células fueron cultivadas en medio suplementado con LH (5 ng/ml) durante 48 horas en ausencia (control) o en presencia de resveratrol. La determinación de esteroides se llevó a cabo mediante LC-MS. Los resultados se muestran como porcentaje de control. Cada barra representa la media ± error estándar de la media de tres experimentos independientes (cuatro réplicas por experimento). Las medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (P<0.05).

Transcurridas 48 horas de cultivo, la exposición de las células a diferentes concentraciones de resveratrol no afectó la producción de progesterona (**Gráfico 2A**). Sin embargo, resveratrol disminuyó los niveles de andrógenos de una manera dosis-dependiente. Como se muestra en los **Gráficos 2B-C**, resveratrol a la máxima dosis (10  $\mu\text{M}$ ) indujo un efecto inhibitorio significativo tanto en la producción de androstendiona como de androsterona, respectivamente, en un 78% ( $P < 0.001$ ) y un 74% ( $P < 0.001$ ).

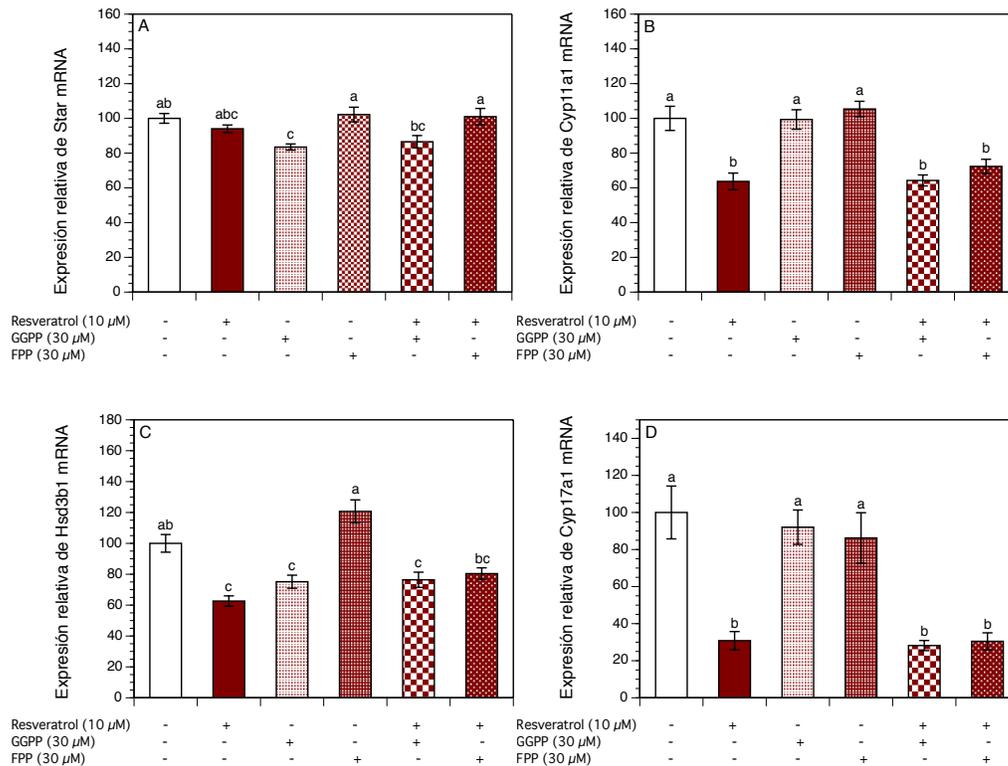
Dado que se ha demostrado que altas concentraciones de resveratrol ( $>30 \mu\text{M}$ ) reducen la proliferación de las células teca intersticiales [60], se tuvo en cuenta el potencial efecto del resveratrol sobre el crecimiento celular a la hora de evaluar el efecto del resveratrol en la esteroidogénesis. Sin embargo, resveratrol no tuvo efecto significativo alguno sobre el crecimiento de células teca intersticiales a las concentraciones evaluadas en este estudio ( $<10 \mu\text{M}$ ). Además, el efecto inhibitorio del resveratrol sobre la producción de andrógenos persistió aún expresando los niveles de esteroides por unidad de proteína medida al final del período de cultivo.

### **1.3. EFECTO DE LOS SUSTRATOS DE ISOPRENILACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE mRNA DE LOS ENZIMAS ESTEROIDOGÉNICOS**

Para evaluar si el efecto que el resveratrol ejerce en la esteroidogénesis está relacionado con el proceso de isoprenilación de proteínas, las células TI de la rata se cultivaron durante 48 horas en ausencia (control) y en la presencia de resveratrol (10  $\mu\text{M}$ ), GGPP (30  $\mu\text{M}$ ) y/o FPP (30  $\mu\text{M}$ ). La elección de la dosis de resveratrol se basó en el experimento previo, donde resveratrol a la dosis de 10  $\mu\text{M}$  mostró un efecto inhibitorio en la expresión de mRNA de todos los genes estudiados. Para ello se utilizó PCR a tiempo real con los cDNA obtenidos por la retrotranscripción del RNA extraído de los cultivos tratados con resveratrol.

Como se muestra en el **Gráfico 3A**, ni el resveratrol ni los sustratos de la isoprenilación, GGPP y FPP, alteraron los niveles de mRNA de *Star*, excepto un ligero descenso del 16% ( $P < 0.05$ ) observado con GGPP. Además, el tratamiento combinado

de GGPP y FPP con resveratrol no ofreció diferencias con respecto a la expresión de mRNA de *Star* obtenido con resveratrol en monoterapia.



**Gráfico 3.** Efecto de resveratrol (10 μM), GGPP (30 μM), y FPP (30 μM) en la expresión de mRNA de *Star* (A), *Cyp11a1* (B), *Hsd3b1* (C) y *Cyp17a1* (D) en cultivos de células tecales intersticiales. Estas fueron cultivadas en medio suplementado con LH (5 ng/ml) durante 48 horas en ausencia (control) o en presencia de resveratrol y/o GGPP o FPP. La expresión de mRNA fue determinada según los pasos descritos en el Gráfico 1. Los resultados se muestran como porcentaje de control. Cada barra representa la media ± error estándar de la media de tres experimentos independientes (cuatro réplicas por experimento). Las medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (P<0.05).

De acuerdo con nuestros experimentos previos, la exposición a resveratrol de las células tecales inhibió significativamente los niveles de mRNA de *Cyp11a1*, *Hsd3b1* y *Cyp17a1*, respectivamente, en un 36%, 37% y 69% (P < 0.001 para todos) por debajo de

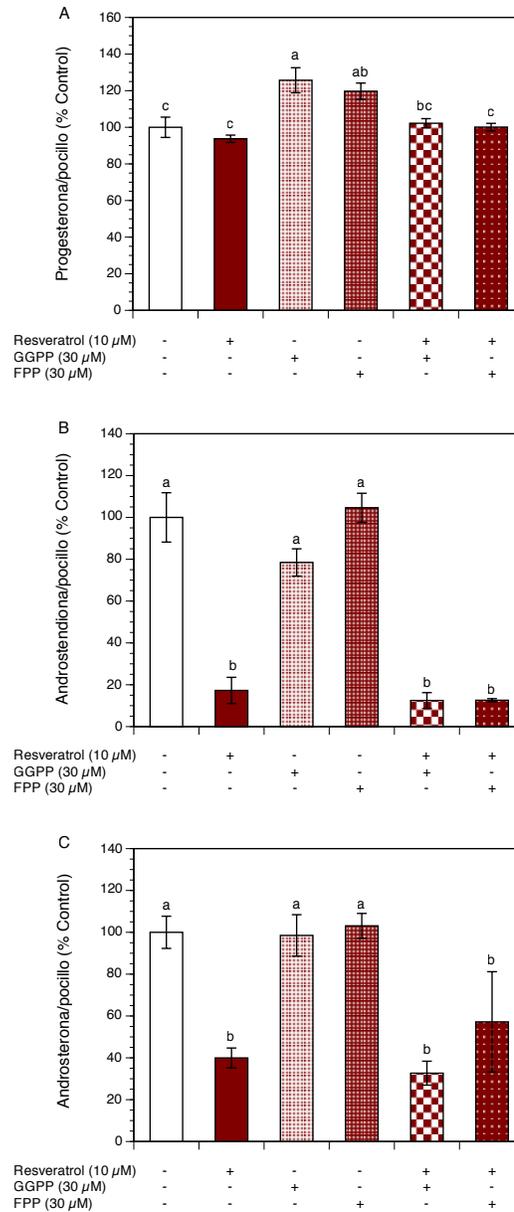
control. En cambio, el tratamiento aislado de GGPP y FPP no indujo cambios en la expresión de mRNA en ninguno de los genes comentados anteriormente, excepto un ligero descenso de un 25% ( $P < 0.05$ ) en los transcritos de *Hsd3b1* con GGPP. La adición de los sustratos de la isoprenilación a los cultivos tratados con resveratrol no revirtió la inhibición de los niveles de mRNA inducida por resveratrol en ningún caso (**Gráficos 3B-D**).

#### **1.4. EFECTO DE LOS SUSTRATOS DE LA ISOPRENILACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE HORMONAS ESTEROIDEAS**

El análisis del efecto de los sustratos de la isoprenilación, GGPP (30  $\mu\text{M}$ ) y FPP (30  $\mu\text{M}$ ) y del resveratrol (10  $\mu\text{M}$ ) en la producción de hormonas esteroideas de las células TI de rata se llevó a cabo mediante LC-MS.

Esta técnica permitió, a partir de los sobrenadantes de medio de cultivo obtenidos del experimento descrito en el apartado anterior, realizar la determinación de niveles de hormonas esteroideas (progesterona, androstenediona y androsterona) tras un período de incubación de 48 horas.

Como se muestra en el **Gráfico 4A**, resveratrol no alteró la producción de progesterona mientras que GGPP y FPP indujeron un modesto aumento en los niveles de progesterona en un 26% ( $P < 0.01$ ) y 20% ( $P < 0.05$ ), respectivamente. El tratamiento combinado de GGPP y FPP con resveratrol no afectó la producción de progesterona.



**Gráfico 4.** Efecto de resveratrol (10  $\mu$ M), GGPP (30  $\mu$ M) y FPP (30  $\mu$ M) en la producción de esteroides en cultivos de células tecales intersticiales: progesterona (A), androstendiona (B) y androsterona (C). Las células fueron cultivadas en medio suplementado con LH (5 ng/ml) durante 48 horas en ausencia (control) o en presencia de resveratrol y/o GGPP or FPP. Los esteroides se determinaron como se describe en el Gráfico 2. Los resultados se muestran como porcentaje de control. Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de la media de tres experimentos independientes (cuatro réplicas por experimento). Las medias con letras distintas son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

Los niveles de androstendiona y androsterona del medio de los mismos experimentos se muestran en los **Gráficos 4B-C**. Resveratrol disminuyó la producción de androstendiona y androsterona en un 83% ( $P < 0.001$ ) y 60% ( $P < 0.001$ ), respectivamente, mientras que el tratamiento aislado con GGPP y FPP no ejerció efecto alguno en los niveles de andrógenos. Además, la adición de GGPP y FPP a los cultivos tratados con resveratrol no revirtió la inhibición en la producción androgénica inducida por resveratrol.

### **1.5. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LAS SIRTUINAS EN LA EXPRESIÓN DE MRNA DE LOS ENZIMAS ESTEROIDOGÉNICOS**

Para determinar si el efecto inhibitor inducido por resveratrol en la esteroidogénesis de las células de la teca es mediado a través de la vía de las sirtuinas (SIRT), se llevaron a cabo nuevos experimentos para evaluar los efectos de los inhibidores específicos de las sirtuinas, nicotinamida y sirtinol, en los genes cruciales reguladores de la esteroidogénesis ovárica. Para ello, las células TI de la rata se cultivaron durante 48 horas en ausencia (control) y en la presencia de resveratrol (10  $\mu$ M), nicotinamida (1 mM) y/o sirtinol (10  $\mu$ M).

El tratamiento con nicotinamida no ejerció efecto alguno en los niveles de mRNA de *Star*, *Cyp11a1* y *Hsd3b1*. Sin embargo, sirtinol inhibió la expresión de mRNA de estos genes, respectivamente, en un 26% ( $P < 0.01$ ), 35% ( $P < 0.05$ ) y 49% ( $P < 0.001$ ). La adición de resveratrol en los cultivos tratados con sirtinol no varió significativamente los niveles de expresión de mRNA de los genes anteriormente descritos en comparación con los niveles conseguidos con tratamiento aislado de sirtinol.

En cuanto a la expresión de mRNA de *Cyp17a1*, resveratrol y ambos inhibidores de las sirtuinas, nicotinamida y sirtinol, redujeron los niveles de los transcritos de *Cyp17a1* en un 83% ( $P < 0.001$ ), 38% ( $P < 0.01$ ) y 63% ( $P < 0.001$ ), respectivamente. La adición de resveratrol a los cultivos tratados con nicotinamida y sirtinol no resultó en diferencias estadísticamente significativas en la expresión de mRNA de *Cyp17a1* comparado con los niveles obtenidos con el tratamiento aislado de resveratrol.

## 1.6. EFECTOS DE LOS INHIBIDORES DE LAS SIRTUINAS EN LA PRODUCCIÓN DE HORMONAS ESTEROIDEAS

El análisis del efecto de los inhibidores de las sirtuinas, nicotinamida (1 mM) y sirtinol (10  $\mu$ M) sin/con resveratrol (10  $\mu$ M) en la producción de hormonas esteroideas de las células TI de rata se llevó a cabo mediante LC-MS. Esta técnica permitió, a partir de los sobrenadantes de medio de cultivo obtenidos del experimento descrito en el apartado anterior, realizar la determinación de niveles de hormonas esteroideas (progesterona, androstenediona y androsterona) tras un período de incubación de 48 horas.

Con respecto a la producción de progesterona, ninguno de los tres compuestos utilizados en el presente estudio disminuyó significativamente los niveles de esta hormona, a excepción del tratamiento combinado con resveratrol y sirtinol que redujo la producción de progesterona en un 23% ( $P < 0.01$ ).

En cambio, tanto resveratrol como los inhibidores de las sirtuinas, nicotinamida y sirtinol, redujeron los niveles de androstendiona en un 71% ( $P < 0.001$ ), 22% ( $P < 0.05$ ) y 49% ( $P < 0.001$ ). La adición de resveratrol a los cultivos tratados con ambos inhibidores no resultó en cambios significativos en los niveles de androstendiona con respecto al grupo tratado con resveratrol.

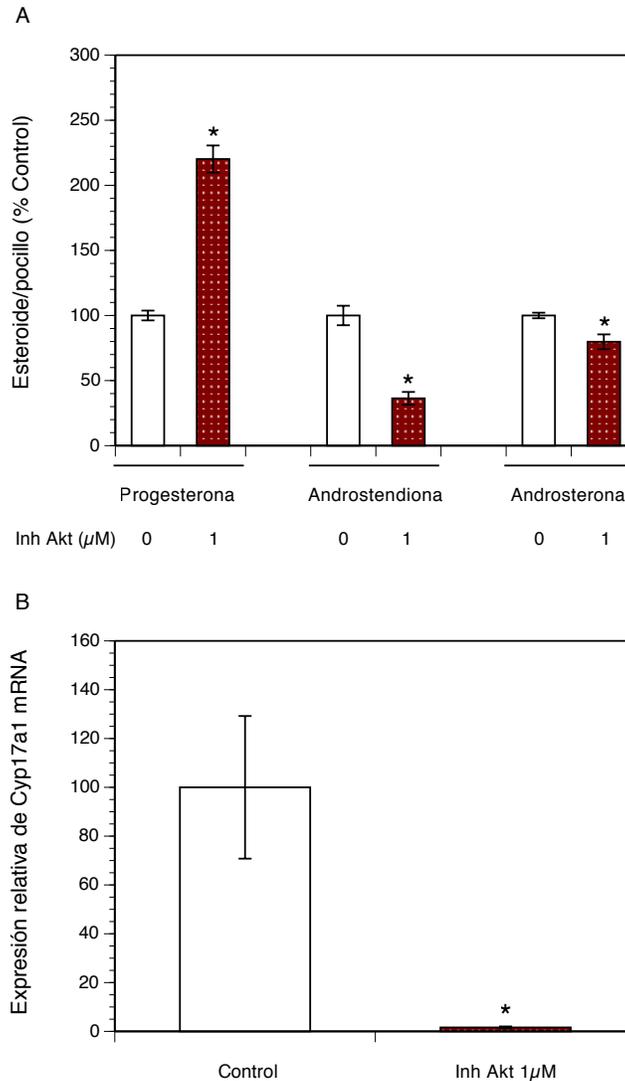
Por último, los niveles de androsterona disminuyeron en un 56% ( $P < 0.001$ ) tras el tratamiento con resveratrol, mientras que permanecieron invariables tras el tratamiento con nicotinamida y sirtinol. El tratamiento combinado de resveratrol con ambos inhibidores no resultó en cambios significativos con respecto al tratamiento aislado con resveratrol.

### 1.7. EFECTOS DE LA VÍA AKT/PKB EN LA ESTEROIDOGÉNESIS

Dado que la inhibición inducida por resveratrol en la esteroidogénesis de las células de la teca de la rata es independiente de las vías de la isoprenilación y activación de las sirtuinas, se llevaron a cabo nuevos experimentos para analizar la cascada de señalización intracelular implicada en dicha inhibición. Teniendo en cuenta que se ha demostrado que la vía de señalización celular Akt/PKB está implicada en la estimulación tanto de la producción de andrógenos como de expresión de mRNA de *Cyp17a1* inducida por LH en células de la teca bovinas (348), se llevaron a cabo nuevos experimentos para evaluar si la actividad Akt está involucrada en la esteroidogénesis de las células de la teca de la rata.

Para ello, las células TI se cultivaron en ausencia (control) o presencia de inhibidor de Akt (1  $\mu$ M) durante 48 horas. Como se muestra en la **Gráfico 5A**, el inhibidor Akt indujo un aumento en la producción de progesterona de 2.2 veces ( $P < 0.001$ ) superior a control, mientras que inhibió los niveles de androstendiona y androsterona en un 64% ( $P < 0.001$ ) y 20% ( $P < 0.05$ ), respectivamente.

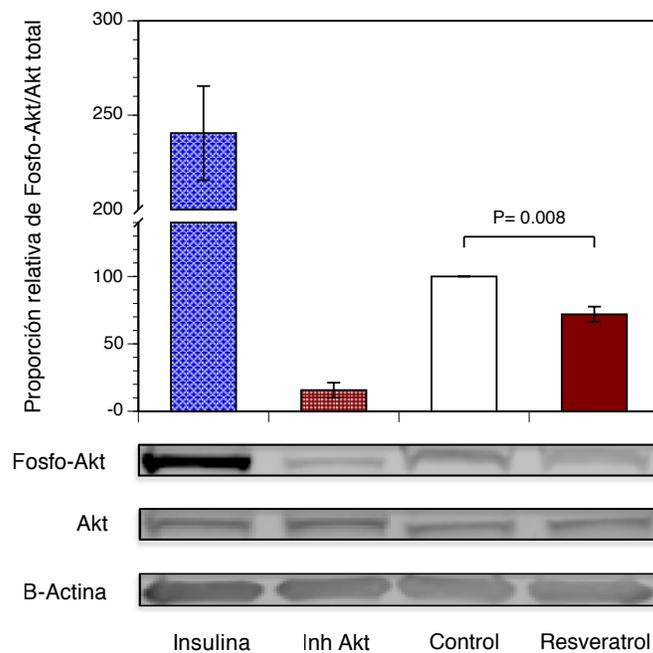
Además, se llevó a cabo un análisis por PCR para evaluar el efecto de la inhibición de la actividad Akt sobre la expresión de mRNA de *Cyp17a1*. El inhibidor de Akt redujo de modo potente la expresión de mRNA de *Cyp17a1* en un 98% ( $P < 0.01$ ) comparado con control (**Gráfico 5B**).



**Gráfico 5.** Efecto del inhibidor de Akt (1  $\mu$ M) en la producción de esteroides (A) y en la expresión de *Cyp17a1* mRNA (B) en cultivos de células teca intersticiales. Los esteroides se determinaron como se describe en el Gráfico 2. La expresión de mRNA se determinó según lo descrito en el Gráfico 1. En ambos experimentos las células fueron cultivadas en medio suplementado con LH (5 ng/ml) durante 48 horas en ausencia (control) o en presencia de inhibidor de Akt. Los resultados se muestran como porcentaje de control. Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de la media de tres experimentos independientes (cuatro réplicas por experimento); \*, implica diferencia estadísticamente significativa con respecto a control ( $P < 0.01$ ). Inh Akt, Inhibidor de Akt.

### 1.8. EFECTO DEL RESVERATROL EN LA FOSFORILACIÓN DE AKT/PKB

Para determinar si la inhibición de la esteroidogénesis inducida por resveratrol está mediada a través de la inhibición de la vía de señalización intracelular Akt/PKB, las células TI fueron cultivadas durante 30 min en ausencia (control) o presencia de resveratrol (10  $\mu$ M). Posteriormente, se examinaron las porciones fosforilada y total de la proteína Akt mediante electroforesis e inmunotransferencia (Western Blot). En los mismos experimentos se incluyeron insulina (0.1  $\mu$ g/ml) e inhibidor de Akt (1  $\mu$ M) como controles positivo y negativo, respectivamente.



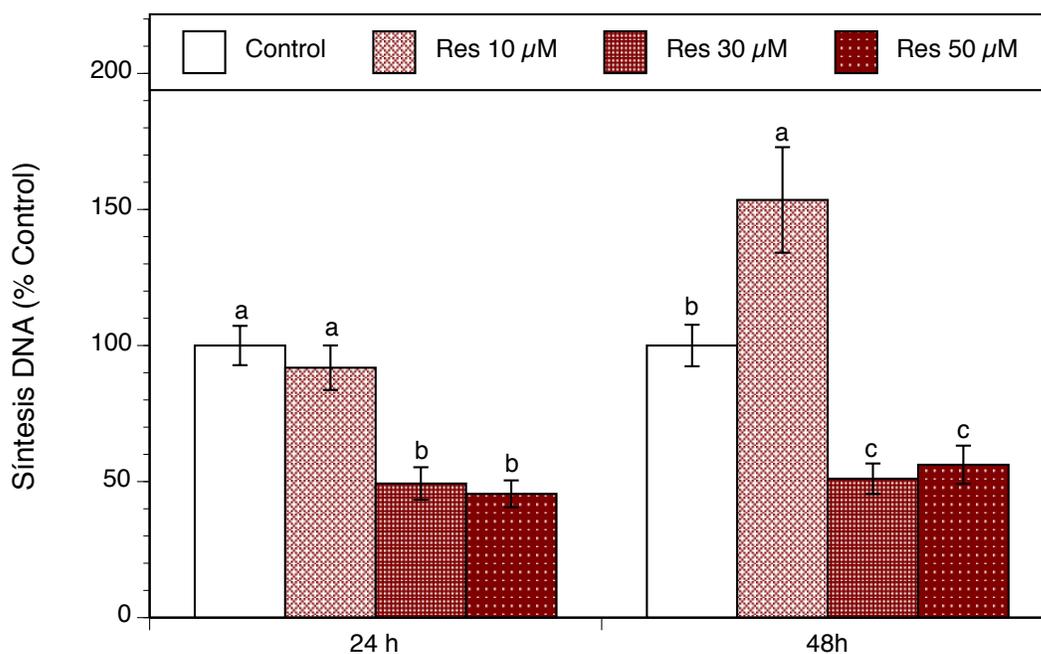
**Gráfico 6.** Efecto de resveratrol (10  $\mu$ M) en la fosforilación de Akt/PKB en cultivos de células teca intersticiales. Éstas fueron cultivadas durante 30 minutos en medio suplementado con LH (5 ng/ml) en ausencia (control) o en presencia de resveratrol. Una vez lisadas, se realizaron estudios de Western blot con anticuerpos específicos para Akt/PKB fosforilado y total. Los resultados se muestran como porcentaje de control. Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de la media de tres experimentos independientes. Se representan las bandas de un experimento representativo.

Como se muestra en el **Gráfico 6**, resveratrol disminuyó la fosforilación de Akt/PKB en un 28% ( $P < 0.01$ ) comparado con control.

## 2. SUBESTUDIO II

### 2.1 EFECTO DEL RESVERATROL EN LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS DE LA GRANULOSA

Para evaluar el efecto del resveratrol en la proliferación celular, las células de la granulosa de la rata se cultivaron durante 24 y 48 horas en ausencia (control) y en presencia de resveratrol a diferentes concentraciones (10-50  $\mu\text{M}$ ). Para ello, la proliferación celular se estudió mediante la determinación de síntesis de DNA a través de la incorporación de timidina.



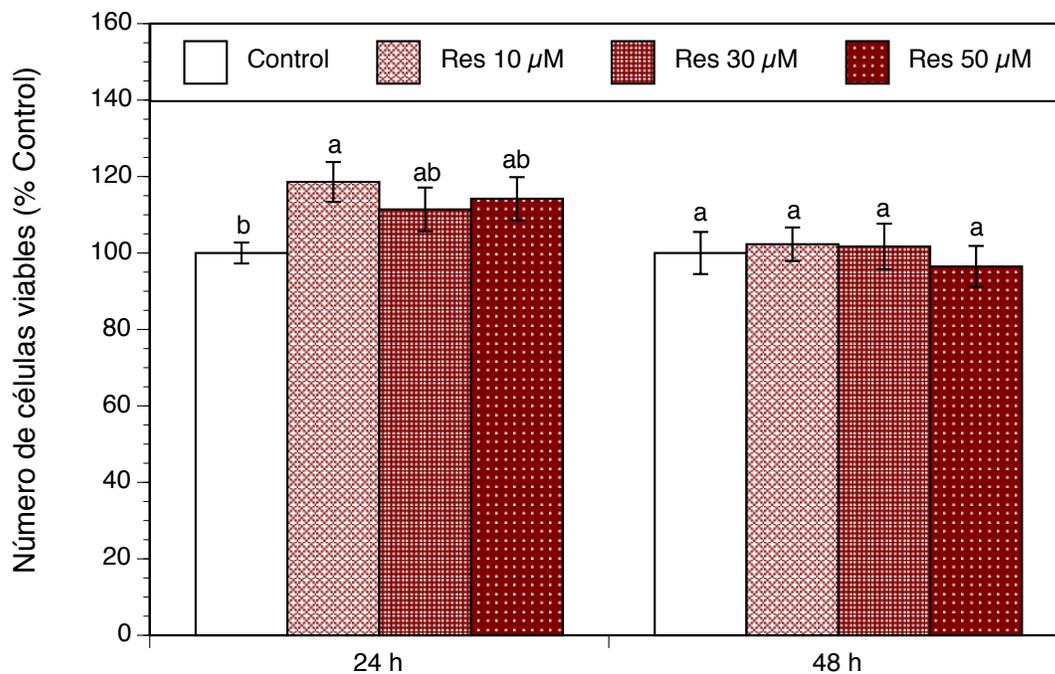
**Gráfico 7.** Efecto de resveratrol (10-50  $\mu\text{M}$ ) en la proliferación de las células de la granulosa. Éstas se cultivaron en medio enriquecido con FSH (30 ng/mL) durante 24 y 48 horas en ausencia (control) o en presencia de resveratrol. La proliferación celular se evaluó mediante la determinación de síntesis de DNA (incorporación de timidina). Los resultados se muestran como porcentaje de control. Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de la media de dos experimentos independientes (ocho réplicas por experimento). Las medias con letras distintas son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

Como se muestra en el **Gráfico 7**, la exposición de las células de la granulosa a dosis de resveratrol comprendidas entre 30 y 50  $\mu\text{M}$  inhibió significativamente la síntesis de

DNA a las 24 horas, hasta en un 55% ( $P < 0.001$ ) a la máxima concentración. Sin embargo, a las 48 horas, resveratrol mostró una acción bifásica, donde bajas concentraciones (10  $\mu\text{M}$ ) estimularon la incorporación de timidina en un 54% ( $P < 0.01$ ), mientras que altas concentraciones (30 y 50  $\mu\text{M}$ ) la disminuyeron en un 49% ( $P < 0.05$ ) y 44% ( $P < 0.05$ ), respectivamente.

## 2.2. EFECTO DEL RESVERATROL EN LA VIABILIDAD CELULAR

Para investigar el efecto del resveratrol en la viabilidad celular, las células de la granulosa de rata se cultivaron durante 24 y 48 horas en ausencia (control) y en presencia de resveratrol a diferentes concentraciones (10-50  $\mu\text{M}$ ). La viabilidad celular se evaluó a través del ensayo MTS.



**Gráfico 8.** Efecto de resveratrol (10-50  $\mu\text{M}$ ) en la viabilidad de las células de la granulosa. Éstas se cultivaron en medio enriquecido con FSH (30 ng/mL) durante 24 y 48 horas en ausencia (control) o en presencia de resveratrol. La viabilidad celular se evaluó mediante la estimación del número de células viables utilizando el ensayo MTS. Los resultados se muestran como porcentaje de control. Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de la media de dos experimentos independientes (ocho réplicas por experimento). Las medias con letras distintas son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

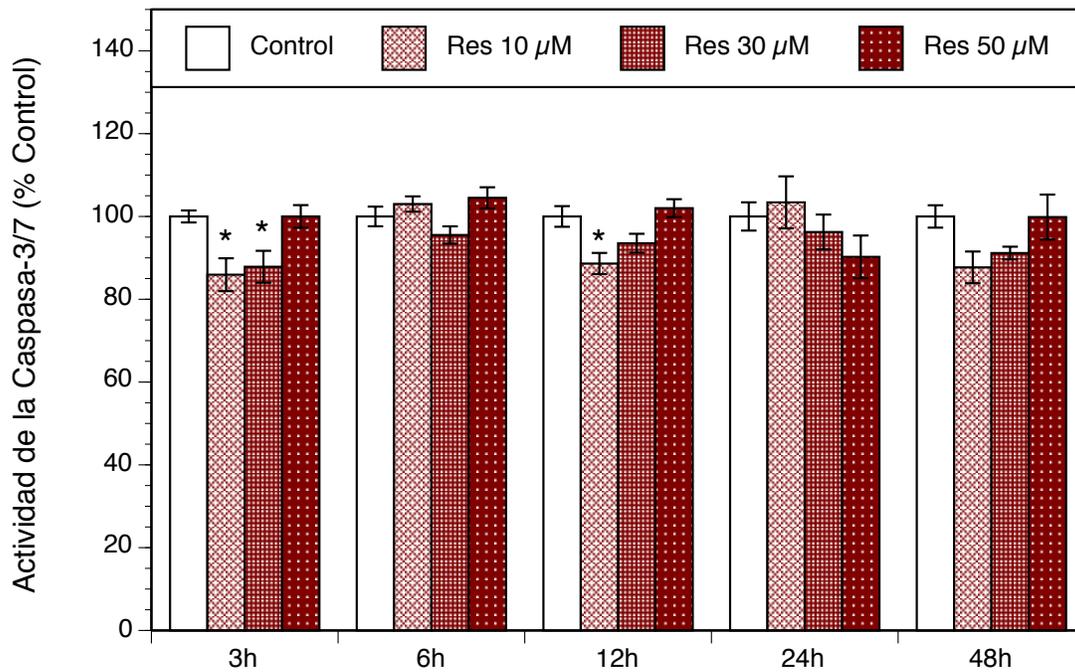
Como se observa en el **Gráfico 8**, resveratrol no ejerce ningún efecto en el número de células viables en ninguno de los tiempos de estudio, excepto un ligero aumento del 19% ( $P < 0.04$ ) producido por dosis de resveratrol de 10  $\mu\text{M}$  tras 24 horas de tratamiento.

### **2.3. EFECTO DEL RESVERATROL EN LA ACTIVACIÓN DE LAS CASPASAS**

Para poder determinar si la apoptosis interviene en el efecto inhibitorio del resveratrol en el crecimiento de las células de la granulosa, se midió la actividad de la caspasa-3/7 en ausencia o en presencia de resveratrol (10-50  $\mu\text{M}$ ) en varios puntos de estudio (3, 6, 12, 24 y 48 horas). La actividad de la caspasa-3/7 se determinó mediante el ensayo de caspasa-3/7 homogénea Promega Apo-ONE®. La actividad de la caspasa se calculó por número de células viables (determinado por el ensayo MTS).

Estos experimentos incluyeron puntos de estudio más tempranos que los experimentos anteriores con el fin de poder determinar posibles acciones precoces del resveratrol que puedan tener efectos acumulativos a largo plazo en otras variables de estudio, tales como la viabilidad celular.

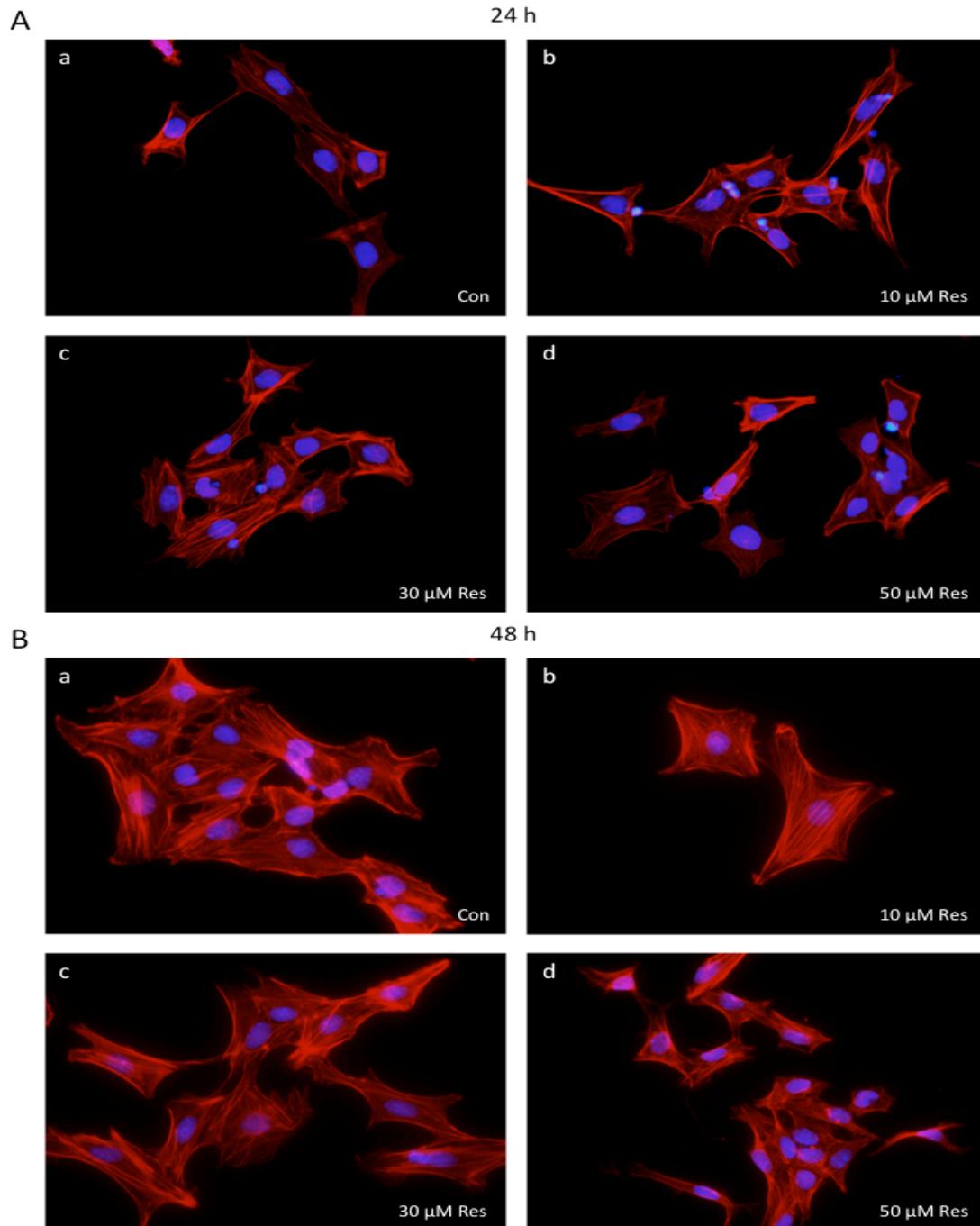
Como se puede observar en el **Gráfico 9**, bajas concentraciones de resveratrol (10  $\mu\text{M}$ ) protegen modestamente a las células de la granulosa de la activación de la caspasa-3/7 a las 3 y a las 12 horas en un 14% ( $P < 0.05$ ) y un 11% ( $P < 0.01$ ), respectivamente. No se observó inhibición de las caspasas tras 24 o 48 horas de tratamiento con resveratrol.



**Gráfico 9.** Efecto de resveratrol (10-50  $\mu$ M) en la actividad de las caspasas efectoras 3 y 7 en las células de la granulosa. Éstas se cultivaron en medio enriquecido con FSH (30 ng/mL) durante 3, 6, 12, 24 y 48 horas en ausencia (control) o en presencia de resveratrol. La actividad de la caspasa-3/7 se determinó mediante el ensayo de caspasa-3/7 homogénea Promega Apo-ONE®. La actividad de la caspasa se calculó por número de células viables (determinado por el ensayo MTS). Los resultados se muestran como porcentaje de control. Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de la media de tres experimentos independientes (ocho réplicas por experimento). \*Diferencia significativa con respecto a control ( $P < 0.05$ ).

#### 2.4. EFECTO DEL RESVERATROL EN LA MORFOLOGÍA CELULAR

Los efectos del resveratrol en la morfología nuclear y citoesqueleto de las células de la granulosa se presentan en la **Figura 27**. Durante la apoptosis, la célula pasa por un proceso de desestructuración, caracterizado por encogimiento celular, condensación de la cromatina, vacuolización de la membrana y pérdida de integridad de las organelas (349, 350). La tinción nuclear se realizó con DAPI, mientras que los cambios morfológicos fueron evaluados con actina F.



**Figura 27.** Efecto de resveratrol (10-50  $\mu$ M) en la morfología celular de las células de la granulosa. Éstas se cultivaron durante 24 horas (A) y 48 horas (B) en ausencia (control) o en presencia de resveratrol, para posteriormente ser fijadas, teñidas y visualizadas con un microscopio de fluorescencia (magnificación de 40x). Tinción nuclear realizada con 4',6-diamidino-2-fenilindol (azul) y cambios morfológicos observados con actina F (rojo). (a) Control; (b) resveratrol 10  $\mu$ M; (c) resveratrol 30  $\mu$ M; (d) resveratrol 50  $\mu$ M.

Como se puede observar en la **Figura 27**, tras 24 y 48 horas de exposición a dosis crecientes de resveratrol (10-50  $\mu\text{M}$ ), la forma de las células de la granulosa permanece inalterable, con núcleos grandes y ovalados y fibras de actina F bien organizadas.

## 2.5. EFECTO DEL RESVERATROL EN LA ESTEROIDOGÉNESIS DE LAS CÉLULAS DE LA GRANULOSA

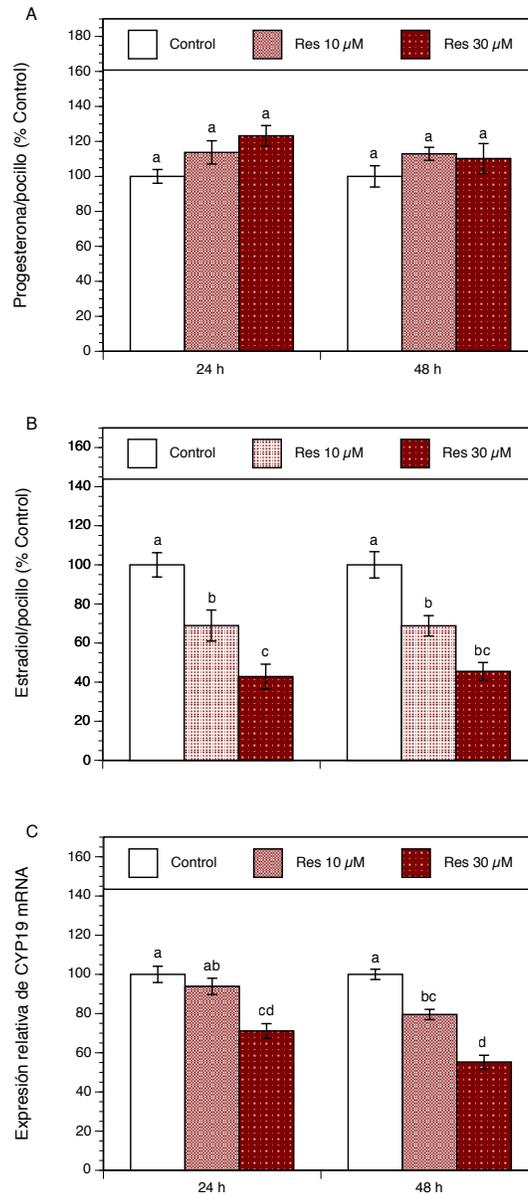
Para determinar el efecto del resveratrol en la producción de esteroides, las células de la granulosa se cultivaron durante 24 y 48 horas en ausencia y presencia de resveratrol (10-30  $\mu\text{M}$ ). Una vez terminado el período de incubación, la producción de hormonas esteroideas en el sobrenadante de cultivos de células de la granulosa de rata se llevó a cabo mediante LC-MS.

Como se muestra en el **Gráfico 10A**, los niveles de progesterona permanecen inalterables tras la administración de diferentes concentraciones de resveratrol en los distintos puntos de estudio. Sin embargo, resveratrol reduce los niveles de estrógenos de manera dosis-dependiente en ambos puntos de estudio: a las 24 horas, dosis de resveratrol de 10 y 30  $\mu\text{M}$  indujeron un efecto inhibitorio significativo en la producción estrogénica del 31% ( $P < 0.01$ ) y 57% ( $P < 0.001$ ), respectivamente, mientras que tras 48 horas de tratamiento, dicho efecto inhibitorio fue del 31% ( $P < 0.05$ ) y del 54% ( $P < 0.001$ ) (**Gráfico 10B**).

Para evaluar el efecto del resveratrol en la expresión de mRNA de la aromatasa en el mismo grupo de experimentos, se llevó a cabo estudios de PCR a tiempo real. La aromatasa citocromo P450 (codificada por el gen *CYP19*) es el enzima clave en la biosíntesis de estrógenos a partir de precursores esteroideos con 19 átomos de carbono y es sintetizada en las células de la granulosa.

Como se puede observar en el **Gráfico 10C**, resveratrol reduce de modo dosis-dependiente la expresión de mRNA de la aromatasa. Después de 48 horas de incubación,

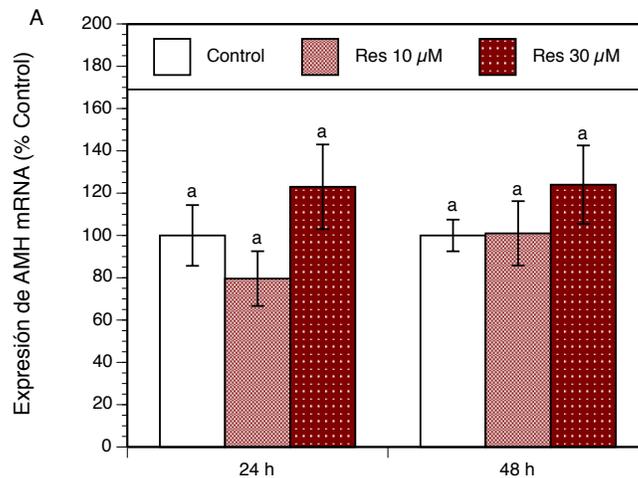
resveratrol a dosis de 10 y 30  $\mu\text{M}$  disminuyó significativamente los transcritos de *Cyp19* en un 20% ( $P<0.05$ ) y en un 45% ( $P<0.001$ ), respectivamente.



**Gráfico 10.** Efecto de resveratrol (10-30  $\mu\text{M}$ ) en la producción de progesterona (A), estradiol (B) y expresión de *Cyp19* mRNA (C) en las células de la granulosa. Éstas se cultivaron en medio enriquecido con FSH (30 ng/mL) y testosterona (0.5  $\mu\text{M}$ ) en ausencia (control) o en presencia de resveratrol durante 24 y 48 horas. Los esteroides se determinaron como se describe en el Gráfico 2. La expresión de mRNA se determinó según lo descrito en el Gráfico 1. Los resultados se muestran como porcentaje de control. Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de la media de tres experimentos independientes (cuatro réplicas por experimento). Las medias con letras distintas son estadísticamente diferentes ( $P<0.05$ ).

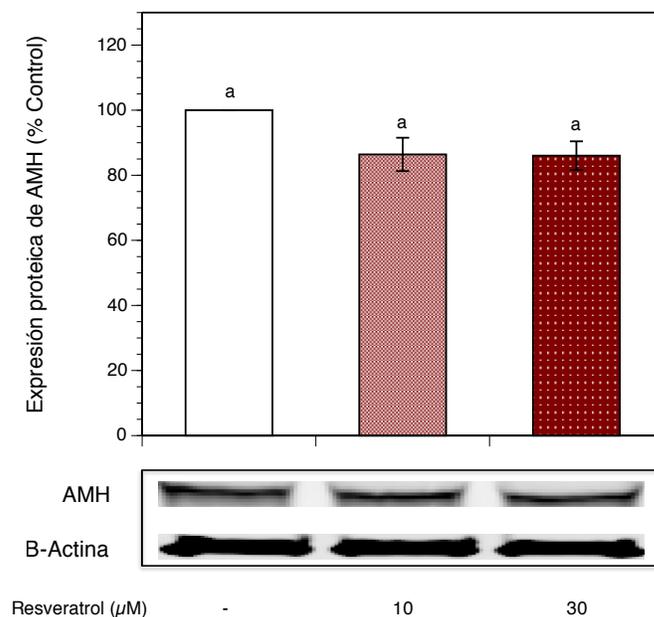
## 2.6. EFECTO DE RESVERATROL EN LA EXPRESIÓN GÉNICA Y PROTEICA DE AMH

Dado que AMH juega un papel importante en el control de la fase de desarrollo folicular independiente de las gonadotropinas, se llevaron a cabo nuevos experimentos para determinar si resveratrol (10 y 30  $\mu\text{M}$ ) ejerce algún efecto en la expresión de mRNA de AMH en las células de la granulosa tras 24 y 48 horas de tratamiento. Como se observa en el **Gráfico 11**, resveratrol no ejerce efecto alguno en la expresión de mRNA de AMH.



**Gráfico 11.** Efecto de resveratrol (10-30  $\mu\text{M}$ ) en la expresión de mRNA de AMH en las células de la granulosa. Éstas se cultivaron en medio enriquecido con FSH (30 ng/mL) y testosterona (0.5  $\mu\text{M}$ ) en ausencia (control) o en presencia de resveratrol durante 24 y 48 horas. La expresión de mRNA se determinó según lo descrito en el Gráfico 1. Los resultados se muestran como porcentaje de control. Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de la media de tres experimentos independientes (cuatro réplicas por experimento). Las medias con letras distintas son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

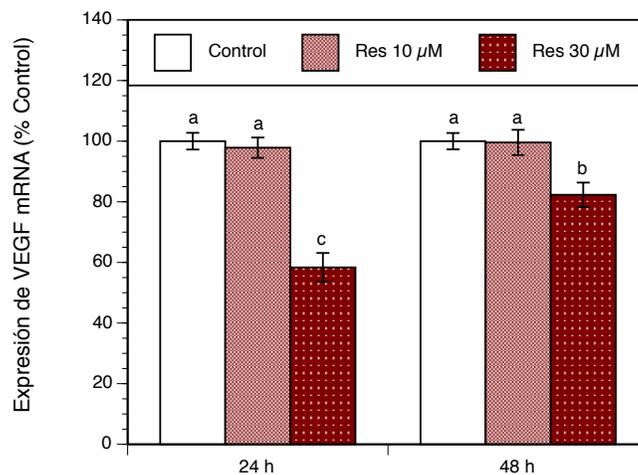
Para examinar si la ausencia de cambios en la expresión de mRNA de AMH tras el tratamiento con resveratrol también se refleja a nivel proteico, las células se cultivaron sin (control) y con resveratrol (10 y 30  $\mu\text{M}$ ) durante 48 horas. Como se presenta en el **Gráfico 12**, tampoco se observaron cambios en la expresión proteica de AMH tras tratamiento con resveratrol.



**Gráfico 12.** Efecto de resveratrol (10-30  $\mu\text{M}$ ) en la expresión proteica de AMH en las células de la granulosa. Éstas se cultivaron en medio enriquecido con FSH (30 ng/mL) y testosterona (0.5  $\mu\text{M}$ ) en ausencia (control) o en presencia de resveratrol durante 48 horas. La expresión proteica fue evaluada mediante el uso de Western blot y normalizado con B-Actina. Uno de los tres blots realizados se muestra en la figura. Los resultados se muestran como porcentaje de control. Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de la media de tres experimentos independientes (una réplica por experimento). Las medias con letras distintas son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

## 2.7. EFECTO DE RESVERATROL EN LA EXPRESIÓN GÉNICA Y PROTEICA DE VEGF.

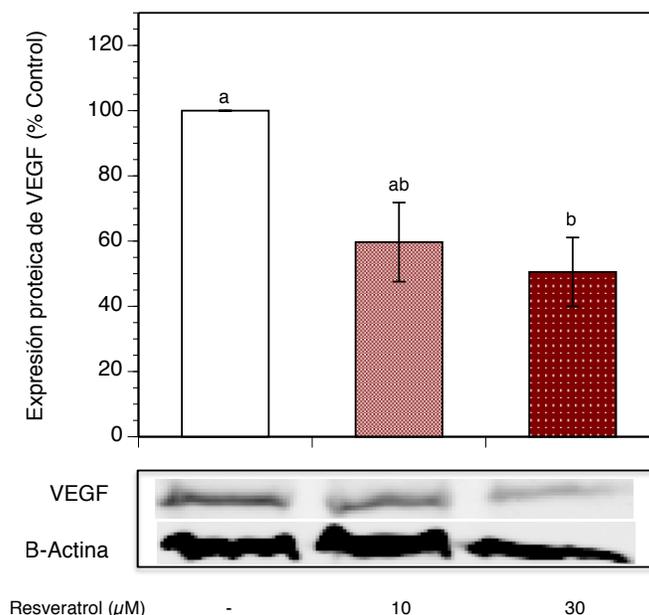
Dado que VEGF es un factor proangiogénico clave implicado en la regulación de la foliculogénesis y en el desarrollo del Síndrome de Hiperestimulación Ovárica (SHO), se evaluó la expresión de mRNA de VEGF tras 24 y 48 horas de tratamiento con resveratrol (10-30  $\mu$ M) a través de la realización de PCR a tiempo real.



**Gráfico 13.** Efecto de resveratrol (10-30  $\mu$ M) en la expresión de mRNA de VEGF en las células de la granulosa. Éstas se cultivaron en medio enriquecido con FSH (30 ng/mL) y testosterona (0.5  $\mu$ M) en ausencia (control) o en presencia de resveratrol durante 24 y 48 horas. La expresión de mRNA se determinó según lo descrito en el Gráfico 1. Los resultados se muestran como porcentaje de control. Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de la media de tres experimentos independientes (cuatro réplicas por experimento). Las medias con letras distintas son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

Como se presenta en el **Gráfico 13**, resveratrol 30  $\mu$ M redujo significativamente la expresión de mRNA de VEGF a las 24 y 48 horas en un 42% ( $P < 0.001$ ) y un 18% ( $P < 0.05$ ), respectivamente.

Para evaluar si la reducción en la expresión génica de VEGF inducida por resveratrol se correlaciona con una reducción en la expresión proteica, las células de la granulosa se cultivaron con/sin resveratrol (10-30  $\mu$ M) durante 48 horas.



**Gráfico 14.** Efecto de resveratrol (10-30  $\mu$ M) en la expresión proteica de VEGF en las células de la granulosa. Éstas se cultivaron en medio enriquecido con FSH (30 ng/mL) y testosterona (0.5  $\mu$ M) en ausencia (control) o en presencia de resveratrol durante 48 horas. La expresión proteica fue evaluada mediante el uso de Western blot y normalizado con B-Actina. Uno de los tres blots realizados se muestra en la figura. Los resultados se muestran como porcentaje de control. Cada barra representa la media  $\pm$  error estándar de la media de tres experimentos independientes (una réplica por experimento). Las medias con letras distintas son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

Como se muestra en el **Gráfico 14**, el análisis por Western Blot demostró que resveratrol 30  $\mu$ M disminuye la expresión proteica de VEGF en un 49% ( $P < 0.03$ ) comparado con control.

## 2.8. EFECTO DEL RESVERATROL EN LA ACTIVIDAD HMGCR

En estudios previos con células de la teca se ha observado cómo resveratrol inhibe la actividad de HMGCR (279). Teniendo en cuenta que HMGCR puede afectar el crecimiento y función celular se han llevado a cabo estudios con el fin de evaluar la actividad de HMGCR en las células de la granulosa en ausencia (control) y presencia de resveratrol (30-50  $\mu$ M) o sinvastatina (1  $\mu$ M; control positivo).

Sinvastatina redujo significativamente la actividad de HMGCR en un 41% ( $P < 0.001$ ); sin embargo, resveratrol no ejerce efecto alguno (actividad de HMGCR de  $110 \pm 3\%$  y  $100 \pm 1\%$  del control para resveratrol 30  $\mu$ M y 50  $\mu$ M, respectivamente).

**CAPÍTULO V.**  
**DISCUSIÓN**



**SUBESTUDIO I**

En el presente subestudio, hemos demostrado que en cultivos de células TI de rata el resveratrol: a) inhibe la producción androgénica de manera concentración-dependiente; b) no altera los niveles de progesterona; c) disminuye la expresión de mRNA de los genes reguladores de la esteroidogénesis, especialmente *Cyp17a1*; d) el efecto inhibitorio sobre la esteroidogénesis inducido por el resveratrol es independiente de vías tales como la isoprenilación y la activación de las sirtuinas; e) la vía del Akt/PKB está implicada en la esteroidogénesis de las células de la teca; f) el resveratrol disminuye la fosforilación de Akt/PKB.

Este es el primer estudio que evalúa el papel del resveratrol en la esteroidogénesis de las células TI. El presente subestudio demuestra que el resveratrol inhibe selectivamente la producción androgénica y la expresión de mRNA los los genes esteroidogénicos clave, especialmente *Cyp17a1*, el gen limitante que regula la vía de biosíntesis de andrógenos. Estos hallazgos están de acuerdo con estudios previos en los que se demostró las acciones inhibitorias de este fitoestrógeno en la esteroidogénesis y otras células productoras de andrógenos. Anteriormente, el grupo de *Supornsilchai* demostró que el resveratrol suprime la esteroidogénesis en células adrenocorticales de rata inhibiendo el citocromo P450 c21-hidroxilasa (351). De modo similar, *Svechnikov y col.* demostraron que el resveratrol atenuaba la esteroidogénesis activada por hCG en cultivos primarios de células de Leydig de rata mediante la supresión de la expresión de *Star* y citocromo P450c17 (352). Por tanto, la exposición de células productoras de esteroides a resveratrol puede inducir efectos endocrinos notables, dando lugar a un descenso en la producción de hormonas esteroideas.

En el presente subestudio, resveratrol inhibió la esteroidogénesis ovárica reduciendo preferentemente la expresión de mRNA de *Cyp17a1*, lo cual podría inducir una acumulación de progesterona y un descenso en la biosíntesis de andrógenos. Sin embargo, no se observaron cambios en los niveles de progesterona en respuesta a resveratrol. Nosotros proponemos que la ausencia de efecto de resveratrol en la

producción de progesterona, comparada con el gran efecto en los niveles de andrógenos, puede estar relacionada con un efecto neto resultante de la disminución de la expresión de mRNA de los genes implicados en la producción de esteroides inducida por resveratrol, tales como *Star*, *Cyp11a1* y *Hsd3b1*, así como de una conversión reducida de progesterona a andrógenos debido a una inhibición profunda de la expresión de mRNA de *Cyp17a1*.

Los isoprenoides son lípidos que pueden ser encontrados en distintos organismos vivos, ejerciendo variadas funciones en procesos fisiológicos de plantas y animales (353). En humanos, los isoprenoides no esteroideos, FPP y GGPP, son productos de la vía del mevalonato. Los isoprenoides a través del proceso de isoprenilación pueden unirse al extremo carboxi de las proteínas, facilitando la unión a la membrana y la función de miembros de la superfamilia de las pequeñas proteínas G (354). Se ha demostrado que esta modificación postraduccional está implicada en muchas funciones celulares tales como proliferación, apoptosis, estrés oxidativo y steroidogénesis (343, 346, 355). Un estudio *in vitro* previo ha demostrado que el resveratrol inhibe la vía del mevalonato reduciendo la expresión y actividad de HMGCR, el paso limitante de la vía del mevalonato, dando lugar a un descenso de los niveles de colesterol, FPP y GGPP. Además, el efecto inhibitorio del resveratrol sobre la proliferación de las células de la teca fue parcialmente revertido mediante la adición de ácido mevalónico, FPP y GGPP (284). Sin embargo, en el presente subestudio, la adición de FPP o GGPP a células tratadas con resveratrol no revirtió la inhibición de la esteroidogénesis de las células de la teca inducida por resveratrol. Por tanto, estos hallazgos sugieren que el resveratrol regula la proliferación y esteroidogénesis de las células de la teca a través de distintos mecanismos.

Las proteínas de la familia Sir2 (sirtuinas) forman una familia altamente conservada de deacetilasas dependientes de NAD<sup>+</sup> sensibles a procesos de oxidación celular que regulan la expresión génica controlando el estado de acetilación de residuos de lisina en histonas, de sustratos no relacionados con las histonas, factores de transcripción y coactivadores transcripcionales (356). En mamíferos, el primer y más

estudiado gen identificado perteneciente a la familia de las sirtuinas fue el homólogo 2 de regulación de información de tipo unión silente (SIRT1) que codifica para el enzima SIRT1, localizado en el núcleo y citoplasma (357). Estudios previos han demostrado que el resveratrol es un activador de SIRT1, ejerciendo efectos beneficiosos sobre el metabolismo glucídico y lipídico y extendiendo la esperanza de vida en moscas, gusanos y roedores (358, 359). En el presente subestudio, planteamos la hipótesis de que el resveratrol podría reducir la esteroidogénesis ovárica a través de la activación de las sirtuinas en las células TI. Sin embargo, el bloqueo de las sirtuinas con inhibidores de SIRT1, tales como sirtinol y nicotinamida, no revirtieron la inhibición en la producción androgénica y en la expresión de mRNA de *Cyp17a1* inducida por resveratrol, indicando que el efecto inhibitor inducido por resveratrol en la esteroidogénesis de las células de la teca no es secundario a la activación de las sirtuinas. En base a estos resultados, especulamos que esta vía podría ser activada por resveratrol de modo diferencial en función del órgano de que se trate, sugiriendo un efecto tejido-dependiente del resveratrol en la activación de las sirtuinas.

La biosíntesis de hormonas esteroideas en las células TI está regulada por la activación de la vía de la Proteína Quinasa A (PKA) por parte de las hormonas tróficas (360). Sin embargo, otras vías de señalización celular diferentes de la vía PKA juegan un papel relevante en la producción de esteroides (361, 362). Akt, también conocida como Proteína Quinasa B (PKB), es una serina/treonina proteína quinasa que interviene en múltiples funciones biológicas, tales como proliferación celular, supervivencia, metabolismo glucídico y en la expresión génica, en respuesta a factores de crecimiento y a otros estímulos extracelulares (363). Sin embargo, poco se sabe en la actualidad sobre el papel de esta vía celular en la esteroidogénesis de las células de la teca. El grupo de *Fukuda* demostró que la activación de la vía Akt/PKB está involucrada en la producción de andrógenos y en la expresión de mRNA de *Cyp17a1* en células de la teca bovinas. Además, la adición de LH, una hormona que sirve como estímulo para la esteroidogénesis de las células de la teca, aumenta tanto la producción de andrógenos como la expresión de mRNA de *Cyp17a1* a través de la fosforilación de Akt (348). En el presente subestudio, el bloqueo de la vía Akt/PKB con un inhibidor selectivo de Akt

bloqueó completamente la producción androgénica y la expresión génica de *Cyp17a1* y aumentó los niveles de progesterona, indicando que la activación de Akt/PKB es necesario para la esteroidogénesis de las células de la teca mediada por LH. Además, hemos demostrado que el resveratrol disminuye significativamente la fosforilación de Akt, sugiriendo que la inhibición de la esteroidogénesis de las células de la teca inducida por resveratrol puede ser debido, al menos en parte, al efecto inhibitorio sobre la fosforilación de Akt/PKB.

Los presentes hallazgos pueden ser de potencial interés terapéutico en condiciones asociadas con hiperplasia de las células de la teca ligada a un aumento de producción de andrógenos, tal y como ocurre en SOP. La cantidad total de andrógenos segregada por el ovario depende de dos factores principales: el número de células productoras de andrógenos y la capacidad esteroidogénica de cada célula individual. Resveratrol puede alterar la esteroidogénesis ovárica tanto reduciendo la capacidad esteroidogénica como disminuyendo el crecimiento y, por tanto, el número de células TI. Los hallazgos del presente subestudio indican que resveratrol disminuye la producción de andrógenos de una manera concentración-dependiente inhibiendo selectivamente la expresión de mRNA de *Cyp17a1*, el gen clave en la biosíntesis de andrógenos, el cual está sobreexpresado en pacientes con SOP. Además, nuestros estudios previos han demostrado que el resveratrol también induce una inhibición del crecimiento celular, disminuyendo el número de células viables y aumentando la apoptosis de las células TI. Por tanto, el resveratrol puede ser de relevancia clínica en SOP debido a sus efectos antiesteroidogénicos y antiproliferativos en células TI.

En resumen, nuestros resultados sugieren que el resveratrol reduce la producción de andrógenos y la expresión de mRNA de *Cyp17a1*, al menos en parte, a través de la inhibición de la fosforilación de Akt/PKB en células TI. Estos hallazgos pueden ser de posible relevancia clínica para aquellas situaciones asociadas con excesiva producción androgénica, tales como SOP, donde el resveratrol podría actuar como un agente terapéutico innovador.

## SUBESTUDIO II

En el presente subestudio, hemos demostrado que en cultivos de células de la granulosa, el resveratrol ejerce efectos diferentes de sus acciones pro-apoptóticas en las células de la teca (235). Concretamente, resveratrol en cultivos de células de la granulosa: 1) induce un efecto bifásico en la síntesis de ADN, donde bajas concentraciones estimula la incorporación de la timidina tritiada y altas concentraciones la disminuye; 2) aumenta ligeramente el número de células viables; 3) disminuye modestamente la activación temprana de las caspasas y no afecta a la morfología celular; 4) no altera los niveles de progesterona pero disminuye la producción estrogénica y la expresión de mRNA de aromatasas de manera concentración-dependiente; 5) no tiene efecto en la expresión de AMH; 6) disminuye la expresión proteica y de mRNA de VEGF; y 7) no afecta la actividad HMGCR.

En la última década, el resveratrol se ha convertido en un potencial agente quimiopreventivo del cáncer ya que interfiere con vías de señalización celular implicadas en la proliferación y supervivencia celular (364). De hecho, numerosos estudios han demostrado el efecto inhibitorio de este bioflavonoide en el crecimiento celular de diversas líneas celulares humanas, tanto primarias (235, 365, 366) como cancerosas (367-369). La inhibición de la proliferación celular inducida por resveratrol puede ser debida a su habilidad para inhibir la actividad de la ribonucleótido reductasa y de la DNA polimerasa, ambas enzimas implicadas en la síntesis de DNA, dando lugar a una inhibición del crecimiento celular en la fase de transición S-G2 del ciclo celular (370, 371). Sin embargo, el efecto del resveratrol en el crecimiento celular no es siempre inhibitorio, dependiendo de la concentración, duración del tratamiento y del tipo celular. En el presente subestudio, resveratrol ejerció un efecto inhibitorio en la síntesis de DNA a las 24 horas, pero cuando la exposición al tratamiento se extendió a las 48 horas observamos un efecto bifásico del resveratrol en la síntesis de DNA: resveratrol aumentó la incorporación de la timidina tritiada a dosis de 10  $\mu$ M, pero la redujo a altas concentraciones. Un efecto bifásico similar del resveratrol en la proliferación celular se ha encontrado previamente en células LNCaP [372], donde bajas concentraciones de

resveratrol (5-10  $\mu\text{mol/l}$ ) estimularon y altas concentraciones (15-30  $\mu\text{mol/l}$ ) inhibieron la síntesis de DNA. Se ha sugerido que este aumento tardío en la incorporación de la timidina tritiada puede ser debido a la entrada de las células en la fase S del ciclo celular, viéndose implicadas vías de señalización celular que actúan durante muchas horas (372).

Este efecto bifásico inducido por resveratrol en las células de la granulosa de la rata contrasta con observaciones previas en células de la TI de rata, donde resveratrol demostró ejercer un potente efecto inhibitor dosis-dependiente en el crecimiento celular después de 48 horas (235). Además, en el mismo estudio, resveratrol disminuyó el número de células de la teca viables, a diferencia del modesto aumento en la viabilidad celular en células de la granulosa observado en el presente subestudio. En conjunto, estos hallazgos sugieren que resveratrol tiene efectos completamente distintos en la proliferación celular en los compartimentos de las células de la teca y de la granulosa.

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso que ocurre en múltiples situaciones, tanto fisiológicas como patológicas (373). La apoptosis comprende la consecución de cuatro fases bien establecidas: activación de las caspasas, fragmentación del DNA internucleosómico, condensación de la cromatina y formación apoptótica (374). En el presente subestudio, hemos observado un modesto descenso en la actividad de las caspasas-3/7 y una ausencia de cambios morfológicos compatibles con apoptosis, sugiriendo que resveratrol no sólo no induce apoptosis, sino que puede proteger a las células de la granulosa de la apoptosis. Estudios previos han demostrado resultados contradictorios respecto al efecto del resveratrol en la apoptosis: resveratrol previene la apoptosis en diversos tipos celulares, incluyendo células embrionarias de la rata y células humanas linfocíticas K562 de la eritroleucemia (375, 376), mientras que ejerce un efecto proapoptótico tanto en líneas celulares primarias como cancerosas (235, 377, 378). Además, resulta interesante observar cómo los efectos del resveratrol en la apoptosis celular pueden ser divergentes en distintos tipos celulares del mismo órgano. En el ovario, estudios *in vitro* previos han demostrado cómo resveratrol aumenta la actividad de las caspasas de ejecución 3 y 7, la fragmentación del DNA e induce cambios morfológicos progresivos, tanto tiempo- como concentración-dependientes, en células TI de la rata

(235). Sin embargo, el presente subestudio ha demostrado cómo resveratrol tiene un efecto mínimo en la apoptosis de las células de la granulosa. Dado que resveratrol ejerce efectos diferentes en la apoptosis en dos compartimentos celulares del folículo ovárico, es probable que pueda afectar el equilibrio entre el número relativo de células de la teca y de la granulosa.

Una regulación adecuada entre la apoptosis y la proliferación celulares es esencial para mantener la homeostasis de un tejido. A la luz de los hallazgos del presente subestudio, se podría especular que el efecto predominantemente antiproliferativo de resveratrol en las células de la granulosa no está relacionado con sus propiedades proapoptóticas, sugiriendo que resveratrol afecta al crecimiento de las células de la granulosa a través de sus efectos citostáticos, pero no citotóxicos. Esta observación puede ser de especial interés en la foliculogénesis ovárica, ya que la interacción bidireccional entre el ovocito y las células de la granulosa adyacentes (tanto del cúmulo como las murales) es crucial para un desarrollo folicular normal (379-381).

De acuerdo con la teoría de las dos células-dos gonadotropinas, la hormona FSH es la responsable de la producción estrogénica en las células de la granulosa mediante la aromatización de los andrógenos previamente sintetizados en las células de la teca (382). En el presente subestudio, resveratrol no ejerce efecto alguno en los niveles de progesterona mientras que induce una disminución concentración-dependiente tanto en la producción de estrógenos como en la expresión de mRNA de la aromatasa en las células de la granulosa. Este hallazgo está en la línea de estudios previos, donde resveratrol indujo un efecto inhibitorio en la expresión génica y en la actividad de la aromatasa en las células placentarias (383), células cancerosas de mama (384), y en células granuloso-luteínicas humanas (385). Aunque el mecanismo subyacente mediante el cual resveratrol ejerce su inhibición en la expresión de la aromatasa es todavía desconocido, se ha sugerido que tanto la unión de dicho compuesto a los receptores estrogénicos y/o la modulación de vías de señalización celular pueden estar implicadas (386). Este efecto inhibitorio del resveratrol en la aromatización difiere de la estimulación de la esteroidogénesis inducida por un análogo hidroxilado del resveratrol observada en un

trabajo previo basado en un modelo de células de la granulosa de cerdo (387). Estas diferencias entre el compuesto parental y el análogo hidroxilado del resveratrol en la esteroidogénesis de las células de la granulosa puede ser debido al hecho de que el grupo hidroxilo podría actuar a un nivel más proximal en la vía de la síntesis de esteroides, por tanto, estimulando tanto la producción de progesterona como de estrógenos.

AMH, un miembro de la familia de los factores de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), es el responsable de la regresión de los conductos de Müller durante el desarrollo fetal masculino (388). En la mujer, la AMH es producida en las células de la granulosa de los folículos ováricos y actúa como marcador de la diferenciación de estas células. Se ha detectado expresión de mRNA de AMH en las células de la granulosa de folículos primarios inmediatamente después de su formación en ratas y ratones neonatales, así como en las células de la granulosa de todos los folículos secundarios preantrales y antrales pequeños. Los niveles de AMH empiezan a disminuir desde el estado de folículo antral pequeño durante el proceso de foliculogénesis (389). En el presente subestudio, resveratrol no tuvo efecto alguno en la expresión de mRNA o proteína de AMH de las células de la granulosa, indicando que no afecta a la diferenciación/maduración de estas células.

VEGF, un potente mitógeno angiogénico, es un importante mediador durante el ciclo ovárico normal y aumenta la permeabilidad de los vasos sanguíneos (390). Además, VEGF juega un papel clave en la patofisiología del SHO, una patología frecuentemente asociada a la presencia de ovarios poliquísticos, donde el VEGF está implicado en el aumento de la permeabilidad vascular y en la migración endotelial a través, al menos en parte, de la modulación de la función de las cadherinas del endotelio vascular (391). En el presente subestudio, resveratrol disminuyó la expresión de mRNA y proteína de VEGF en células de la granulosa. Del mismo modo, otros estudios han demostrado este efecto inhibidor del resveratrol en la expresión de VEGF en numerosas líneas cancerosas humanas (392-394). Además, *Basini et al.* (387) demostraron que el tratamiento de células de la granulosa de cerdo con dos análogos del resveratrol, hidroxilado y metilado, también reducía la producción de VEGF. Estas observaciones pueden ser relevantes para

el tratamiento de numerosas patologías ginecológicas, dado que anomalías en la angiogénesis ovárica contribuye en el SHO visto en mujeres con SOP, así como en la fisiopatología de otras patologías relacionadas con anovulación, infertilidad y endometriosis.

El efecto inhibitor del resveratrol en la producción de estrógenos y VEGF en cultivos aislados de células de la granulosa representa uno de los hallazgos más interesantes del presente subestudio. A la luz de estos resultados, el siguiente paso sería evaluar las acciones del resveratrol *in vivo*, en particular en la esteroidogénesis, así como estudiar los efectos del resveratrol en modelos animales de SHO. Se podría especular que la administración de resveratrol *in vivo* puede reducir la aromatización y mejorar el SHO. Sin embargo, también es posible que el resveratrol pueda tener efectos adversos en la foliculogénesis. Por tanto, este entusiasmo por el valor potencialmente terapéutico del resveratrol debe ser controlado hasta que se concluyan estudios *in vivo*.

Teniendo en cuenta estos comentarios, es posible que los presentes hallazgos puedan tener relevancia clínica en determinadas situaciones asociadas con la presencia de ovarios altamente vascularizados, hiperplasia de las células de la teca y alteración del crecimiento y función de las células de la granulosa, tales como el SOP. En los últimos años, varios estudios han demostrado que la proliferación de las células de la granulosa de mujeres ovuladoras y anovuladoras diagnosticadas con este síndrome está aumentada durante el crecimiento temprano del folículo (395, 396). Además, se han visto diferencias en las tasas de muerte celular y de proliferación de las células de la granulosa en este síndrome (395). Por tanto, se puede especular que el resveratrol puede alterar la proporción de células de la teca con respecto a las células de la granulosa en el folículo ovárico, mediante la inducción de sus efectos antiproliferativo y proapoptótico en las primeras, y por su acción citostática, pero no citotóxica, sobre las segundas. Por otro lado, la sobreexpresión de VEGF observada en la densa hipertecosis estromal en los ovarios poliquísticos se ha asociado con un aumento en el flujo sanguíneo del estroma ovárico (390). Por tanto, el efecto inhibitor del resveratrol en la expresión de VEGF puede ser de potencial relevancia para el tratamiento de patologías relacionadas con aumento de la

permeabilidad vascular y sobreexpresión simultánea de VEGF, como la presente en el SHO.

**CAPÍTULO VI.**  
**CONCLUSIONES**



La presente tesis sobre el estudio del resveratrol en la fisiología del ovario de la rata nos ha permitido llegar a las siguientes conclusiones:

### **Subestudio I**

1. El resveratrol inhibe la producción androgénica en las células TI de una manera concentración-dependiente, sin alterar los niveles de progesterona.
2. El resveratrol disminuye la expresión de mRNA de los genes reguladores de la esteroidogénesis en las células TI, especialmente *Cyp17a1*, el gen limitante en la síntesis de andrógenos en este tipo celular.
3. Este efecto inhibitorio sobre la esteroidogénesis de las células tecaes inducido por el resveratrol es independiente de la inhibición de la isoprenilación y de la activación de las sirtuinas.
4. La vía del Akt/PKB está implicada en la esteroidogénesis de las células de la teca.
5. El resveratrol disminuye la fosforilación de Akt/PKB. Por tanto, la inhibición de la esteroidogénesis de las células de la teca inducida por resveratrol puede ser debido, al menos en parte, al efecto inhibidor sobre la fosforilación de Akt/PKB.

### **Subestudio II**

1. El resveratrol induce un efecto bifásico en la síntesis de DNA de las células de la granulosa, donde bajas concentraciones estimulan la incorporación de la timidina tritiada y altas concentraciones la disminuyen.
2. El resveratrol aumenta ligeramente el número de células de la granulosa viables.

3. El resveratrol disminuye modestamente la activación temprana de las caspasas y no afecta la morfología celular en las células de la granulosa.
4. El resveratrol disminuye el proceso de aromatización en las células de la granulosa de una manera concentración-dependiente.
5. El resveratrol disminuye la expresión proteica y de mRNA de VEGF en las células de la granulosa.
6. Todas estas acciones hacen que el resveratrol sea un tratamiento de potencial relevancia clínica en procesos asociados a producción excesiva de andrógenos, hiperplasia tecal altamente vascularizada y angiogénesis anormal, tal y como ocurre en SOP.

## **CAPÍTULO VII.**

### **ANEXOS**



## Resveratrol Reduces Steroidogenesis in Rat Ovarian Theca-Interstitial Cells: The Role of Inhibition of Akt/PKB Signaling Pathway

Israel Ortega, Jesus A. Villanueva, Donna H. Wong, Amanda B. Cress, Anna Sokalska, Scott D. Stanley, and Antoni J. Duleba

Departments of Obstetrics and Gynecology (I.O., J.A.V., D.H.W., A.B.C., A.S., A.J.D.), School of Medicine, and Department of Molecular Biosciences (S.D.S.), University of California, Davis, California 95616; Instituto Valenciano de la Infertilidad-Madrid (I.O.), 28023 Madrid, Spain; and Department of Gynecology, Obstetrics, and Gynecological Oncology (A.S.), Karol Marcinkowski University of Medical Sciences, 60/701 Poznan, Poland

Polycystic ovary syndrome is characterized by theca-interstitial hyperplasia and increased expression of steroidogenic genes, leading to excessive androgen production. Resveratrol, a natural polyphenol, promotes apoptosis and reduces rat theca-interstitial cell growth, in part by inhibiting the mevalonate pathway and decreasing the availability of substrates of isoprenylation [farnesyl-pyrophosphate (FPP) and geranylgeranyl-pyrophosphate (GGPP)]. This study evaluated the effect of resveratrol on rat theca-interstitial cell steroidogenesis. Because resveratrol may activate sirtuins, this study also investigated whether steroidogenesis was affected by sirtuin inhibitors (nicotinamide, sirtinol). Theca-interstitial cells were cultured with or without resveratrol (1–10  $\mu\text{M}$ ), GGPP (30  $\mu\text{M}$ ), FPP (30  $\mu\text{M}$ ), nicotinamide (1 mM), and/or sirtinol (10  $\mu\text{M}$ ). Resveratrol did not affect progesterone levels but reduced androgen production in a concentration-dependent fashion (androstenedione by up to 78% and androsterone by up to 76%). This inhibitory effect correlated with a decrease in mRNA expression of genes regulating androgen production, especially *Cyp17a1* (by up to 73%). GGPP and FPP had no effect on androgen levels and *Cyp17a1* mRNA levels and did not alter the effects induced by resveratrol. Similarly, sirtuin inhibitors did not reverse resveratrol-induced inhibition of steroidogenesis. However, resveratrol decreased activity of serine-threonine kinase/protein kinase B pathway, a cell-signaling pathway involved in ovarian steroidogenesis. The present findings indicate that resveratrol reduces androgen production primarily by inhibiting *Cyp17a1* mRNA expression, and this inhibition may be mediated, in part, by blocking the activity of the serine-threonine kinase/protein kinase B pathway. These findings may be of clinical relevance to conditions associated with excessive production of androgens by theca cells, such as polycystic ovary syndrome. (**Endocrinology** 153: 4019–4029, 2012)

Theca cells play a prominent role in ovarian steroidogenesis by producing aromatizable androgens under the primary control of LH, which are subsequently used by granulosa cells for estrogen biosynthesis. Thecal differentiation involves the regulated expression of a variety of specific genes coding for the LH receptor as well as the proteins and enzymes involved in the androgen biosynthesis pathway, such as steroidogenic acute regulatory

protein (StAR) (encoded by *STAR* gene), cholesterol side chain cleavage enzyme (P450<sub>sc</sub>; encoded by the *CYP11A1* gene), 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (type I or II; encoded by *Hsd3b1* gene in the rat and *HSD3B2* gene in human, respectively), and cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase/C17-20 lyase (P450<sub>c17</sub>) (encoded by *CYP17A1* gene) (1). Unlike other above-listed genes, *CYP17A1* gene is expressed in theca but not granulosa cells and is the

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170  
Printed in U.S.A.

Copyright © 2012 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/en.2012-1385 Received April 7, 2012. Accepted May 31, 2012.

First Published Online June 19, 2012

Abbreviations: Akt, Serine-threonine kinase; FPP, farnesyl-pyrophosphate; GGPP, geranylgeranyl-pyrophosphate; *Hprt*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase; P450<sub>c17</sub>, cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase/C17-20 lyase; PCOS, polycystic ovary syndrome; PKB, protein kinase B; SIRT, silent mating type information regulation-2 homolog; StAR, steroidogenic acute regulatory protein.

rate-limiting step required for androgen biosynthesis, catalyzing the conversion of progestins into androgens (2).

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common endocrine disorder affecting approximately 5–10% of women of reproductive age (3, 4). Ovaries of women with PCOS are enlarged and characterized by prominent theca-interstitial hyperplasia and excessive production of androgens due to increased steroidogenic activity and excessive transcription of genes regulating androgen production, as reflected by increased levels of individual mRNA as well as enhanced promoter activities (5). Steroidogenic abnormalities associated with theca cells from women with PCOS were evaluated in long-term cultures, demonstrating increased  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type II and P450c17 enzyme activities as well as increased *CYP11A1*, *HSD3B2*, and *CYP17A1* mRNA expression (6–9). Clinical studies suggest that enhanced P450c17 enzyme activity and expression may account for hyperandrogenism in PCOS (10, 11). In addition, dysregulation of several signal-transduction pathways has been shown to play a pivotal role in androgen excess in PCOS women, including the MAPK, protein kinase C, and serine-threonine kinase (Akt)/protein kinase B (PKB) pathways (10, 12, 13).

Resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene) is a naturally occurring phenolic phytoalexin abundantly found in grapes, red wine, peanuts, and several medicinal plants with diverse biochemical and physiological properties, such as chemopreventive, antiinflammatory and antioxidant, as well as cardioprotective and neuroprotective effects (14–17). Additionally, rat *in vitro* studies have shown that resveratrol exerts an inhibitory effect on steroidogenesis in different cell types, including adrenocortical and Leydig cells (18, 19). Several signal transduction pathways are involved in resveratrol-mediated effects on cell functions. Recently, our group has demonstrated that resveratrol reduces proliferation of theca-interstitial cells, at least in part, by inhibition of the mevalonate pathway (20). We found that resveratrol inhibits both activity and expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, the rate-limiting step of cholesterol synthesis, leading to a decreased availability of several downstream products, such as cholesterol and substrates of isoprenylation [farnesyl-pyrophosphate (FPP) and geranylgeranyl-pyrophosphate (GGPP)] (20). Other effects of resveratrol may involve different mechanisms. For example, resveratrol has been shown to extend lifespan in worms, flies, and mice through activation of sirtuins (21, 22), a family of nicotinamide adenine dinucleotide<sup>+</sup>-dependent deacetylases implicated in several important cellular processes, such as genomic stability, DNA repair, transcriptional silencing, and glucid and lipid metabolism (23, 24).

The aim of the present study was to evaluate the effects of resveratrol on rat theca-interstitial cell steroidogenesis and to determine the role of substrates of isoprenylation, inhibitors of sirtuins, and the Akt/PKB signaling pathway in this process.

## Materials and Methods

### Animals

Female Sprague Dawley rats were obtained at age 22 d from Charles River Laboratories (Wilmington, MA) and housed in an air-conditioned environment and a 12-h light, 12-h dark cycle. All animals received standard rat chow and water *ad libitum*. At the age of 27, 28, and 29 d, the rats were injected with 17 $\beta$ -estradiol (1 mg/0.3 ml of sesame oil sc) to stimulate ovarian development and growth of antral follicles. Twenty-four hours after the last injection, the animals were anesthetized using ketamine and xylazine (ip) and euthanized by intracardiac perfusion using 0.9% saline. All treatments and procedures were carried out in accordance with accepted standards of human animal care as outlined in the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and a protocol approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the University of California, Davis.

### Cell culture and reagents

The collection and purification of ovarian theca-interstitial cells were performed as described previously (25, 26). Briefly, the ovaries were removed from the animals and dissected free of oviducts and fat under a dissecting microscope. After a 60-min collagenase digestion, theca-interstitial cells were purified using discontinuous Percoll gradient centrifugation. The cells were counted, and viability, as assessed by the trypan blue exclusion test, was routinely in the 90–95% range. Theca-interstitial cells were incubated in 24-well fibronectin-coated plates at a density of 400,000 cells/well. The cultures were carried out for 48 h at 37 C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> humidified air in serum-free McCoy's 5A culture medium supplemented with 1% antibiotic/antimycotic mix, 0.1% BSA, and 2 mM L-glutamine. The above-mentioned time point was chosen based on our previous work evaluating rat theca-interstitial cell steroidogenesis (27). The cells were incubated in the absence (control) or in the presence of resveratrol (1–10  $\mu$ M), FPP (30  $\mu$ M), GGPP (30  $\mu$ M), nicotinamide (1 mM), sirtinol (10  $\mu$ M), insulin (0.1  $\mu$ g/ml), and Akt inhibitor (1  $\mu$ M). The concentrations of these compounds were selected based on previous studies (28, 29). All cultures were carried out in the presence of ovine LH (5 ng/ml). All above chemicals were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) except for Akt inhibitor (Akt inhibitor VIII, Isozyme-Selective, Akti-1/2), which was purchased from Calbiochem Co. (Gibbstown, NJ), and LH, which was obtained from the National Hormone and Pituitary Program at the Harbor-University of California, Los Angeles Medical Center (Torrance, CA).

Androstenedione, androsterone, progesterone, and the deuterated derivative of androstenedione-d7 were obtained from Steraloids (Newport, RI), whereas testosterone-d3 was obtained from Cerilliant (Round Rock, TX). Acetonitrile and methanol were HPLC grade and obtained from Burdick and Jackson (Mus-

kesgon, MI). Acetone, isopropanol, and ammonium hydroxide were Optima grade and obtained from Fisher (St. Louis, MO). Formic acid was American Chemical Society grade and obtained from EMD (Gibbstown, NJ).

### Total RNA isolation and quantitative real-time PCR

Total RNA was isolated using the MagMAX-96 Total RNA Isolation kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) and the King-Fisher robot (Thermo Scientific, Vantaa, Finland). RT of total RNA to cDNA was performed using High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit for RT-PCR (Applied Biosystems). PCR were set up in 28- $\mu$ l volumes, consisting of 5  $\mu$ l of cDNA, 4.5- $\mu$ l forward and 4.5- $\mu$ l reverse 900 nm primers, and 14  $\mu$ l of 2 $\times$  SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems).

Quantitative RT-PCR reactions were performed in triplicate using the ABI 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Separate cDNA dilutions were included in each PCR run to generate standard curves. Data were analyzed using SDS 1.4 software (Applied Biosystems). The relative amount of target mRNA was expressed as a ratio normalized to hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*Hprt*). The primer sequences were as follows: rat *Star* forward (5'-GCC TGA GCA AAG CGG TGT C-3') and reverse (5'-CTG GCG AAC TCT ATC TGG GTC TGT-3'); rat *Cyp11a1* forward (5'-GCT GGA AGG TGT AGC TCA GG-3') and reverse (5'-CAC TGG TGT GGA ACA TCT GG-3'); rat *Hsd3b1* forward (5'-CCA GAA ACC AAG GAG GAA T-3') and reverse (5'-CCA GAA ACC AAG GAG GAA T-3'); rat *Cyp17a1* forward (5'-ACT GAG GGT ATC GTG GAT GC-3') and reverse (5'-CCG TCA GGC TGG AGA TAG AC-3'); and rat *Hprt* forward (5'-TTG TTG GAT ATG CCCTTGACT-3') and reverse (5'-CCG CTG TCT TTT AGG CTT TG-3').

### Sample preparation and processing for quantification of steroids

Each sample was directly assayed; the following extraction procedure was applied to each specimen. Each sample aliquot (300  $\mu$ l) was placed in a 2.0-ml autosampler vial and spiked with 150  $\mu$ l of internal standard solution, *i.e.* androstenedione-d7 and testosterone-d3. Detection and quantitation of all analytes was accomplished using selective reaction monitoring.

### Mass spectrometry

We have developed a novel turbulent flow chromatography HPLC-mass spectrometry/mass spectrometry method that allows the simultaneous detection of androstenedione, androsterone, and progesterone. It consists of a high-pressure liquid chromatography instrument configuration multiplexing Thermo Aria TLX-2 turbulent flow chromatography (two loading pumps and two eluting pumps, Shimadzu LC-10AD) system and an autosampler outfitted with a 300-position Peltier tray (Franklin, MA), coupled to a Thermo Scientific TSQ Vantage triple quadrupole mass spectrometer (Thermo Scientific, San Jose, CA), equipped with a heated electrospray ionization source. The instrument was controlled using Aria software (version 1.6.1). A Thermo Cyclone P extraction column (0.5  $\times$  50 mm, 60- $\mu$ m particle size; Franklin, MA) was used for online sample extraction of diluted serum, and HPLC separation was carried out by a 2.1  $\times$  100-mm, 3- $\mu$ m particle size ACE C18 column protected by a reverse phase guard cartridge (Mac-Mod,

Chadds Ford, PA) contained within a Hot Pocket column heater (Thermo Scientific).

Precursor and product ions for each target analyte were chosen for selective reaction monitoring transitions, and the related parameters for the different analytes were isolated by HPLC separation based on the following mobile-phase gradient: solvent A, water containing 0.1% formic acid; B, methanol; C, acetonitrile/isopropyl alcohol/acetone 60/30/10; and D, water/acetonitrile (98/2 vol/vol) with 0.1% ammonium hydroxide.

Detection and quantification employed select reaction monitoring liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry transitions of initial precursor ions for androstenedione, androsterone, and progesterone mass to charge ratio (*m/z*) 287.2, 291.4, and 315.2, respectively. The response for the major product ions for each of the analytes was plotted and peaks at the proper retention time integrated using LCQuan. This software was used to generate calibration curves and quantitate the analytes in all samples. The concentrations of androstenedione, androsterone, and progesterone in each sample (*e.g.* calibrators, quality control, and unknowns) were determined by an internal standard method using the peak area ratio and linear regression analysis. The responses for androstenedione, androsterone, and progesterone were linear and gave correlation coefficients of 0.99 or better.

### Western blot analysis

Cells were incubated in microcentrifuge tubes without (control) or with resveratrol (10  $\mu$ M) for 30 min. At the end of the treatment, cells lysates were prepared as previously described (30). Protein concentrations were determined using Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA). For immunoblot analysis, samples containing equal amounts of protein (65  $\mu$ g) were resolved in 12% SDS-PAGE gels and transferred to a nitrocellulose membrane by electroblotting. Blots were blocked at room temperature for 1 h using blocking buffer (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) and incubated with rabbit monoclonal phospho-PKB antibody [phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP rabbit monoclonal antibody no. 4060S; Cell Signaling Technology, Beverly, MA] overnight at 4 C (1:500 in blocking buffer). After incubation, the membranes were washed three times with PBS and incubated with goat antirabbit IgG antibody for 1 h at room temperature (1:10,000 in blocking buffer). To determine the total amount of PKB in each sample, membranes were incubated with mouse monoclonal total-PKB antibody [Akt (pan) 40D4 mouse monoclonal antibody no. 2920; Cell Signaling Technology] overnight at 4 C (1:500 in blocking buffer) and primary antibody to  $\beta$ -actin (Monoclonal Anti-Actin Clone AC-40 Purified Mouse Immunoglobulin A3853; 1:40,000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for 1 h. After washing three times with PBS, the blots were incubated with goat antimouse secondary antibody for 1 h at room temperature (1:40,000 in blocking buffer). Blots were developed with the Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences).

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using JMP 9.0 software (SAS, Cary, NC). Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. Means were compared by ANOVA followed by *post hoc* testing using Tukey's honestly significant difference test. When appropriate, data were logarithmically transformed. A value of  $P < 0.05$  was considered statistically significant. Each experiment was repeated at least three times.

## Results

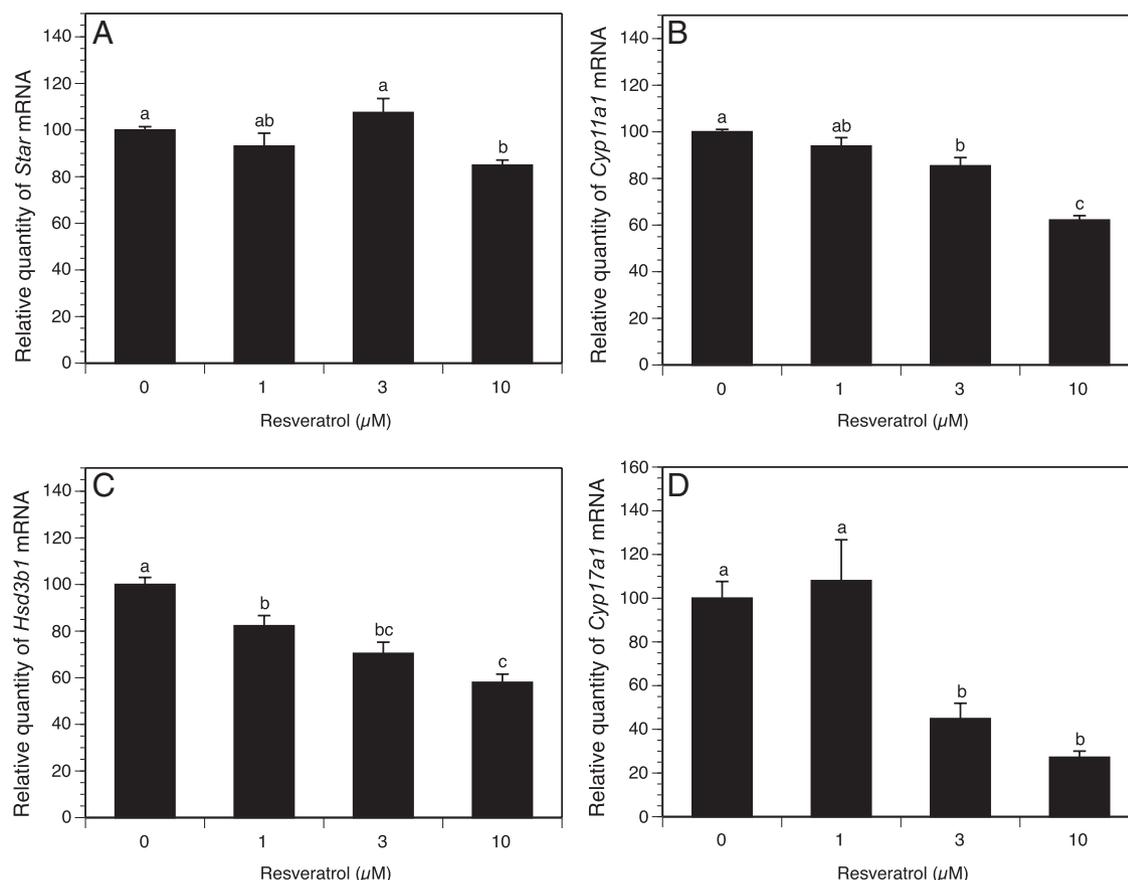
### Effect of resveratrol on steroidogenesis

To determine whether resveratrol affects the expression of the key genes involved in the regulation of steroidogenesis, theca-interstitial cells were cultured for 48 h in the absence (control) or presence of resveratrol (1–10  $\mu\text{M}$ ). As shown in Fig. 1A, resveratrol had no significant effect on *Star* mRNA expression, except for a slight decrease by 15% ( $P < 0.05$ ) at a concentration of 10  $\mu\text{M}$ .

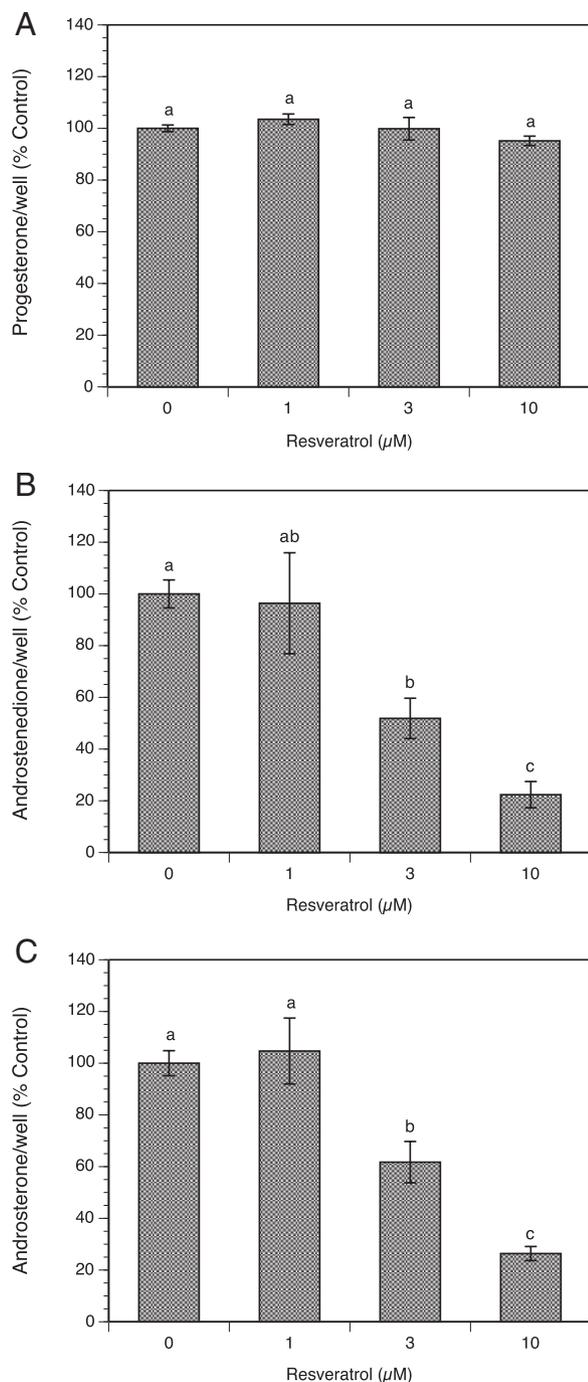
In the same experiments, the exposure of cells to resveratrol induced a concentration-dependent decrease in both *Cyp11a1* and *Hsd3b1* mRNA levels, respectively, by up to 38% ( $P < 0.001$ ) and 42% ( $P < 0.001$ ) at the highest concentration (Fig. 1, B and C).

However, the most profound resveratrol-induced inhibitory effect on mRNA expression was found in *Cyp17a1*. As presented in Fig. 1D, resveratrol at a concentration of 10  $\mu\text{M}$  decreased the level of *Cyp17a1* transcripts by 73% ( $P < 0.001$ ) compared with control.

To evaluate effects of resveratrol on individual steroids, levels of progesterone, androstenedione, and androsterone were evaluated in spent media using liquid chromatography-mass spectrometry. Forty-eight-hour exposure of cells to resveratrol did not affect progesterone production at any of the tested concentrations. In contrast, resveratrol decreased androgen levels in a concentration-dependent fashion. As shown in Fig. 2, B and C, resveratrol at the highest concentration (10  $\mu\text{M}$ ) induced a significant inhibitory effect on both androstenedione and androsterone production, respectively, by 78% ( $P < 0.001$ ) and 74% ( $P < 0.001$ ). Because high concentrations of resveratrol ( $\geq 30 \mu\text{M}$ ) have been shown to reduce proliferation of theca-interstitial cells (30), present results were also analyzed accounting for possible effect on the growth of cells. However, resveratrol had no significant effect on the growth of theca-interstitial cells at concentrations evaluated in this study ( $\leq 10 \mu\text{M}$ ). Inhibitory effects of resveratrol on the level of androgens persisted when expressing steroid levels per unit of protein determined at the end of the culture period.



**FIG. 1.** Effect of resveratrol (1–10  $\mu\text{M}$ ) on mRNA expression of *Star* (A), *Cyp11a1* (B), *Hsd3b1* (C), and *Cyp17a1* (D). Theca-interstitial cells were cultured in chemically defined media supplemented with LH (5 ng/ml) for 48 h in the absence (control) or in the presence of resveratrol. Total cellular RNA was isolated, and mRNA expression was determined using quantitative real-time PCR reactions and normalized to *Hprt* mRNA levels. Results are presented as a percentage of control. Each bar represents mean  $\pm$  SEM from three independent experiments (each with  $n = 4$ ). Means with no superscripts in common are significantly different ( $P < 0.05$ ).



**FIG. 2.** Effect of resveratrol (1–10  $\mu\text{M}$ ) on steroid production by theca-interstitial cell cultures: progesterone (A), androstenedione (B), and androsterone (C). The cells were cultured in chemically defined media supplemented with LH (5 ng/ml) for 48 h in the absence (control) or in the presence of resveratrol. Steroid levels were determined using liquid chromatography-mass spectrometry. The mean  $\pm$  SEM concentrations of steroids in control cultures were: progesterone,  $769 \pm 76$  pg/well; androstenedione,  $81 \pm 12$  pg/well; and androsterone,  $677 \pm 95$  pg/well. Results are presented as a percentage of control. Each bar represents mean  $\pm$  SEM from three independent experiments (each with  $n = 4$ ). Means with no superscripts in common are significantly different ( $P < 0.05$ ).

### Effect of substrates of isoprenylation

To determine whether the effect of resveratrol on steroidogenesis is related to decreased isoprenylation, theca-interstitial cells were cultured for 48 h without (control) or with resveratrol (10  $\mu\text{M}$ ), GGPP (30  $\mu\text{M}$ ), and/or FPP (30  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 3). The concentration of resveratrol was selected based on our previous experiments, where resveratrol at 10  $\mu\text{M}$  induced an inhibitory effect on mRNA expression of the relevant genes regulating steroidogenesis.

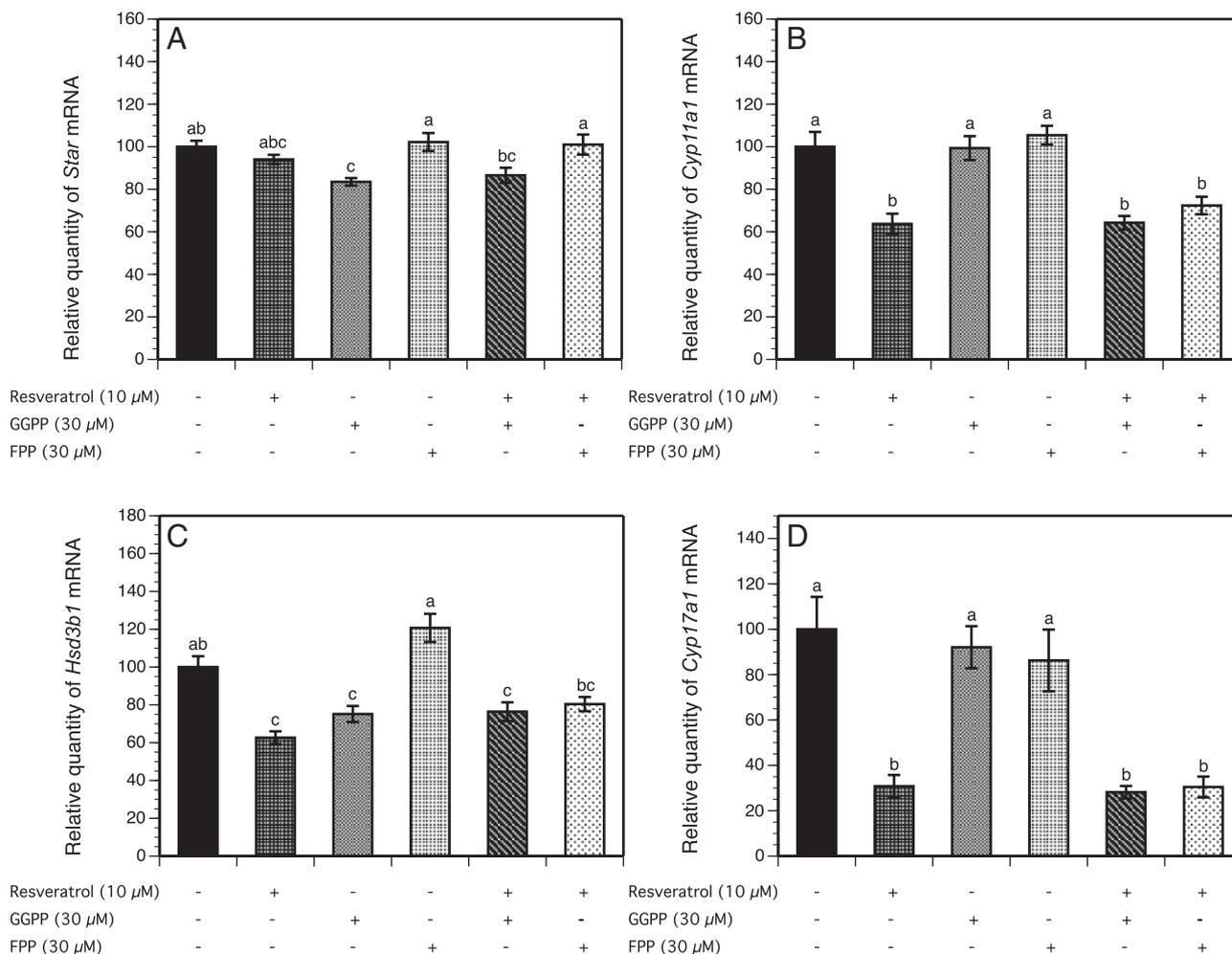
As presented in Fig. 3A, neither resveratrol nor a substrate of isoprenylation, FPP, had any significant effect on *Star* mRNA levels. A decrease by 16% ( $P < 0.05$ ) induced by GGPP was observed. Moreover, the addition of either GGPP or FPP to resveratrol-treated cultures did not alter *Star* mRNA expression compared with the effects of resveratrol alone.

In agreement with our previous experiments (Fig. 1), the exposure of cells to resveratrol significantly inhibited *Cyp11a1*, *Hsd3b1*, and *Cyp17a1* mRNA levels, respectively, by 36, 37, and 69% ( $P < 0.001$  for all) below the control level. In contrast, GGPP alone and FPP alone had no significant effect on mRNA expression of any of the above-mentioned genes, except for a decrease by 25% ( $P < 0.05$ ) in *Hsd3b1* transcripts in the presence of GGPP. The addition of substrates of isoprenylation to resveratrol-treated cultures did not restore the resveratrol-induced inhibitory effect on mRNA expression of any of these genes (Fig. 3, B–D).

As shown in Fig. 4A, resveratrol did not affect progesterone production, whereas GGPP and FPP alone induced a modest increase in progesterone level by 26% ( $P < 0.01$ ) and 20% ( $P < 0.05$ ), respectively. The addition of GGPP and FPP to resveratrol-treated cultures did not alter progesterone production. Androstenedione and androsterone levels in the spent media from the same experiments are shown in Fig. 4, B and C. Resveratrol decreased androstenedione and androsterone production, respectively, by 83% ( $P < 0.001$ ) and 60% ( $P < 0.001$ ), whereas GGPP and FPP alone had no significant effect on androgen levels. Furthermore, the addition of both GGPP and FPP to resveratrol-treated cultures did not abrogate resveratrol-induced inhibition of androgen production.

### Effects of inhibitors of sirtuins

To determine whether the resveratrol-induced inhibitory effect on theca cell steroidogenesis is mediated through substrate-specific activation of silent mating type information regulation-2 homolog (SIRT)1, additional experiments were performed to determine the effects of specific inhibitors of sirtuins, nicotinamide, and sirtinol on the key genes regulating ovarian steroidogenesis. Theca-interstitial cells were cultured for 48 h in the absence



**FIG. 3.** Effect of resveratrol (10  $\mu$ M), GGPP (30  $\mu$ M), and FPP (30  $\mu$ M) on mRNA expression of *Star* (A), *Cyp11a1* (B), *Hsd3b1* (C), and *Cyp17a1* (D). Theca-interstitial cells were cultured in chemically defined media supplemented with LH (5 ng/ml) for 48 h in the absence (control) or in the presence of resveratrol and/or GGPP or FPP. The mRNA expression was determined as described in Fig. 1. Results are presented as a percentage of control. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments (each with  $n = 4$ ). Means with no superscripts in common are significantly different ( $P < 0.05$ ).

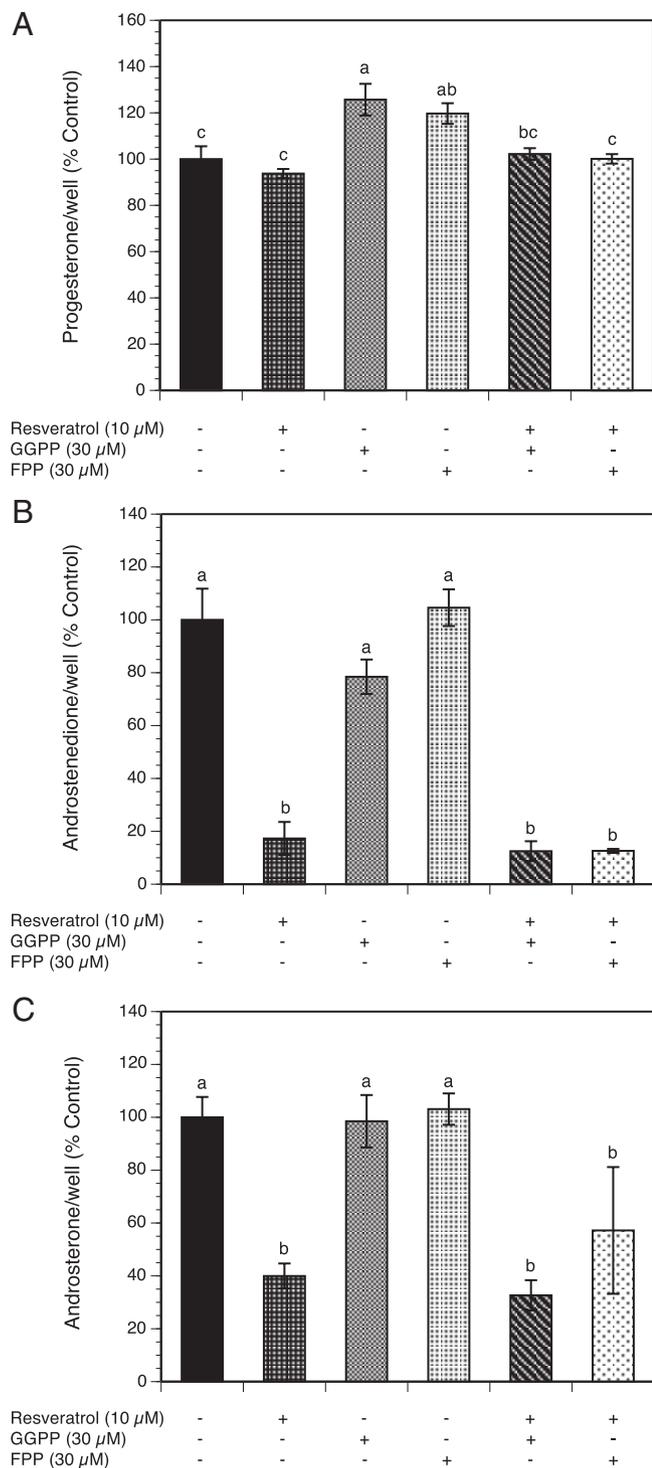
(control) or presence of resveratrol (10  $\mu$ M), nicotinamide (1 mM), and/or sirtinol (10  $\mu$ M). Both nicotinamide and sirtinol inhibited *Cyp17a1* mRNA expression, respectively, by 38% ( $P < 0.01$ ) and 63% ( $P < 0.001$ ), and neither of these agents reversed resveratrol-induced inhibition of *Cyp17a1* mRNA expression. In a similar fashion, nicotinamide and sirtinol decreased androstenedione production, respectively, by 29% ( $P < 0.05$ ) and 42% ( $P < 0.001$ ), whereas the addition of these compounds to resveratrol-treated cultures did not reverse inhibitory effects induced by resveratrol alone (data not shown).

### Effects of Akt/PKB signaling pathway on steroidogenesis

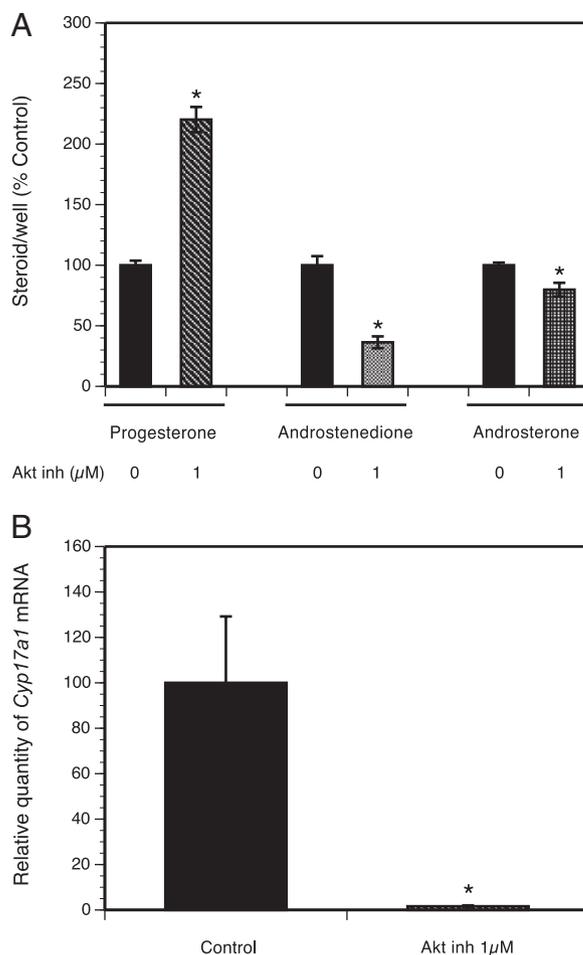
Because resveratrol-induced inhibition of rat theca cell steroidogenesis is independent of mechanisms involving both isoprenylation and activation of sirtuins, further experiments were carried out to analyze the signaling cas-

cade involved in this inhibition. Because the Akt/PKB pathway has been previously shown to mediate LH-induced stimulation of both androgen production and *Cyp17a1* mRNA expression in bovine theca cells (31), further experiments were performed to evaluate whether Akt activity is involved in rat theca cell steroidogenesis. Theca-interstitial cells were cultured for 48 h in the absence (control) or presence of Akt inhibitor (1  $\mu$ M). As shown in Fig. 5A, Akt inhibitor induced a 2.2-fold increase in progesterone production ( $P < 0.001$ ) and inhibited both androstenedione and androsterone levels by 64% ( $P < 0.001$ ) and 20% ( $P < 0.05$ ), respectively.

Furthermore, PCR analysis was carried out to evaluate the effect of inhibition of Akt activity on *Cyp17a1* mRNA levels. Akt inhibitor dramatically decreased *Cyp17a1* mRNA expression by 98% ( $P < 0.01$ ) compared with control (Fig. 5B).



**FIG. 4.** Effect of resveratrol (10  $\mu$ M), GGPP (30  $\mu$ M), and FPP (30  $\mu$ M) on steroid production by theca-interstitial cells: progesterone (A), androstenedione (B), and androsterone (C). The cells were cultured in chemically defined media supplemented with LH (5 ng/ml) for 48 h in the absence (control) or in the presence of resveratrol and/or GGPP or FPP. Androgen levels were determined as described in Fig. 2. The mean  $\pm$  SEM concentrations of steroids in control cultures were: progesterone, 590  $\pm$  64 pg/well; androstenedione, 55  $\pm$  10 pg/well; and androsterone, 493  $\pm$  40 pg/well. Results are presented as a percentage of control. Each bar represents mean  $\pm$  SEM from three independent experiments (each with n = 4). Means with no superscripts in common are significantly different ( $P < 0.05$ ).



**FIG. 5.** A, Effect of Akt inhibitor (1  $\mu$ M) on steroid production by theca-interstitial cells. The cells were cultured in chemically defined media supplemented with LH (5 ng/ml) for 48 h in the absence (control) or in the presence of Akt inhibitor (124018 Akt Inhibitor VIII, Isozyme-Selective, Akti-1/2). Progesterone, androstenedione, and androsterone levels were determined as described in Fig. 2. The mean  $\pm$  SEM concentrations of steroids in control cultures were: progesterone, 517  $\pm$  29 pg/well; androstenedione, 24  $\pm$  2 pg/well; and androsterone, 51  $\pm$  39 pg/well. Results are presented as a percentage of control. Each bar represents mean  $\pm$  SEM from three independent experiments (each with n = 4); \*, Means significantly different from control ( $P < 0.01$ ). B, Effect of Akt inhibitor (1  $\mu$ M) on Cyp17a1 mRNA expression by theca-interstitial cells. The cells were cultured in chemically defined media supplemented with LH (5 ng/ml) for 48 h in the absence (control) or in the presence of Akt inhibitor. The mRNA expression was determined as described in Fig. 1. Results are presented as a percentage of control. Each bar represents mean  $\pm$  SEM from three independent experiments (each with n = 4); \*, Means significantly different from control ( $P < 0.01$ ). Akt inh, Akt inhibitor.

### Effects of resveratrol on Akt/PKB phosphorylation

To determine whether the resveratrol-induced inhibitory effect on steroidogenesis is mediated through inhibition of Akt/PKB signaling pathway, theca-interstitial cells were cultured for 30 min in the absence (control) or presence of resveratrol (10  $\mu$ M). Subsequently, phospho-Akt and total-Akt contents were examined using Western blotting. In the same set of experiments, insulin (0.1  $\mu$ g/ml)

and Akt inhibitor (1  $\mu\text{M}$ ) were included, respectively, as positive and negative controls. As shown in Fig. 6, resveratrol decreased Akt/PKB phosphorylation by 28% ( $P < 0.01$ ) compared with control.

## Discussion

In the present study, we have demonstrated that in cultures of rat theca-interstitial cells resveratrol: 1) does not alter progesterone levels; 2) inhibits androgen production in a concentration-dependent fashion; 3) decreases mRNA expression of several genes regulating steroidogenesis, especially *Cyp17a1*; 4) the resveratrol-induced inhibitory effect on steroidogenesis is independent of mechanisms involving isoprenylation or activation of sirtuins; 5) the Akt/PKB signaling pathway is involved in theca-interstitial cell steroidogenesis; and 6) resveratrol decreases Akt/PKB phosphorylation.

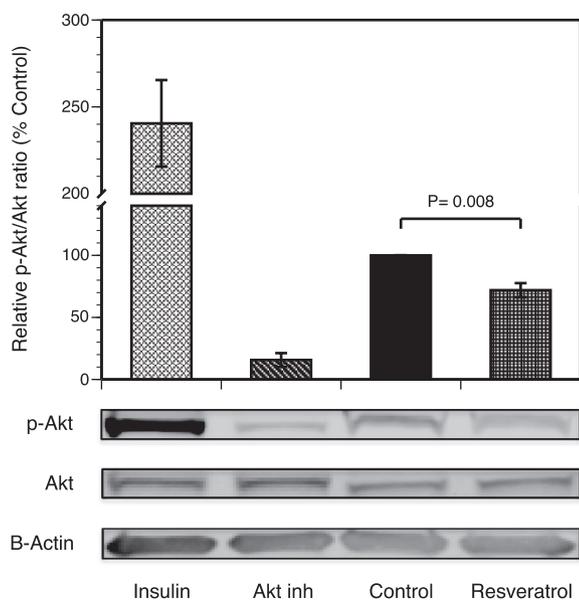
To our knowledge, this is the first study evaluating the role of resveratrol on theca-interstitial cell steroidogenesis. The primary finding of the present study pertains to the demonstration that resveratrol selectively inhibits androgen production and mRNA expression of the key steroidogenic genes, especially *Cyp17a1*, the crucial gene regulating the androgen biosynthesis pathway. The present findings are consistent with previous studies demonstrating the inhibitory actions of this phytoestrogen on steroid-

ogenesis on other androgen-producing cells. Supornsilchai *et al.* (18) showed that resveratrol suppresses steroidogenesis by rat adrenocortical cells by inhibiting cytochrome P450 c21-hydroxylase. In a similar fashion, Svechnikov *et al.* (19) demonstrated that resveratrol attenuated human chorionic gonadotropin-activated steroidogenesis in primary cultures of rat Leydig cells through suppression of the expression of Star and cytochrome P450c17. Thus, exposure of steroid-producing cells to resveratrol may decrease production of steroid hormones.

In the present study, resveratrol inhibited ovarian steroidogenesis by reducing *Cyp17a1* mRNA expression and hence may induce accumulation of progesterone and decrease in androgen biosynthesis. However, in contrast to the previously observed stimulatory effect of resveratrol on granulosa cell progesterone production (32–34), no changes in progesterone levels were observed in interstitial-theca cells in response to resveratrol. We propose that the lack of effect of resveratrol on progesterone production, compared with a large effect on androgens, may be related to a net effect of resveratrol-induced decrease of mRNA expression of the genes involved in steroid production, such as *Star*, *Cyp11a1*, and *Hsd3b1*, as well as a reduced conversion of progesterone to androgens due to a profound inhibition of *Cyp17a1* mRNA expression.

Isoprenoids are lipids that can be found in all living organisms, playing widely different roles in physiological processes of plants and animals (35). In humans, the non-sterol isoprenoids, FPP and GGPP, are products of mevalonate pathway. Isoprenoids, by the process of isoprenylation, may attach to the carboxyl terminus of proteins, facilitating the membrane attachment and function of members of the small G protein superfamily (36). This posttranslational modification has been shown to be involved in several cellular functions, such as proliferation, apoptosis, oxidative stress, and steroidogenesis (27, 28, 37). Our previous rat *in vitro* study demonstrated that resveratrol inhibits the mevalonate pathway by reducing 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase expression and activity, the rate-limiting enzyme of the mevalonate pathway, leading to a decrease of cholesterol, FPP, and GGPP levels. Furthermore, the inhibitory effect of resveratrol on theca cell proliferation was partly reversed by the addition of mevalonic acid, FPP, and GGPP (30). In contrast, in the present study, the addition of either FPP or GGPP to resveratrol-treated cells did not reverse the resveratrol-induced inhibition of theca cell steroidogenesis. Thus, these findings suggest that different mechanisms mediate resveratrol-induced effects on theca cell proliferation and steroidogenesis.

Silent Information Regulator 2 family proteins (sirtuins) are a highly conserved family of redox-sensitive,



**FIG. 6.** Effects of resveratrol (10  $\mu\text{M}$ ) on Akt/PKB phosphorylation. Theca-interstitial cells were cultured for 30 min in chemically defined media supplemented with LH (5 ng/ml) in the absence (control) or in the presence of resveratrol. The cells were lysed, and Western blot analysis was performed with antibodies specific for phospho- and total-Akt/PKB. Results are presented as a percentage of control. Each bar represents mean  $\pm$  SEM from three independent experiments. The bands of one representative experiment are shown.

nicotinamide adenine dinucleotide<sup>+</sup>-dependent deacetylases that regulate gene expression by controlling the acetylation status of lysine residues on histones, nonhistone substrates, transcription factors, and transcriptional co-activators (38). In mammals, the first and most extensively studied sirtuin gene identified was SIRT1 coding for SIRT1 enzyme, located in the nucleus and cytoplasm (39). Previous reports have shown that resveratrol is a SIRT1 activator, exerting beneficial effects on glucose and lipid metabolism and extending lifespan in flies, worms, and rodents (40, 41). In the present study, we hypothesized that resveratrol might reduce ovarian steroidogenesis via activation of sirtuins in theca-interstitial cells. However, the blockade of sirtuins with SIRT1 inhibitors, such as sirtinol and nicotinamide, did not reverse resveratrol-induced inhibition of androgen production and *Cyp17a1* mRNA expression, indicating that the resveratrol-induced inhibitory effect on theca cell steroidogenesis is not mediated through activation of sirtuins. We speculate that this pathway might be differentially activated by resveratrol regarding specific organs, suggesting a tissue-dependent effect of resveratrol on sirtuin activation.

Steroid hormone biosynthesis in theca-interstitial cells is regulated by trophic hormone activation of the protein kinase A signaling pathway (42). However, several signaling cascades regulating steroid production via pathways other than the protein kinase A pathway have been reported (12, 43). Akt, also known as PKB, is a serine-threonine protein kinase that drives cells through several biological functions, such as cell proliferation, survival, glucidic metabolism, and gene expression, in response to growth factors and other extracellular stimuli (44). However, little information is available regarding the role that this pathway plays in theca cell steroidogenesis. Fukuda *et al.* (31) demonstrated that activation of the Akt/PKB signaling pathway is involved in androgen production and *Cyp17a1* mRNA expression in bovine theca cells. Furthermore, the addition of LH, a hormone that serves as a stimulus for theca cell steroidogenesis, increases both androgen production and *Cyp17a1* mRNA expression through Akt phosphorylation (31). In the present study, the blockade of Akt/PKB signaling pathway with a selective Akt inhibitor (124018 Akt Inhibitor VIII, Isozyme-Selective, Akti-1/2), reduced LH-induced androgen production and *Cyp17a1* gene expression and increased progesterone levels, indicating that activation of Akt/PKB pathway is required for LH-stimulated theca cell steroidogenesis acting at the key step of the conversion of progestins into androgens. Additionally, we demonstrated that resveratrol decreased Akt phosphorylation, suggesting that resveratrol-induced inhibition of theca cell ste-

roidogenesis may be due, at least in part, to an inhibitory effect on Akt/PKB phosphorylation.

The present findings may be of potential therapeutic interest with regard to conditions associated with theca hyperplasia and increased androgen production, such as that seen in PCOS. The total amount of androgens secreted by the ovary depends on two main factors: the number of androgen-producing cells and the steroidogenic capacity of individual cells. Resveratrol may alter ovarian steroidogenesis by reducing both steroidogenic capacity as well as decreasing the growth and hence the number of theca-interstitial cells. The present findings indicate that resveratrol decreases androgen production in a concentration-dependent fashion by selectively inhibiting *Cyp17a1* mRNA expression, the key gene regulating androgen biosynthesis, which has been shown to be overexpressed in PCOS patients. On the other hand, our previous reports have shown that resveratrol also induces an inhibition of cell growth, decreasing the number of viable cells and increasing apoptosis of theca-interstitial cells. Thus, we speculate that resveratrol may be of clinical relevance to PCOS due to its antisteroidogenic and antiproliferative effects on theca-interstitial cells.

A clinically important issue is whether the concentrations of resveratrol used in this study correspond to a reasonable dose for human use. In the present study, the inhibitory effect of resveratrol on rat theca-interstitial cell steroidogenesis was detected at concentrations ranging from 1 to 10  $\mu\text{M}$ ; these concentrations are comparable with those used in other *in vitro* studies (18, 19). Present observations that the resveratrol concentration required to inhibit steroidogenesis is in the micromolar range may be of clinical relevance, because the bioavailability of resveratrol in human and in rodent models is in the micromolar range (45, 46). Furthermore, because resveratrol is highly lipophilic, its concentrations in tissues are significantly greater than in serum. Recent study evaluating patients with colorectal cancer revealed that resveratrol administered for 8 d at a dose of 1 g/d resulted in very high concentrations of resveratrol in tumor tissues ( $>600 \mu\text{M}$ ) (47). These observations suggest that resveratrol, administered at pharmacological concentrations, may be effective to induce an inhibitory effect on theca-interstitial cell steroidogenesis.

In summary, our results suggest that resveratrol reduces androgen production and *Cyp17a1* mRNA gene expression, at least in part, via inhibition of Akt/PKB phosphorylation in theca-interstitial cells. These findings may be of potential clinical relevance to conditions associated with excessive androgen production, such as PCOS, whereby resveratrol might represent a novel therapeutic agent.

## Acknowledgments

Address all correspondence and requests for reprints to: Antoni J. Duleba, Department of Obstetrics and Gynecology, University of California, Davis, 4860 Y Street, Sacramento, California 95817. E-mail: ajduleba@ucdavis.edu.

This work was supported by the *Eunice Kennedy Shriver* National Institute of Child Health and Human Development Grant R01-HD050656 (to A.J.D.).

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

## References

- Gelety TJ, Magoffin DA 1997 Ontogeny of steroidogenic enzyme gene expression in ovarian theca-interstitial cells in the rat: regulation by a paracrine theca-differentiating factor prior to achieving luteinizing hormone responsiveness. *Biol Reprod* 56:938–945
- Hall PF 1986 Cytochromes P-450 and the regulation of steroid synthesis. *Steroids* 48:131–196
- Diamanti-Kandarakis E, Kouli CR, Bergiele AT, Filandra FA, Tsianateli TC, Spina GG, Zapanti ED, Bartzis MI 1999 A survey of the polycystic ovary syndrome in the Greek island of Lesbos: hormonal and metabolic profile. *J Clin Endocrinol Metab* 84:4006–4011
- Asunción M, Calvo RM, San Millán JL, Sancho J, Avila S, Escobar-Morreale HF 2000 A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2434–2438
- Wood JR, Ho CK, Nelson-Degrave VL, McAllister JM, Strauss 3rd JF 2004 The molecular signature of polycystic ovary syndrome (PCOS) theca cells defined by gene expression profiling. *J Reprod Immunol* 63:51–60
- Nelson VL, Legro RS, Strauss 3rd JF, McAllister JM 1999 Augmented androgen production is a stable steroidogenic phenotype of propagated theca cells from polycystic ovaries. *Mol Endocrinol* 13:946–957
- Nelson VL, Qin KN, Rosenfield RL, Wood JR, Penning TM, Legro RS, Strauss 3rd JF, McAllister JM 2001 The biochemical basis for increased testosterone production in theca cells propagated from patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5925–5933
- Liu Y, Jiang H, He LY, Huang WJ, He XY, Xing FQ 2011 Abnormal expression of uncoupling protein-2 correlates with CYP11A1 expression in polycystic ovary syndrome. *Reprod Fert Develop* 23:520–526
- Wickenheisser JK, Nelson-Degrave VL, McAllister JM 2005 Dysregulation of cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase messenger ribonucleic acid stability in theca cells isolated from women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 90:1720–1727
- Wood JR, Nelson VL, Ho C, Jansen E, Wang CY, Urbanek M, McAllister JM, Mosselman S, Strauss 3rd JF 2003 The molecular phenotype of polycystic ovary syndrome (PCOS) theca cells and new candidate PCOS genes defined by microarray analysis. *J Biol Chem* 278:26380–26390
- Wickenheisser JK, Quinn PG, Nelson VL, Legro RS, Strauss 3rd JF, McAllister JM 2000 Differential activity of the cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase and steroidogenic acute regulatory protein gene promoters in normal and polycystic ovary syndrome theca cells. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2304–2311
- Nelson-Degrave VL, Wickenheisser JK, Hendricks KL, Asano T, Fujishiro M, Legro RS, Kimball SR, Strauss 3rd JF, McAllister JM 2005 Alterations in mitogen-activated protein kinase kinase and extracellular regulated kinase signaling in theca cells contribute to excessive androgen production in polycystic ovary syndrome. *Mol Endocrinol* 19:379–390
- Beshay VE, Havelock JC, Sirianni R, Ye P, Suzuki T, Rainey WE, Carr BR 2007 The mechanism for protein kinase C inhibition of androgen production and 17 $\alpha$ -hydroxylase expression in a theca cell tumor model. *J Clin Endocrinol Metab* 92:4802–4809
- Scott E, Steward WP, Gescher AJ, Brown K 2012 Resveratrol in human cancer chemoprevention—choosing the 'right' dose. *Mol Nutr Food Res* 56:7–13
- Wu Y, Jia LL, Zheng YN, Xu XG, Luo YJ, Wang B, Chen JZ, Gao XH, Chen HD, Matsui M, Li YH 5 Jan 2012 Resveratrol protects human skin from damage due to repetitive ultraviolet irradiation. *J Eur Acad Dermat Venereol* 10.1111/j.1468-3083.2011.04414.x
- Magyar K, Halmosi R, Palfi A, Feher G, Czopf L, Fulop A, Battyany I, Sumegi B, Toth K, Szabados E 2012 Cardioprotection by resveratrol: a human clinical trial in patients with stable coronary artery disease. *Clin Hemorheol Micro* 50(3):179–187
- Huang TC, Lu KT, Wo YY, Wu YJ, Yang YL 2011 Resveratrol protects rats from A $\beta$ -induced neurotoxicity by the reduction of iNOS expression and lipid peroxidation. *PLoS one* 6:e29102
- Supornsilchai V, Svechnikov K, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W, Söder O 2005 Phytoestrogen resveratrol suppresses steroidogenesis by rat adrenocortical cells by inhibiting cytochrome P450 c21-hydroxylase. *Horm Res* 64:280–286
- Svechnikov K, Spatafora C, Svechnikova I, Tringali C, Söder O 2009 Effects of resveratrol analogs on steroidogenesis and mitochondrial function in rat Leydig cells in vitro. *J Appl Toxicol* 29:673–680
- Wong DH, Villanueva JA, Cress AB, Sokalska A, Ortega I, Duleba AJ 2011 Resveratrol inhibits the mevalonate pathway and potentiates the antiproliferative effects of simvastatin in rat theca-interstitial cells. *Fertil Steril* 96:1252–1258
- Bass TM, Weinkove D, Houthoofd K, Gems D, Partridge L 2007 Effects of resveratrol on lifespan in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev* 128:546–552
- Gerhardt E, Gräber S, Szego EM, Moiso N, Martins LM, Outeiro TF, Kermer P 2011 Idebenone and resveratrol extend lifespan and improve motor function of Htra2 knockout mice. *PLoS ONE* 6:e28855
- Mao Z, Hine C, Tian X, Van Meter M, Au M, Vaidya A, Seluanov A, Gorbunova V 2011 SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1. *Science* 332:1443–1446
- Qiang L, Lin HV, Kim-Muller JY, Welch CL, Gu W, Accili D 2011 Proatherogenic abnormalities of lipid metabolism in SirT1 transgenic mice are mediated through Creb deacetylation. *Cell Metab* 14:758–767
- Magoffin DA, Erickson GF 1988 Purification of ovarian theca-interstitial cells by density gradient centrifugation. *Endocrinology* 122:2345–2347
- Duleba AJ, Spaczynski RZ, Olive DL, Behrman HR 1997 Effects of insulin and insulin-like growth factors on proliferation of rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol Reprod* 56:891–897
- Ortega I, Cress AB, Wong DH, Villanueva JA, Sokalska A, Moeller BC, Stanley SD, Duleba AJ 2011 Simvastatin reduces steroidogenesis by inhibiting Cyp17a1 gene expression in rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol Reprod* 86:1–9
- Rzeczynska IJ, Piotrowski PC, Wong DH, Cress AB, Villanueva J, Duleba AJ 2009 Role of isoprenylation in simvastatin-induced inhibition of ovarian theca-interstitial growth in the rat. *Biol Reprod* 81:850–855
- Pizarro JG, Verdaguer E, Ancrenaz V, Junyent F, Sureda F, Pallàs M, Folch J, Camins A 2011 Resveratrol inhibits proliferation and promotes apoptosis of neuroblastoma cells: role of sirtuin 1. *Neurochem Res* 36:187–194
- Wong DH, Villanueva JA, Cress AB, Sokalska A, Ortega I, Duleba AJ 2011 Resveratrol inhibits the mevalonate pathway and potentiates the antiproliferative effects of simvastatin in rat theca-interstitial cells. *Fertil Steril* 96:1252–1258

31. Fukuda S, Orisaka M, Tajima K, Hattori K, Kotsuji F 2009 Luteinizing hormone-induced Akt phosphorylation and androgen production are modulated by MAP Kinase in bovine theca cells. *J Ovar Res* 2:17
32. Basini G, Tringali C, Baioni L, Bussolati S, Spatafora C, Grasselli F 2010 Biological effects on granulosa cells of hydroxylated and methylated resveratrol analogues. *Mol Nutr Food Res* 54(Suppl 2):S236–S243
33. Kolesarova A, Capcarova M, Maruniakova N, Lukac N, Ciereszko RE, Sirotkin AV 2012 Resveratrol inhibits reproductive toxicity induced by deoxynivalenol. *J Environ Sci Heal A* 47:1329–1334
34. Morita Y, Wada-Hiraike O, Yano T, Shirane A, Hirano M, Hiraike H, Koyama S, Oishi H, Yoshino O, Miyamoto Y, Sone K, Oda K, Nakagawa S, Tsutsui K, Taketani Y 2012 Resveratrol promotes expression of SIRT1 and StAR in rat ovarian granulosa cells: an implicative role of SIRT1 in the ovary. *Reprod Biol Endocrinol* 10:14–23
35. Chemler JA, Yan Y, Koffas MA 2006 Biosynthesis of isoprenoids, polyunsaturated fatty acids and flavonoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact* 5:20–28
36. Inglese J, Koch WJ, Caron MG, Lefkowitz RJ 1992 Isoprenylation in regulation of signal transduction by G-protein-coupled receptor kinases. *Nature* 359:147–150
37. Sokalska A, Wong DH, Cress A, Piotrowski PC, Rzepczynska I, Villanueva J, Duleba AJ 2010 Simvastatin induces apoptosis and alters cytoskeleton in endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 95:3453–3459
38. Trapp J, Jung M 2006 The role of NAD<sup>+</sup> dependent histone deacetylases (sirtuins) in ageing. *Curr Drug Targets* 7:1553–1560
39. Jin Q, Yan T, Ge X, Sun C, Shi X, Zhai Q 2007 Cytoplasm-localized SIRT1 enhances apoptosis. *J Cell Physiol* 213:88–97
40. Fernández AF, Fraga MF 2011 The effects of the dietary polyphenol resveratrol on human healthy aging and lifespan. *Epigenetics* 6:870–874
41. Knight CM, Gutierrez-Juarez R, Lam TK, Arrieta-Cruz I, Huang L, Schwartz G, Barzilai N, Rossetti L 2011 Mediobasal hypothalamic SIRT1 is essential for resveratrol's effects on insulin action in rats. *Diabetes* 60:2691–2700
42. Méndez E, Maeland M, Skälhegg BS, Planas JV 2003 Activation of the cAMP-dependent protein kinase signaling pathway by luteinizing hormone in trout theca layers. *Mol Cell Endocrinol* 205:11–20
43. Tajima K, Yoshii K, Fukuda S, Orisaka M, Miyamoto K, Amsterdam A, Kotsuji F 2005 Luteinizing hormone-induced extracellular-signal regulated kinase activation differently modulates progesterone and androstenedione production in bovine theca cells. *Endocrinology* 146:2903–2910
44. Song G, Ouyang G, Bao S 2005 The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 9:59–71
45. Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis Jr JE, Walle UK 2004 High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos* 32:1377–1382
46. Bruner-Tran KL, Osteen KG, Taylor HS, Sokalska A, Haines K, Duleba AJ 2011 Resveratrol inhibits development of experimental endometriosis in vivo and reduces endometrial stromal cell invasiveness in vitro. *Biol Reprod* 84:106–112
47. Patel KR, Brown VA, Jones DJ, Britton RG, Hemingway D, Miller AS, West KP, Booth TD, Perloff M, Crowell JA, Brenner DE, Steward WP, Gescher AJ, Brown K 2010 Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. *Cancer Res* 70:7392–7399



**Join The Endocrine Society** and network with endocrine thought leaders from around the world.

[www.endo-society.org/join](http://www.endo-society.org/join)

# Effects of resveratrol on growth and function of rat ovarian granulosa cells

Israel Ortega, M.D.,<sup>a,c</sup> Donna H. Wong, Ph.D.,<sup>a</sup> Jesus A. Villanueva, Ph.D.,<sup>a</sup> Amanda B. Cress, B.S.,<sup>a</sup> Anna Sokalska, M.D., Ph.D.,<sup>a,d</sup> Scott D. Stanley, Ph.D.,<sup>b</sup> and Antoni J. Duleba, M.D.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine and <sup>b</sup> Department of Molecular Biosciences, University of California, Davis, California; <sup>c</sup> IVI-Madrid, Madrid, Spain; and <sup>d</sup> Department of Gynecology, Obstetrics, and Gynecologic Oncology, Karol Marcinkowski University of Medical Sciences, Poznan, Poland

**Objective:** To evaluate the effects of resveratrol on growth and function of granulosa cells. Previously, we demonstrated that resveratrol exerts profound proapoptotic effects on theca-interstitial cells.

**Design:** In vitro study.

**Setting:** Research laboratory.

**Animal(s):** Immature Sprague-Dawley female rats.

**Intervention(s):** Granulosa cells were cultured in the absence or presence of resveratrol.

**Main Outcome Measure(s):** DNA synthesis was determined by thymidine incorporation assay, apoptosis by activity of caspases 3/7, cell morphology by immunocytochemistry, steroidogenesis by mass spectrometry, antimüllerian hormone (AMH), and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by polymerase chain reaction and Western blot.

**Result(s):** Resveratrol induced a biphasic effect on DNA synthesis, whereby a lower concentration stimulated thymidine incorporation and higher concentrations inhibited it. Additionally, resveratrol slightly increased the cell number and modestly decreased the activity of caspases 3/7 with no effect on cell morphology or progesterone production. However, resveratrol decreased aromatization and VEGF expression, whereas AMH expression remained unaltered.

**Conclusion(s):** Resveratrol, by exerting cytostatic but not cytotoxic effects, together with antiangiogenic actions mediated by decreased VEGF in granulosa cells, may alter the ratio of theca-to-granulosa cells and decrease vascular permeability, and therefore may be of potential therapeutic use in conditions associated with highly vascularized theca-interstitial hyperplasia and abnormal angiogenesis, such as those seen in women with polycystic ovary syndrome. (*Fertil Steril*® 2012; ■:■-■. ©2012 by American Society for Reproductive Medicine.)

**Key Words:** Apoptosis, granulosa cells, proliferation, resveratrol, steroidogenesis, AMH, VEGF

**Discuss:** You can discuss this article with its authors and with other ASRM members at <http://fertstertforum.com/ortegai-resveratrol-rat-ovarian-granulosa-cells/>



Use your smartphone to scan this QR code and connect to the discussion forum for this article now.\*

\* Download a free QR code scanner by searching for "QR scanner" in your smartphone's app store or app marketplace.

**R**esveratrol (3,5,4'-trihydroxy stilbene) is a natural polyphenol synthesized by several plants as a phytoalexin when under attack by pathogens such as bacteria or fungi. This bioflavonoid is naturally found in mulberries, peanuts, several species of

medicinal plants and the skin of grapes and thus in red wine (1). Resveratrol possesses a broad spectrum of pharmacologic and therapeutic properties, such as anticarcinogenic, antioxidant, and antiinflammatory, as well as cardioprotective and neuroprotective effects

(2–5). In several cancer cell lines and primary cell culture systems, resveratrol has been shown to exert antiproliferative and proapoptotic properties (6, 7). However, little is known regarding the role of resveratrol in such vital biologic functions as reproduction and ovarian function.

Recently, we have demonstrated that resveratrol inhibits ovarian theca-interstitial cell growth by decreasing DNA synthesis and inducing proapoptotic effects as evidenced by an increase in activity of executioner caspases 3 and 7, DNA fragmentation, and the presence of morphologic

Received April 8, 2012; revised August 5, 2012; accepted August 6, 2012.

I.O. has nothing to disclose. D.H.W. has nothing to disclose. J.A.V. has nothing to disclose. A.B.C. has nothing to disclose. A.S. has nothing to disclose. S.D.S. has nothing to disclose. A.J.D. has nothing to disclose.

Supported by grant R01-HD050656 from the Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development (to A.J.D.).

Reprint requests: Antoni J. Duleba, M.D., Department of Obstetrics and Gynecology, University of California Davis, 4860 Y Street, Sacramento, CA 95817 (E-mail: [ajduleba@ucdavis.edu](mailto:ajduleba@ucdavis.edu)).

Fertility and Sterility® Vol. ■, No. ■, ■ 2012 0015-0282/\$36.00

Copyright ©2012 American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.08.004>

changes consistent with apoptosis (7). Furthermore, we have shown that a resveratrol-induced suppressive effect on theca cell proliferation was partly abrogated by the addition of mevalonic acid, farnesyl pyrophosphate, and geranylgeranyl pyrophosphate, indicating a role of the mevalonate pathway in resveratrol-induced inhibition of theca-interstitial cell growth (8). These effects may be relevant to potential use of this compound in the treatment of clinically important conditions associated with ovarian theca-interstitial hyperplasia, such as polycystic ovary syndrome (PCOS).

PCOS is the most common endocrine disorder in women of reproductive age, affecting 6.6%–8% of women in this age group (9). It is characterized by enlarged ovaries, highly vascularized stroma, leading to increased androgen production and disrupted folliculogenesis contributing to infertility (10). Granulosa cells are involved in key physiologic processes such as follicle growth, steroidogenesis, and angiogenesis (11). It has been shown that granulosa cells from subjects with PCOS are characterized by reduced apoptotic activity and increased cell proliferation (12). Additionally, granulosa cells from women with PCOS respond to FSH stimulation by producing more  $E_2$  than normal granulosa cells, indicating that the inherent capacity of these cells to respond to FSH is retained (13). In polycystic ovaries, an increase in antimüllerian hormone (AMH) output by granulosa cells from preantral and small antral follicles has been reported, and this observation may be due to aberrant activity of the granulosa cells in PCOS patients (14–16). Finally, increased serum levels and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in polycystic ovaries has been associated with increased ovarian stromal blood flow and may contribute to the loss of intraovarian autoregulatory mechanisms (10).

Therefore, the aim of the present study was to evaluate the biologic effects of resveratrol on granulosa cells, compared with our previous work on theca cells. To this end, we studied actions of resveratrol on granulosa cell proliferation, apoptosis, steroidogenesis, and expression of AMH and VEGF.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell Culture and Reagents

The collection and purification of ovarian granulosa cells were performed as described previously (17). The cells were counted, and viability, as assessed by the trypan blue exclusion test, was routinely in the 40%–45% range, similar to the findings of others (18, 19). The granulosa cells were cultured on fibronectin-coated plates for up to 48 hours at 37°C in an atmosphere of 5%  $CO_2$  in humidified air in serum-free McCoy 5A culture medium supplemented with 1% antibiotic/antimycotic mix, 0.1% bovine serum albumin and 2 mmol/L L-glutamine. The cells were incubated without (control) or with resveratrol (10–50  $\mu\text{mol/L}$ ) and supplemented with FSH (30 ng/mL). In the experiments evaluating steroidogenesis, testosterone (0.5  $\mu\text{mol/L}$ ) was added to serve as a substrate for aromatase. The doses of resveratrol were selected based on our previous studies evaluating rat theca-interstitial cell proliferation (7, 8). All chemicals were purchased from Sigma Chemical Co. except for ovine FSH, which was obtained from the National Hormone & Pituitary

Program at the Harbor-UCLA Medical Center. All treatments and procedures were carried out in accordance with accepted standards of human animal care as outlined in the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and a protocol approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the University of California, Davis.

### Cell Proliferation Assays

Cells were incubated for 24 and 48 hours in 96-well fibronectin-coated plates at a density of 35,000 cells/well. DNA synthesis was determined through a thymidine incorporation assay. Radio labeled [ $^3\text{H}$ ]thymidine (1  $\mu\text{Ci/well}$ ) was added to the cells 24 hours before the culture was stopped. Subsequently, the cells were harvested with a multiwell cell harvester (PHD Harvester; Cambridge Technology) and radioactivity measured in a liquid scintillation counter (Wallac 1409; Perkin-Elmer).

### Cell Viability Assays

The total number of viable cells was estimated with the use of the Cell Titer–Blue cell viability assay (Promega) 2 hours before the end of the culture period. Cells were incubated for 24 and 48 hours in 96-well fibronectin-coated plates at a density of 35,000 cells/well. Fluorescence was determined with the use of a microplate reader (Fluostar Omega; BMG Lab Technologies.). To validate the assay, a standard curve with a known number of cells was generated and a linear correlation verified ( $r^2 = 0.99$ ;  $P < .001$ ).

### Caspase-3/7 Activity Assay

The measurement of apoptosis in granulosa cells was performed with the use of the Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 assay kit (Promega) following the manufacturer's instructions. Cells were incubated in 96-well fibronectin-coated plates at a density of 20,000 cells/well at different time points (3, 6, 12, 24, and 48 hours). Caspase-3/7 activity was measured with the use of a microplate reader (Fluostar Omega) at excitation wavelength 485 nm and emission wavelength 520 nm. Caspase-3/7 activity was expressed per number of total viable cells.

### DAPI Nuclear and F-Actin Staining

Approximately 16,000 granulosa cells/well were seeded in duplicate in 8-well culture slides (BD Biosciences) at different time points (24–48 hours) and then subjected to DAPI and F-actin staining as previously described (7). Slides were examined under an Olympus BX61 fluorescent microscope at  $\times 40$  magnification.

### Total RNA Isolation and Quantitative Real-Time PCR

Cells were seeded in 24-well fibronectin-coated plates at a density of 400,000 cells/well and incubated for 24–48 hours. RNA was isolated with the use of the Magmax-96 Total RNA Isolation kit (Applied Biosystems) and the Kingfisher robot (Thermo Scientific). Reverse transcription of total RNA to

cDNA was performed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit for rt-PCR (Applied Biosystems). Polymerase chain reaction (PCR) reactions were set up in 28- $\mu$ L volumes, consisting of 5  $\mu$ L cDNA, 4.5  $\mu$ L forward and 4.5  $\mu$ L reverse 900 nmol/L primers, and 14  $\mu$ L 2 $\times$  Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems).

Quantitative real-time PCR reactions were performed in triplicate using the ABI 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Data were analyzed with the use of SDS 1.4 software (Applied Biosystems). The relative amount of target mRNA was expressed as a ratio normalized to hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT). The primer sequences were as follows: rat CYP19 forward (5'-ACC ATC ATG GTC CCG GAA A-3') and reverse (5'-AGG CCC ATG ATC AGC AGA AG-3'); rat AMH forward (5'-GCT GCT GCT AGC GAC TAT G-3') and reverse (5'-AGA TGT AGG CTA GCA ACT G-3'); rat VEGF forward (5'-ACA GAA GGG GAG CAG AAA GCC CAT-3') and reverse (5'-CGC TCT GAC CAA GGC TCA CAG T-3'); rat HPRT forward (5'-TTG TTG GAT ATG CCC TTG ACT-3') and reverse (5'-CCG CTG TCT TTT AGG CTT TG-3'). Because Sybr Green detects double-stranded DNA, including primer dimers, contaminating DNA, and PCR product from misannealed primer, a dissociation curve was run. By viewing a dissociation curve, we ensured that the desired amplicon was detected.

### Mass Spectrometry

Quantitation of steroids was performed with the use of a novel turbulent-flow chromatographic high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method that allowed the simultaneous detection of P and E<sub>2</sub>. The method has been described in detail previously (20). Briefly, quantification was done using selective reaction monitoring mode to monitor protonated precursor  $\rightarrow$  product ion transition of m/z 315.2  $\rightarrow$  97.1 for P and 255.2  $\rightarrow$  158.6 for E<sub>2</sub>. The limits of detection and quantification for P were 50 and 125 pg/mL and for E<sub>2</sub> 100 and 250 pg/mL.

Intra-assay accuracy and precision were determined at concentrations of 400 and 800 pg/mL. Accuracy of the P and E<sub>2</sub> analyses were within 5.3  $\pm$  0.9% and 7.5  $\pm$  1.1%, respectively, and precision was within 103  $\pm$  2.5% and 101  $\pm$  1.0% of the nominal value.

### Western Blot Analysis

Cells were cultured for 48 hours, and at the end of treatments cell lysates were prepared as previously described (8). Protein concentrations in the supernatant were determined with the use of a Bio-Rad protein assay. For immunoblot analysis, 50  $\mu$ g protein was resolved in 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels and transferred to a nitrocellulose membrane by electroblotting. Blots were blocked with the use of blocking buffer (LI-COR Biosciences), incubated with primary antibodies to AMH (1:250; Santa Cruz Biotechnology), VEGF (1:200; Santa Cruz Biotechnology), and  $\beta$ -actin (1:40,000; Sigma Aldrich), washed, and incubated with the secondary antibodies donkey antigoat (1:5,000; LI-COR Biosciences) and donkey antimouse (1:40,000; LI-COR Biosciences). Target proteins

were detected with the Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences) and band intensities normalized to  $\beta$ -actin.

### Activity of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase

The assay evaluating activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGCR) was performed as described previously (8). Briefly, the microsomal fraction of granulosa cells was isolated and the conversion of [3-<sup>14</sup>C]HMG-CoA to [<sup>14</sup>C]mevalonic acid and lactone was determined.

### Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using JMP 9.0 software (SAS). Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Means were compared by analysis of variance followed by post hoc testing with the use of Tukey HSD test or Dunnett test. When appropriate, data were logarithmically transformed. A value of  $P < .05$  was considered to be statistically significant.

## RESULTS

### Effects of Resveratrol on DNA Synthesis

To determine whether resveratrol affects DNA synthesis, rat granulosa cells were cultured for 24 and 48 hours in the absence or presence of increasing doses of resveratrol (10–50  $\mu$ mol/L). As shown in Figure 1A, exposure to resveratrol ranging from 30 to 50  $\mu$ mol/L induced a significant inhibitory effect on DNA synthesis at 24 hours, by up to 55% ( $P < .001$ ) at the highest concentration. However, at 48 hours, resveratrol displayed a biphasic action, whereby a lower concentration of resveratrol (10  $\mu$ mol/L) stimulated thymidine incorporation by 54% ( $P < .01$ ), whereas higher concentrations (30 and 50  $\mu$ mol/L) decreased it by 49% ( $P < .05$ ) and 44% ( $P < .05$ ), respectively.

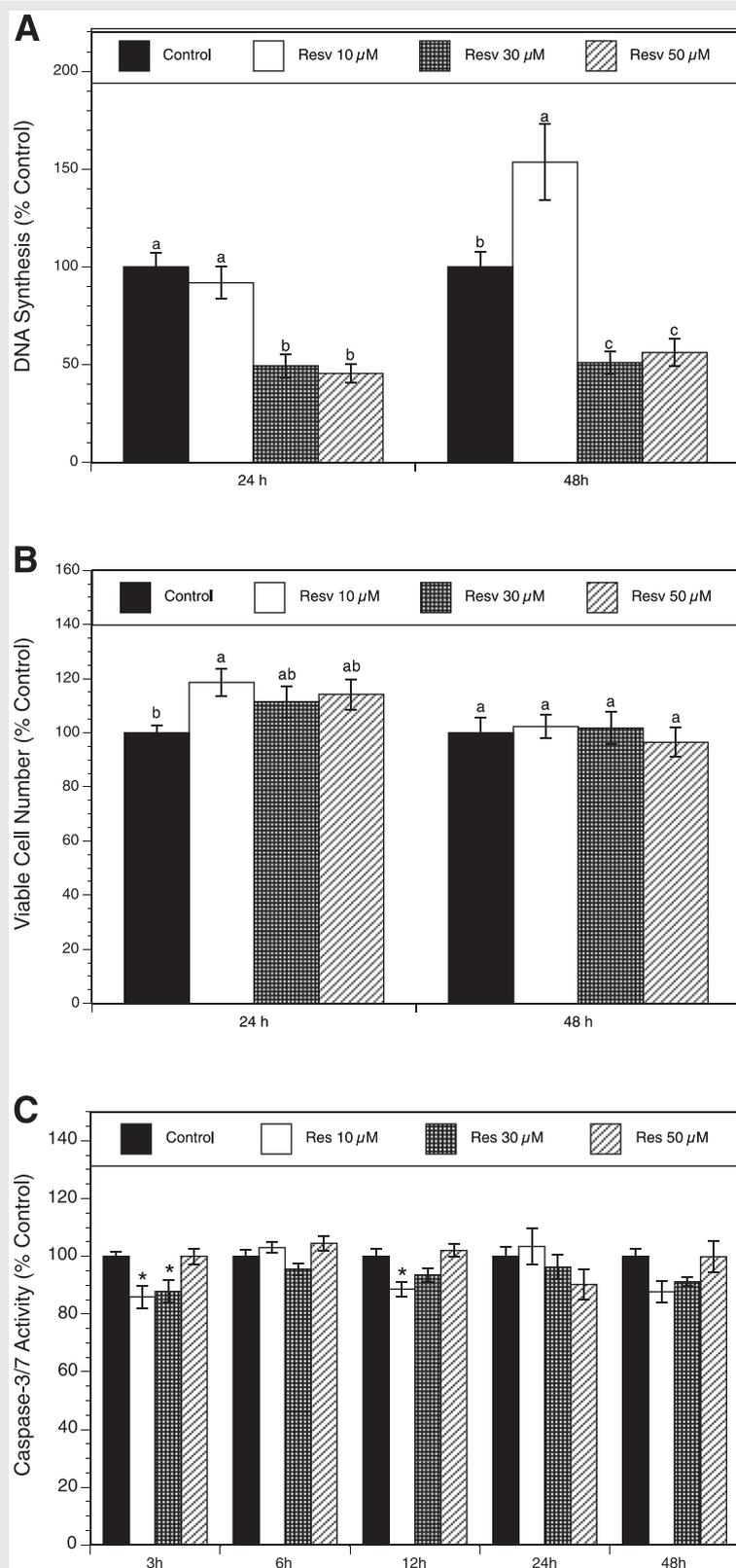
### Effects of Resveratrol on Cell Viability

To investigate the effect of resveratrol on cell viability, the MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) assay was performed after treatment of granulosa cells with or without various concentrations of resveratrol (10–50  $\mu$ mol/L) for 24 and 48 hours. As presented in Figure 1B, resveratrol had no significant effect on the number of viable cells at either time point, except for a modest increase by 19% ( $P < .04$ ) induced by 10  $\mu$ mol/L resveratrol at 24 hours.

### Effects of Resveratrol on Caspase Activation

To determine whether apoptosis has any role in the inhibitory effect of resveratrol on the growth of granulosa cells, caspase-3/7 activity was measured in the absence or in the presence of resveratrol (10–50  $\mu$ mol/L) at various time points (3, 6, 12, 24, and 48 hours). These experiments included early time points to account for possible early actions of resveratrol that may have cumulative long-term effects on end points such as the number of viable cells. As can be seen in Figure 1C, resveratrol at the lower concentration (10  $\mu$ mol/L) modestly protected granulosa cells from caspase-3/7

FIGURE 1



Ortega. Effect of resveratrol on granulosa cells. *Fertil Steril* 2012.

## FIGURE 1 Continued

(A) Effect of resveratrol (10–50  $\mu\text{mol/L}$ ) on proliferation. Granulosa cells were cultured in chemically defined media supplemented with FSH (30 ng/mL) for 24 and 48 h in the absence (control) or in the presence of resveratrol. Proliferation was evaluated by determination of DNA synthesis (by thymidine incorporation). Results are presented as percentage of control. Each bar represents mean  $\pm$  SEM from two independent experiments (each with  $n = 8$ ). Means with no superscripts in common are significantly different ( $P < .05$ ). (B) Effect of resveratrol (10–50  $\mu\text{mol/L}$ ) on cell viability. Granulosa cells were cultured in chemically defined media supplemented with FSH (30 ng/mL) for 24 and 48 hours in the absence (control) or in the presence of resveratrol. Cell viability was evaluated by estimation of the number of viable cells with the use of an MTS assay. Results are presented as percentage of control. Each bar represents mean  $\pm$  SEM from two independent experiments (each with  $n = 8$ ). Means with no superscripts in common are significantly different ( $P < .05$ ). (C) Effect of resveratrol (10–50  $\mu\text{mol/L}$ ) on activity of executioner caspases 3 and 7. Granulosa cells were cultured in chemically defined media supplemented with FSH (30 ng/mL) for 3, 6, 12, 24, and 48 hours in the absence (control) or in the presence of resveratrol. Caspase-3/7 activity was determined with the use of Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Assay. Caspase activity was calculated per number of viable cells (determined by MTS assay). Results are presented as percentage of control. Each bar represents mean  $\pm$  SEM from three independent experiments (each with  $n = 8$ ). \*Significant difference from control ( $P < .05$ ).

Ortega. Effect of resveratrol on granulosa cells. *Fertil Steril* 2012.

activation at the time points of 3 and 12 hours by 14% ( $P < .05$ ) and 11% ( $P < .01$ ), respectively. The caspase inhibition was no longer evident after 24 or 48 hours of exposure to resveratrol.

### Effects of Resveratrol on Cell Morphology

The effects of resveratrol on the nuclear morphology and cytoskeleton of granulosa cells are presented in Figure 2. In the apoptotic process, the cell undergoes disassembly, which is characterized by cell shrinkage, chromatin condensation, membrane blebbing, and lack of preservation of organelle ultrastructural integrity (21, 22). As shown in Figure 2, after 24 and 48 hours' exposure to increasing doses of resveratrol (10–50  $\mu\text{mol/L}$ ), the shape of the granulosa cells appeared unaltered, with large oval-shaped nuclei and well organized F-actin fibers.

### Effects of Resveratrol on Steroidogenesis

To determine the effect of resveratrol on steroid production, granulosa cells were cultured for 24 and 48 hours in the absence and the presence of resveratrol (10–30  $\mu\text{mol/L}$ ). To account for resveratrol-related effects on the cell number, the production of steroids was expressed as percentage of control per unit of protein content in individual cultures. As shown in Figure 3A, resveratrol had no significant effect on P levels at any of the tested concentrations and time points. However, resveratrol induced a dose-dependent decrease in  $E_2$  levels at both time points: Resveratrol (10 and 30  $\mu\text{mol/L}$ ) induced a significant inhibitory effect on  $E_2$  production by 38% ( $P < .001$ ) and 62% ( $P < .001$ ), respectively, at 24 hours and by 33% ( $P < .05$ ) and 63% ( $P < .001$ ), respectively, at 48 hours (Fig. 3B).

To evaluate the effect of resveratrol on aromatase mRNA expression in the same set of experiments, quantitative real-time PCR reactions were performed. Aromatase cytochrome P450 (encoded by the *CYP19* gene) is the key enzyme required for the biosynthesis of estrogens from C19-steroid precursors and is expressed in granulosa cells (23). As shown in Figure 3C, resveratrol induced a concentration-dependent decrease in *CYP19* mRNA expression. After 48 hours' incubation, resveratrol at both tested concentrations significantly decreased *CYP19* transcripts by 20% ( $P < .05$ ) and 45% ( $P < .001$ ), respectively.

### Effects of Resveratrol on AMH mRNA and Protein Expression

Because AMH plays a significant role in controlling the gonadotropin-independent stages of ovarian follicle development, further experiments were carried out in order to determine whether resveratrol (10–30  $\mu\text{mol/L}$ ) exerts any effect on AMH mRNA expression by granulosa cells at 24 and 48 hours. As shown in Figure 4A, resveratrol had no significant effect on AMH mRNA levels at any of the tested concentrations.

To examine whether the absence of changes in AMH mRNA expression induced by resveratrol was reflected at the protein level, the cells were treated without (control) or with resveratrol (10–30  $\mu\text{mol/L}$ ) for 48 hours. As presented in Figure 4B, no changes in AMH protein expression were observed after resveratrol treatment.

### Effects of Resveratrol on VEGF mRNA and Protein Expression

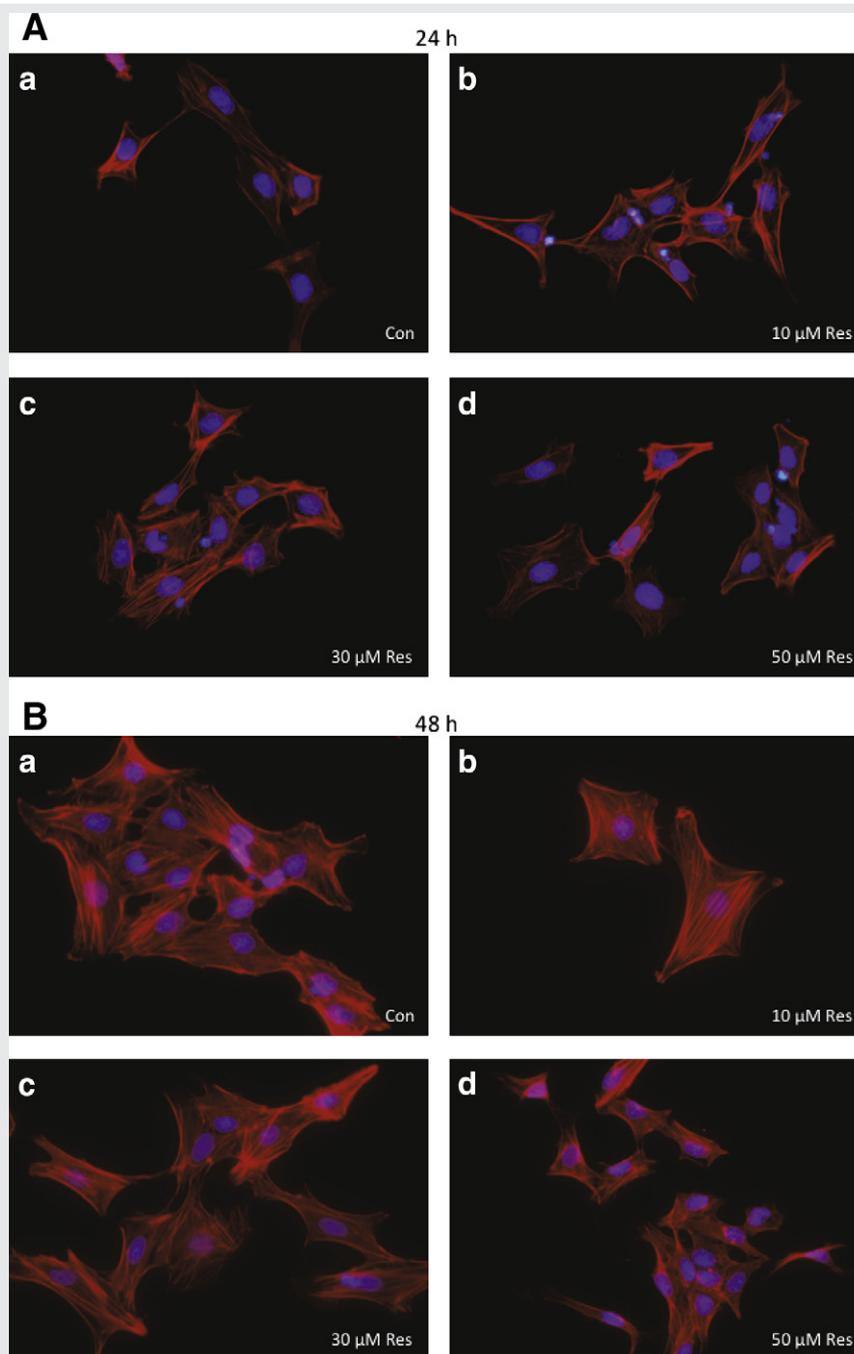
Because vascular VEGF is a key proangiogenic factor involved in the regulation of follicle growth and development of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS), quantitative real-time PCR reactions were performed to evaluate whether resveratrol (10–30  $\mu\text{mol/L}$ ) has any effect on VEGF mRNA expression after 24 and 48 hours' incubation. As shown in Figure 4C, 30  $\mu\text{mol/L}$  resveratrol significantly decreased VEGF mRNA expression at 24 and 48 hours by 42% ( $P < .001$ ) and 18% ( $P < .05$ ), respectively.

To evaluate whether the resveratrol-induced decrease in VEGF mRNA levels correlated with a reduction in protein expression, the cells were cultured with or without resveratrol (10–30  $\mu\text{mol/L}$ ) for 48 hours. As shown in Figure 4D, Western blot analysis showed that 30  $\mu\text{mol/L}$  resveratrol decreased VEGF protein expression by 49% ( $P < .03$ ) compared with control.

### Effects of Resveratrol on HMGCR Activity

In a previous study on theca cells, we observed that resveratrol inhibited HMGCR activity (8). Because HMGCR may affect growth and function of cells, we studied HMGCR activity in granulosa cells in the absence (control) or in the presence of resveratrol at 30 and 50  $\mu\text{mol/L}$  or simvastatin (1  $\mu\text{mol/L}$ ; positive control). Simvastatin significantly reduced HMGCR activity by 41% ( $P < .001$ ); however, resveratrol had no effect

FIGURE 2



Effect of resveratrol (10–50  $\mu\text{mol/L}$ ) on cell morphology. Granulosa cells were cultured for (A) 24 hours and (B) 48 hours in the absence (control) or in the presence of resveratrol, then fixed, stained, and visualized under a fluorescent microscope ( $\times 40$  magnification) as described in Methods. Nuclear staining with 4',6-diamidino-2-phenylindole and F-actin was used to observe morphologic changes. (a) Control; (b) 10  $\mu\text{mol/L}$  resveratrol; (c) 30  $\mu\text{mol/L}$  resveratrol; (d) 50  $\mu\text{mol/L}$  resveratrol.

Ortega. Effect of resveratrol on granulosa cells. *Fertil Steril* 2012.

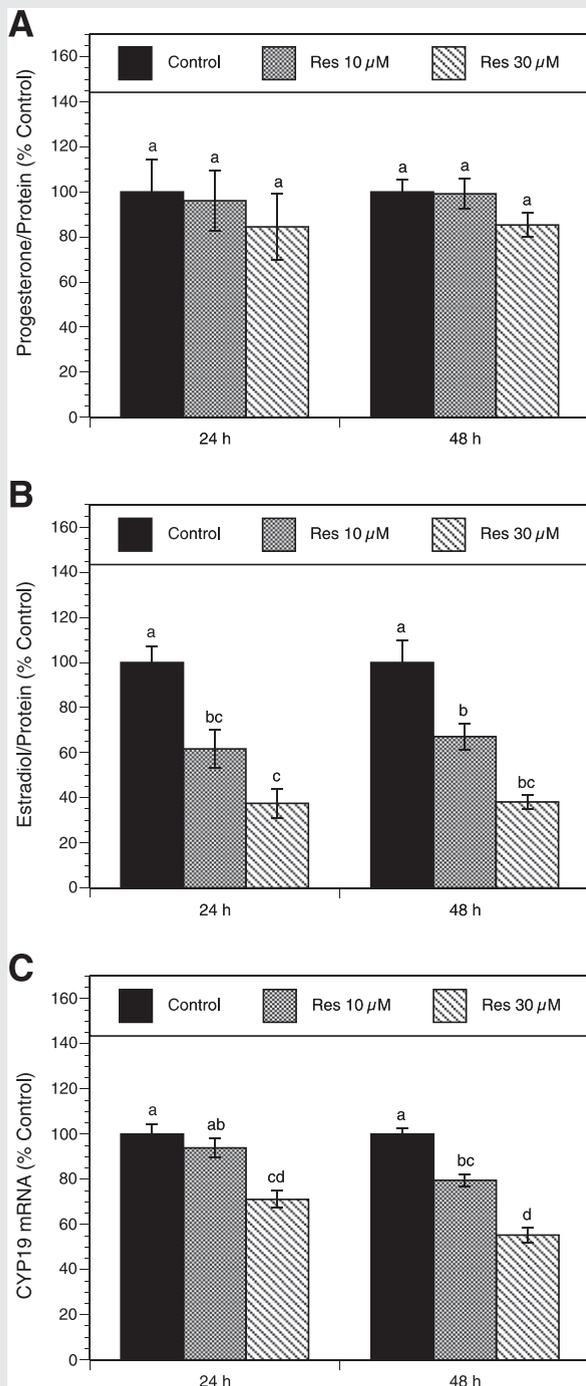
(HMGCR activity  $110 \pm 3\%$  and  $100 \pm 1\%$  of control, respectively, for resveratrol at 30 and 50  $\mu\text{mol/L}$ ).

## DISCUSSION

In the present study we have demonstrated that in cultures of granulosa cells, resveratrol exerts effects greatly differing

from its pro-apoptotic actions on theca-interstitial cells (7). Specifically, in granulosa cells resveratrol: 1) induces a biphasic effect on DNA synthesis, whereby a lower concentration stimulates thymidine incorporation and higher concentrations decrease it; 2) slightly increases the number of viable cells; 3) modestly decreases early caspase activation

FIGURE 3



Effect of resveratrol (10–30  $\mu\text{M}$ ) on (A) progesterone and (B) estradiol production. Granulosa cells were cultured for 24 and 48 hours in chemically defined media supplemented with FSH (30 ng/mL) and testosterone (0.5  $\mu\text{mol/L}$ ) in the absence (control) or in the presence of resveratrol. Progesterone and estrogen levels were determined with the use of liquid chromatography–mass spectrometry. Results are presented as percentage of control. Each bar represents mean  $\pm$  SEM from three independent experiments (each with  $n = 4$ ). Means with no superscripts in common are significantly different ( $P < .05$ ). (C) Effect of resveratrol on CYP19 mRNA expression. Granulosa cells were cultured for 24 and 48 hours in chemically defined media supplemented with FSH

Ortega. Effect of resveratrol on granulosa cells. *Fertil Steril* 2012.

FIGURE 3 Continued

(30 ng/mL) and testosterone (0.5  $\mu\text{mol/L}$ ) in the absence (control) or in the presence of resveratrol. Total cellular RNA was isolated, and mRNA expression was determined using quantitative real-time PCR reactions and normalized to HPRT mRNA levels. Results are presented as percentage of control. Each bar represents mean  $\pm$  SEM from three independent experiments (each with  $n = 4$ ). Means with no superscripts in common are significantly different ( $P < .05$ ).

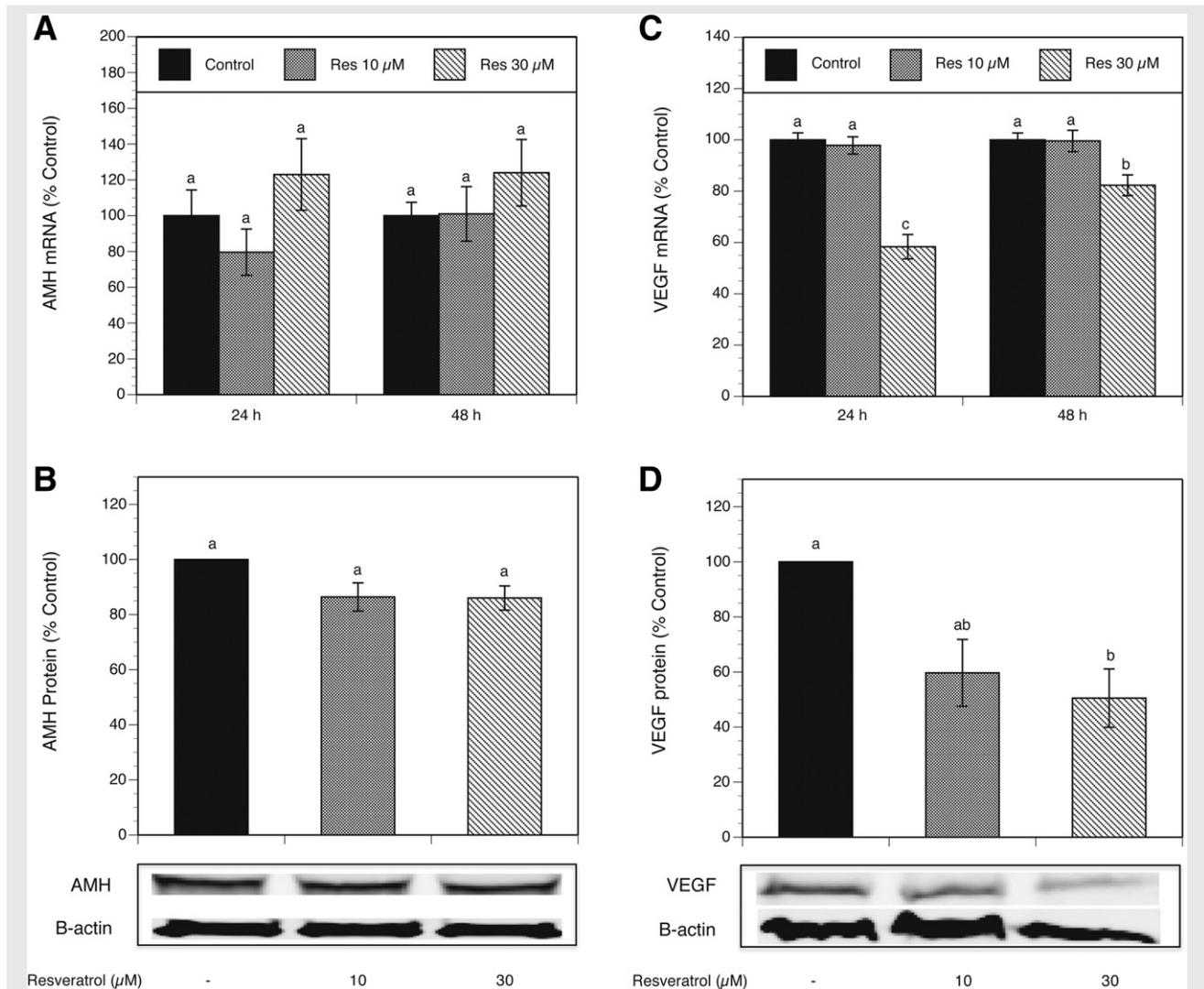
Ortega. Effect of resveratrol on granulosa cells. *Fertil Steril* 2012.

and does not affect cell morphology; 4) does not alter P levels but decreases estrogen production and aromatase mRNA expression in a concentration-dependent fashion; 5) has no effect on AMH expression; 6) decreases VEGF mRNA and protein expression; and 7) does not affect HMGCR activity.

Over the past decade, resveratrol has emerged as a prominent chemopreventive agent that interferes with signaling pathways regulating cell proliferation and survival (24). Indeed, this bioflavonoid has been shown to inhibit cell growth of different primary (7, 25, 26) and human cancer cell lines (27–29). The underlying mechanisms of resveratrol-induced inhibition of cell proliferation may be due to its ability to inhibit both ribonucleotide reductase and DNA polymerase activities (30, 31), two key enzymes involved in DNA synthesis, leading to cell growth inhibition at the S–G2 phase transition of the cell cycle (32, 33). However, the effects of resveratrol on cell growth are not universally inhibitory and vary depending on the concentration, duration of the treatment, and cell type. In the present study, resveratrol exerted an inhibitory effect on granulosa cell DNA synthesis at 24 hours, but when treatment exposure was extended to 48 hours we observed a biphasic effect of resveratrol on DNA synthesis: Resveratrol increased thymidine incorporation at 10  $\mu\text{mol/L}$ , but reduced it at higher concentrations. A similar biphasic effect of resveratrol on cell proliferation has been previously reported in LNCaP cells (34), whereby low concentrations of resveratrol (5–10  $\mu\text{mol/L}$ ) stimulated and high concentrations (15–30  $\mu\text{mol/L}$ ) inhibited DNA synthesis. It has been suggested that this late increase in thymidine incorporation may be due to the cells entering the S phase of the cell cycle, involving signaling pathways that act over several hours (34). This resveratrol-induced biphasic effect on rat granulosa cell growth contrasts with our previous observations in rat theca-interstitial cells, whereby resveratrol showed a potent dose-dependent inhibitory effect on cell growth after 48 hours (7). Moreover, in the same study, resveratrol decreased the number of viable theca cells, in contrast with the modest increase in granulosa cell viability observed in the present work. Taken together, these findings suggest that resveratrol has distinctly different effects on proliferation of cells in the theca and granulosa compartments.

Apoptosis or programmed cell death occurs in several physiologic and pathologic situations (35). Typical apoptosis consists of four events at the execution stage: caspase activation, internucleosomal DNA cleavage, chromatin condensation, and apoptotic formation (36). In the present study, we

## FIGURE 4



(A) Effect of resveratrol (10–30  $\mu$ mol/L) on antimüllerian hormone (AMH) mRNA expression. Granulosa cells were cultured for 24 and 48 hours in chemically defined media supplemented with FSH (30 ng/mL) and testosterone (0.5  $\mu$ mol/L) in the absence (control) or in the presence of resveratrol. Total cellular RNA was isolated, and mRNA expression was determined with the use of quantitative real-time PCR reactions and normalized to HPRT mRNA levels. Results are presented as percentage of control. Each bar represents mean  $\pm$  SEM from three independent experiments (each with  $n = 4$ ). Means with no superscripts in common are significantly different ( $P < .05$ ). (B) Effect of resveratrol (10–30  $\mu$ mol/L) on AMH protein expression. Granulosa cells were cultured for 48 hours in chemically defined media supplemented with FSH (30 ng/mL) and testosterone (0.5  $\mu$ mol/L) in the absence (control) or in the presence of resveratrol. AMH protein level was determined with the use of Western blot analysis and normalized to  $\beta$ -actin. One of three representative blots is shown. Results are presented as percentage of control. Each bar represents mean  $\pm$  SEM from three independent experiments (each with  $n = 1$ ). Means with no superscripts in common are significantly different ( $P < .05$ ). (C) Effect of resveratrol (10–30  $\mu$ mol/L) on VEGF mRNA expression. Granulosa cells were cultured for 24 and 48 hours in chemically defined media supplemented with FSH (30 ng/mL) and testosterone (0.5  $\mu$ mol/L) in the absence (control) or in the presence of resveratrol. Total cellular RNA was isolated, and mRNA expression was determined with the use of quantitative real-time PCR reactions and normalized to HPRT mRNA levels. Results are presented as percentage of control. Each bar represents mean  $\pm$  SEM from three independent experiments (each with  $n = 4$ ). Means with no superscripts in common are significantly different ( $P < .05$ ). (D) Effect of resveratrol (10–30  $\mu$ mol/L) on VEGF protein expression. Granulosa cells were cultured for 48 hours in chemically defined media supplemented with FSH (30 ng/mL) and testosterone (0.5  $\mu$ M) in the absence (control) or in the presence of resveratrol. VEGF protein level was determined with the use of Western blot analysis and normalized to  $\beta$ -actin. One of three representative blots is shown. Results are presented as percentage of control. Each bar represents mean  $\pm$  SEM from three independent experiments (each with  $n = 1$ ). Means with no superscripts in common are significantly different ( $P < .05$ ).

Ortega. Effect of resveratrol on granulosa cells. *Fertil Steril* 2012.

observed a modest decrease in caspase-3/7 activity and an absence of morphologic changes consistent with apoptosis, suggesting that resveratrol not only does not induce apoptosis

but may even protect rat granulosa cells from apoptosis. Earlier studies have reported contradictory results regarding the role of resveratrol in apoptosis: Resveratrol has been shown

to prevent apoptosis in several cell types, including rat embryonic cells and human erythroleukemia K562 cells (37, 38), whereas a proapoptotic effect of resveratrol has been demonstrated in both primary and cancer cell lines (7, 39, 40). Interestingly, divergent effects of resveratrol on apoptosis may occur in different cell types within the same organ. In the ovary, our previous *in vitro* study demonstrated that resveratrol increases the activity of executioner caspases 3 and 7, increases DNA fragmentation, and induces progressive concentration- and time-dependent morphologic changes in rat theca-interstitial cells (7). In contrast, the present study shows that resveratrol has a minimal effect on granulosa cell apoptosis. Because resveratrol exerts different effects on apoptosis in two cellular compartments of the follicle, it is likely that it may alter the balance between the relative number of theca and granulosa cells.

Proper regulation of apoptosis and proliferation is essential to sustain tissue homeostasis. In light of the present findings, one may speculate that the overall antiproliferative effect of resveratrol on granulosa cells is not related to its proapoptotic properties, suggesting that resveratrol affects granulosa cell growth by exerting mainly cytostatic, but not cytotoxic, effects. This observation may be of relevance to ovarian folliculogenesis, whereby the bidirectional cross-talk between the oocyte and its surrounding granulosa cells (both cumulus and mural) is crucial for normal follicle development (41–43).

According to the two-cell–two-gonadotropin theory, FSH is responsible for estrogen production in granulosa cells by aromatization of androgens synthesized in theca cells (44). In the present study, resveratrol had no effect on P levels and induced a concentration-dependent decrease in E<sub>2</sub> production and aromatase mRNA expression in granulosa cells. This finding is in agreement with earlier studies, whereby resveratrol induced an inhibitory effect on aromatase gene expression and activity in placental cells (45), breast cancer cells (46), and human granulosa-luteal cells (47). Although the underlying mechanisms of resveratrol-induced inhibition of aromatase is still poorly understood, it has been suggested that both binding to estrogen receptors and/or a modulation of cell signaling pathways may be involved (48). This resveratrol-induced inhibitory effect on aromatization is in sharp contrast with an earlier study where stimulation of steroidogenesis by a hydroxylated resveratrol analogue was shown in a swine granulosa cell model (49). These marked discrepancies on granulosa cell steroidogenesis between the parent compound and the hydroxylated resveratrol analogue may be due to the fact that the hydroxyl group could act at a proximal point of the steroid biosynthetic pathway, thus stimulating both P and E<sub>2</sub> production.

AMH, a member of the transforming growth factor  $\beta$  family, was identified as a factor that causes regression of the müllerian ducts during male fetal development (50). In female individuals, AMH is produced by granulosa cells of ovarian follicles and acts as a marker of granulosa cell differentiation. AMH mRNA expression has been detected in granulosa cells of primary follicles immediately after their formation in neonatal rats and mice, as well as in granulosa cells of all secondary preantral stage follicles and small antral follicles.

AMH starts to diminish during further folliculogenesis from the small antral follicle stage onward (51). In the present study, resveratrol had no effect on either AMH mRNA or protein expression in granulosa cells, suggesting that it did not induce differentiation/maturation of these cells.

VEGF, a potent angiogenic mitogen, is an important mediator during the normal ovarian cycle and has been shown to increase the permeability of blood vessels (52). In addition, VEGF has been shown to play a prominent role in the pathophysiology of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS), a condition frequently associated with polycystic ovaries, whereby VEGF mediates increased vascular permeability and endothelial migration at least partly through modulation of vascular endothelial cadherin function (53). In the present study, resveratrol decreased both VEGF mRNA and protein expression in granulosa cells. Similarly, a resveratrol-induced decrease in VEGF expression has been demonstrated in several human cancer cell lines (54–56). Additionally, Basini et al. (49) demonstrated that the treatment of swine granulosa cells with two resveratrol analogues hydroxylated and methylated forms, also decreased VEGF output. These observations may be relevant to the treatment of several gynecologic disorders, because abnormalities in ovarian angiogenesis contribute to OHSS seen in women with PCOS, and to disorders of ovulation, to subfertility, and to endometriosis.

The most interesting findings of the present study pertain to the inhibitory effects of resveratrol on production of estrogen and VEGF by isolated granulosa cells. An important next logical step would be to evaluate actions of resveratrol *in vivo*, in particular on steroidogenesis, as well as to study effects of resveratrol on animal models of OHSS. One may hypothesize that administration of resveratrol *in vivo* may reduce aromatization and improve OHSS. However, it is also possible that resveratrol may have adverse effects on folliculogenesis; therefore, an enthusiasm for potential therapeutic value of resveratrol needs to be tempered until *in vivo* studies are completed.

Keeping in mind the above cautionary comments, it is possible that the present findings may have clinical relevance to conditions associated with highly vascularized ovaries, with thecal hyperplasia, and altered growth and function of granulosa cells, such as seen in PCOS. Previously, an increase of granulosa cell proliferation was shown in early-growing follicles in both anovulatory and ovulatory PCOS patients (12, 57). In addition, differences in the rate of cell death and proliferation in granulosa cell populations have been reported in PCOS (12). Therefore, we speculate that resveratrol may alter the ratio of theca to granulosa cells by inducing antiproliferative and proapoptotic actions on theca cells and exerting a cytostatic, but not cytotoxic, effect on granulosa cells. On the other hand, an overexpression of VEGF has been shown in the dense hyperthecotic stroma of polycystic ovaries which was associated with increased ovarian stromal blood flow (52). Therefore, the resveratrol-induced suppressive effect on VEGF expression may be of potential relevance in treating disorders related to increased vascular permeability and simultaneous overexpression of VEGF, such as seen in OHSS.

In conclusion, the present study suggests that resveratrol exerts a cytostatic, but not cytotoxic, effect on rat granulosa cells. The present study also shows that resveratrol inhibits granulosa cell aromatization and decreases VEGF expression in granulosa cells. These actions may be of clinical relevance to conditions associated with highly vascularized theca-interstitial hyperplasia and abnormal angiogenesis, such as those seen in women with PCOS. Furthermore, these effects on granulosa cells also provide a rationale for new therapeutic approaches to prevent and/or treat OHSS and other gynecologic conditions with excessive VEGF expression and/or activity.

## REFERENCES

- Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:493–506.
- Nassiri-Asl M, Hosseinzadeh H. Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (grape) and its bioactive compounds. *Phytotherapy research: PTR* 2009;23:1197–204.
- Labinsky N, Csiszar A, Veress G, Stef G, Pacher P, Oroszi G, et al. Vascular dysfunction in aging: potential effects of resveratrol, an antiinflammatory phytoestrogen. *Curr Med Chem* 2006;13:989–96.
- Penumathsa SV, Maulik N. Resveratrol: a promising agent in promoting cardioprotection against coronary heart disease. *Can J Physiol Pharmacol* 2009; 87:275–86.
- Yousuf S, Atif F, Ahmad M, Hoda N, Ishrat T, Khan B, et al. Resveratrol exerts its neuroprotective effect by modulating mitochondrial dysfunctions and associated cell death during cerebral ischemia. *Brain Res* 2009;1250:242–53.
- Athar M, Back JH, Kopelovich L, Bickers DR, Kim AL. Multiple molecular targets of resveratrol: anti-carcinogenic mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 2009;486:95–102.
- Wong DH, Villanueva JA, Cress AB, Duleba AJ. Effects of resveratrol on proliferation and apoptosis in rat ovarian theca-interstitial cells. *Mol Hum Reprod* 2010;16:251–9.
- Wong DH, Villanueva JA, Cress AB, Sokalska A, Ortega I, Duleba AJ. Resveratrol inhibits the mevalonate pathway and potentiates the antiproliferative effects of simvastatin in rat theca-interstitial cells. *Fertil Steril* 2011;96: 1252–8.
- Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2745–9.
- Peitsidis P, Agrawal R. Role of vascular endothelial growth factor in women with PCO and PCOS: a systematic review. *Reprod Biomed Online* 2010;20: 444–52.
- Yada H, Hosokawa K, Tajima K, Hasegawa Y, Kotsuji F. Role of ovarian theca and granulosa cell interaction in hormone production and cell growth during the bovine follicular maturation process. *Biol Reprod* 1999;61:1480–6.
- Das M, Djahanbakhch O, Hachianefioglu B, Saridogan E, Ikram M, Ghali L, et al. Granulosa cell survival and proliferation are altered in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:881–7.
- Erickson GF, Magoffin DA, Cragun JR, Chang RJ. The effects of insulin and insulin-like growth factors-I and -II on estradiol production by granulosa cells of polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:894–902.
- Pigny P, Merlen E, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Decanter C, Jonard S, et al. Elevated serum level of antimüllerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5957–62.
- Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP. Regulation of ovarian function: the role of anti-müllerian hormone. *Reproduction* 2002;124:601–9.
- Pellatt L, Hanna L, Brincat M, Galea R, Brain H, Whitehead S, et al. Granulosa cell production of anti-müllerian hormone is increased in polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:240–5.
- Fan HY, Shimada M, Liu Z, Cahill N, Noma N, Wu Y, et al. Selective expression of KrasG12D in granulosa cells of the mouse ovary causes defects in follicle development and ovulation. *Development* 2008;135:2127–37.
- Schreiber JR, Nakamura K, Erickson GF. Progestins inhibit FSH-stimulated steroidogenesis in cultured rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 1980; 19:165–73.
- Wang C, Hsueh AJ, Erickson GF. LH stimulation of estrogen secretion by cultured rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 1981;24:17–28.
- Ortega I, Cress AB, Wong DH, Villanueva JA, Sokalska A, Moeller BC, et al. Simvastatin reduces steroidogenesis by inhibiting *Cyp17a1* gene expression in rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol Reprod* 2012;86:1–9.
- Yamazaki Y, Tsuruga M, Zhou D, Fujita Y, Shang X, Dang Y, et al. Cytoskeletal disruption accelerates caspase-3 activation and alters the intracellular membrane reorganization in DNA damage-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 2000;259:64–78.
- White SR, Williams P, Wojcik KR, Sun S, Hiemstra PS, Rabe KF, et al. Initiation of apoptosis by actin cytoskeletal derangement in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;24:282–94.
- Czajka-Oraniec I, Simpson ER. Aromatase research and its clinical significance. *Endokrynol Pol* 2010;61:126–34.
- Fulda S, Debatin KM. Resveratrol modulation of signal transduction in apoptosis and cell survival: a mini-review. *Cancer Detect Prev* 2006;30: 217–23.
- Iijima K, Yoshizumi M, Hashimoto M, Kim S, Eto M, Ako J, et al. Red wine polyphenols inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells and down-regulate expression of cyclin A gene. *Circulation* 2000;101:805–11.
- Kawada N, Seki S, Inoue M, Kuroki T. Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology* 1998;27:1265–74.
- Alkhalaf M, Jaffal S. Potent antiproliferative effects of resveratrol on human osteosarcoma SJS1 cells: novel cellular mechanisms involving the ERKs/p53 cascade. *Free Radic Biol Med* 2006;41:318–25.
- Cui J, Sun R, Yu Y, Gou S, Zhao G, Wang C. Antiproliferative effect of resveratrol in pancreatic cancer cells. *Phytother Res* 2010;24:1637–44.
- Kim YA, Rhee SH, Park KY, Choi YH. Antiproliferative effect of resveratrol in human prostate carcinoma cells. *J Med Food* 2003;6:273–80.
- Fontecave M, Lepoivre M, Elleingand E, Gerez C, Guittet O. Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. *FEBS Lett* 1998;421: 277–9.
- Sun NJ, Woo SH, Cassady JM, Snapka RM. DNA polymerase and topoisomerase II inhibitors from *Psoralea corylifolia*. *J Nat Prod* 1998;61:362–6.
- Ragione FD, Cucciolla V, Borriello A, Pietra VD, Racioppi L, Soldati G, et al. Resveratrol arrests the cell division cycle at S/G2 phase transition. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;250:53–8.
- Schneider Y, Vincent F, Duranton B, Badolo L, Gosse F, Bergmann C. Antiproliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. *Cancer Lett* 2000;158:85–91.
- Kuwajerwala N, Cifuentes E, Gautam S, Menon M, Barrack ER, Reddy GP. Resveratrol induces prostate cancer cell entry into S phase and inhibits DNA synthesis. *Cancer Res* 2002;62:2488–92.
- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35:495–516.
- Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326(Pt 1):1–16.
- Singh CK, Kumar A, Hitchcock DB, Fan D, Goodwin R, Lavoie HA, et al. Resveratrol prevents embryonic oxidative stress and apoptosis associated with diabetic embryopathy and improves glucose and lipid profile of diabetic dam. *Mol Nutr Food Res* 2011;55:1186–96.
- MacCarrone M, Lorenzon T, Guerrieri P, Agro AF. Resveratrol prevents apoptosis in K562 cells by inhibiting lipoxygenase and cyclooxygenase activity. *Eur J Biochem* 1999;265:27–34.
- Clement MV, Hirpara JL, Chawdhury SH, Pervaiz S. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood* 1998;92: 996–1002.
- Hsieh TC, Wu JM. Differential effects on growth, cell cycle arrest, and induction of apoptosis by resveratrol in human prostate cancer cell lines. *Exp Cell Res* 1999;249:109–15.
- Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 2001;122:829–38.

42. Gilchrist RB, Ritter LJ, Myllymaa S, Kaivo-Oja N, Dragovic RA, Hickey TE, et al. Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. *J Cell Sci* 2006;119:3811–21.
43. Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:2890–4.
44. Hillier SG, Whitelaw PF, Smyth CD. Follicular oestrogen synthesis: the “two-cell, two-gonadotrophin” model revisited. *Mol Cell Endocrinol* 1994;100:51–4.
45. Wang Y, Leung LK. Pharmacological concentration of resveratrol suppresses aromatase in JEG-3 cells. *Toxicol Lett* 2007;173:175–80.
46. Wang Y, Lee KW, Chan FL, Chen S, Leung LK. The red wine polyphenol resveratrol displays bilevel inhibition on aromatase in breast cancer cells. *Toxicol Sci* 2006;92:71–7.
47. Whitehead SA, Lacey M. Phytoestrogens inhibit aromatase but not 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) type 1 in human granulosa-luteal cells: evidence for FSH induction of 17beta-HSD. *Hum Reprod* 2003;18:487–94.
48. Rice S, Mason HD, Whitehead SA. Phytoestrogens and their low dose combinations inhibit mRNA expression and activity of aromatase in human granulosa-luteal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006;101:216–25.
49. Basini G, Tringali C, Baioni L, Bussolati S, Spatafora C, Grasselli F. Biological effects on granulosa cells of hydroxylated and methylated resveratrol analogues. *Mol Nutr Food Res* 2010;54 (Suppl 2):S236–43.
50. Behringer RR, Finegold MJ, Cate RL. Mullerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* 1994;79:415–25.
51. Baarends WM, Hoogerbrugge JW, Post M, Visser JA, de Rooij DG, Parvinen M, et al. Antimullerian hormone and antimullerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression during postnatal testis development and in the adult testis of the rat. *Endocrinology* 1995;136:5614–22.
52. Kamat BR, Brown LF, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. Role in corpus luteum development. *Am J Pathol* 1995;146:157–65.
53. Villasante A, Pacheco A, Ruiz A, Pellicer A, Garcia-Velasco JA. Vascular endothelial cadherin regulates vascular permeability: implications for ovarian hyperstimulation syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:314–21.
54. Yang R, Zhang H, Zhu L. Inhibitory effect of resveratrol on the expression of the VEGF gene and proliferation in renal cancer cells. *Mol Med Report* 2011;4:981–3.
55. Yu HB, Zhang HF, Zhang X, Li DY, Xue HZ, Pan CE, et al. Resveratrol inhibits VEGF expression of human hepatocellular carcinoma cells through a NF-kappa B-mediated mechanism. *Hepatogastroenterology* 2010;57:1241–9.
56. Trapp V, Parmakhtiar B, Papazian V, Willmott L, Fruehauf JP. Anti-angiogenic effects of resveratrol mediated by decreased VEGF and increased TSP1 expression in melanoma-endothelial cell co-culture. *Angiogenesis* 2010;13:305–15.
57. Stubbs SA, Stark J, Dilworth SM, Franks S, Hardy K. Abnormal preantral folliculogenesis in polycystic ovaries is associated with increased granulosa cell division. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:4418–26.

**CAPÍTULO VIII.**  
**BIBLIOGRAFÍA**



1. Stein IF, Leventhal, ML. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol* 1935;29:181-191
2. Smith KD, Steinberger E, Perloff WH. Polycystic ovarian disease. A report of 301 patients. *Am J Obstet Gynecol* 1965;93:994-1001.
3. Rebar R, Judd HL, Yen SS, Rakoff J, Vandenberg G, Naftolin F. Characterization of the inappropriate gonadotropin secretion in polycystic ovary syndrome. *J Clin Invest* 1976;57:1320-9.
4. Burghen GA, Givens JR, Kitabchi AE. Correlation of hyperandrogenism with hyperinsulinism in polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;50:113-6.
5. Swanson M, Sauerbrei EE, Cooperberg PL. Medical implications of ultrasonically detected polycystic ovaries. *J Clin Ultrasound* 1981;9:219-22.
6. Adams J, Franks S, Polson DW, Mason HD, Abdulwahid N, Tucker M, *et al.* Multifollicular ovaries: clinical and endocrine features and response to pulsatile gonadotropin releasing hormone. *Lancet* 1985;2:1375-9.
7. Zawadski JK, Dunaif A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome: towards a rational approach. In: Dunaif A, Givens JR, Haseltine FP, Merriam GR, eds. *Polycystic Ovary Syndrome*. Boston: Blackwell Scientific Publications; 1992:377-384
8. Balen A. Pathogenesis of polycystic ovary syndrome--the enigma unravels? *Lancet* 1999;354:966-7.
9. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod* 2004;19:41-7.
10. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, *et al.* Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome

as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4237-45.

11. Chang RJ. A practical approach to the diagnosis of polycystic ovary syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:713-7.

12. Asuncion M, Calvo RM, San Millan JL, Sancho J, Avila S, Escobar-Morreale HF. A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2434-8.

13. Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2745-9.

14. Knochenhauer ES, Key TJ, Kahsar-Miller M, Waggoner W, Boots LR, Azziz R. Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3078-82.

15. Diamanti-Kandarakis E, Kouli CR, Bergiele AT, Filandra FA, Tsianateli TC, Spina GG, *et al.* A survey of the polycystic ovary syndrome in the Greek island of Lesbos: hormonal and metabolic profile. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:4006-11.

16. Michelmore KF, Balen AH, Dunger DB, Vessey MP. Polycystic ovaries and associated clinical and biochemical features in young women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999;51:779-86.

17. March WA, Moore VM, Willson KJ, Phillips DI, Norman RJ, Davies MJ. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Hum Reprod* 2010;25:544-51.

18. Broekmans FJ, Knauff EA, Valkenburg O, Laven JS, Eijkemans MJ, Fauser BC. PCOS according to the Rotterdam consensus criteria: Change in prevalence among WHO-II anovulation and association with metabolic factors. *BJOG* 2006;113:1210-7.

19. Huddleston HG, Cedars MI, Sohn SH, Giudice LC, Fujimoto VY. Racial and ethnic disparities in reproductive endocrinology and infertility. *Am J Obstet Gynecol* 2010;202:413-9.
20. Chen X, Yang D, Mo Y, Li L, Chen Y, Huang Y. Prevalence of polycystic ovary syndrome in unselected women from southern China. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008;139:59-64.
21. Lookingbill DP, Demers LM, Wang C, Leung A, Rittmaster RS, Santen RJ. Clinical and biochemical parameters of androgen action in normal healthy Caucasian versus Chinese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72:1242-8.
22. Dunaif A, Sorbara L, Delson R, Green G. Ethnicity and polycystic ovary syndrome are associated with independent and additive decreases in insulin action in Caribbean-Hispanic women. *Diabetes* 1993;42:1462-8.
23. Legro RS, Myers ER, Barnhart HX, Carson SA, Diamond MP, Carr BR, *et al.* The Pregnancy in Polycystic Ovary Syndrome study: baseline characteristics of the randomized cohort including racial effects. *Fertil Steril* 2006;86:914-33.
24. Carey AH, Chan KL, Short F, White D, Williamson R, Franks S. Evidence for a single gene effect causing polycystic ovaries and male pattern baldness. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1993;38:653-8.
25. Cooper HE, Spellacy WN, Prem KA, Cohen WD. Hereditary factors in the Stein-Leventhal syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1968;100:371-87.
26. Hague WM, Adams J, Reeders ST, Peto TE, Jacobs HS. Familial polycystic ovaries: a genetic disease? *Clin Endocrinol (Oxf)* 1988;29:593-605.
27. Govind A, Obhrai MS, Clayton RN. Polycystic ovaries are inherited as an autosomal dominant trait: analysis of 29 polycystic ovary syndrome and 10 control families. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:38-43.

28. Legro RS. Insulin resistance in polycystic ovary syndrome: treating a phenotype without a genotype. *Mol Cell Endocrinol* 1998;145:103-10.
29. Jahanfar S, Eden JA, Warren P, Seppala M, Nguyen TV. A twin study of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 1995;63:478-86.
30. Sam S, Coviello AD, Sung YA, Legro RS, Dunaif A. Metabolic phenotype in the brothers of women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care* 2008;31:1237-41.
31. Coviello AD, Sam S, Legro RS, Dunaif A. High prevalence of metabolic syndrome in first-degree male relatives of women with polycystic ovary syndrome is related to high rates of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:4361-6.
32. Vink JM, Sadrzadeh S, Lambalk CB, Boomsma DI. Heritability of polycystic ovary syndrome in a Dutch twin-family study. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:2100-4.
33. vom Saal FS, Bronson FH. Sexual characteristics of adult female mice are correlated with their blood testosterone levels during prenatal development. *Science* 1980;208:597-9.
34. Abbott DH, Tarantal AF, Dumesic DA. Fetal, infant, adolescent and adult phenotypes of polycystic ovary syndrome in prenatally androgenized female rhesus monkeys. *Am J Primatol* 2009;71:776-84.
35. Melo AS, Vieira CS, Barbieri MA, Rosa-E-Silva AC, Silva AA, Cardoso VC, *et al.* High prevalence of polycystic ovary syndrome in women born small for gestational age. *Hum Reprod* 2010;25:2124-31.
36. Ibanez L, Potau N, Ferrer A, Rodriguez-Hierro F, Marcos MV, de Zegher F. Reduced ovulation rate in adolescent girls born small for gestational age. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3391-3.
37. Ibanez L, Ong K, Dunger DB, de Zegher F. Early development of adiposity and insulin resistance after catch-up weight gain in small-for-gestational-age children. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:2153-8.

38. Ibanez L, Lopez-Bermejo A, Diaz M, Suarez L, de Zegher F. Low-birth weight children develop lower sex hormone binding globulin and higher dehydroepiandrosterone sulfate levels and aggravate their visceral adiposity and hypoadiponectinemia between six and eight years of age. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:3696-9.
39. Jaquet D, Deghmoun S, Chevenne D, Collin D, Czernichow P, Levy-Marchal C. Dynamic change in adiposity from fetal to postnatal life is involved in the metabolic syndrome associated with reduced fetal growth. *Diabetologia* 2005;48:849-55.
40. Tian JY, Cheng Q, Song XM, Li G, Jiang GX, Gu YY, *et al.* Birth weight and risk of type 2 diabetes, abdominal obesity and hypertension among Chinese adults. *Eur J Endocrinol* 2006;155:601-7.
41. Legro RS, Bentley-Lewis R, Driscoll D, Wang SC, Dunaif A. Insulin resistance in the sisters of women with polycystic ovary syndrome: association with hyperandrogenemia rather than menstrual irregularity. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2128-33.
42. Morin-Papunen LC, Duleba AJ, Bloigu A, Jarvelin MR, Saikku P, Pouta A. Chlamydia antibodies and self-reported symptoms of oligo-amenorrhea and hirsutism: a new etiologic factor in polycystic ovary syndrome? *Fertil Steril* 2010;94:1799-804.
43. Waldstreicher J, Santoro NF, Hall JE, Filicori M, Crowley WF, Jr. Hyperfunction of the hypothalamic-pituitary axis in women with polycystic ovarian disease: indirect evidence for partial gonadotroph desensitization. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;66:165-72.
44. Yen SS, Vela P, Rankin J. Inappropriate secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1970;30:435-42.
45. Marshall JC, Eagleson CA. Neuroendocrine aspects of polycystic ovary syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1999;28:295-324.

46. Taylor AE, McCourt B, Martin KA, Anderson EJ, Adams JM, Schoenfeld D, *et al.* Determinants of abnormal gonadotropin secretion in clinically defined women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2248-56.
47. Venturoli S, Porcu E, Fabbri R, Magrini O, Paradisi R, Pallotti G, *et al.* Postmenarchal evolution of endocrine pattern and ovarian aspects in adolescents with menstrual irregularities. *Fertil Steril* 1987;48:78-85.
48. Dalkin AC, Haisenleder DJ, Ortolano GA, Ellis TR, Marshall JC. The frequency of gonadotropin-releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 1989;125:917-24.
49. Wierman ME, Rivier JE, Wang C. Gonadotropin-releasing hormone-dependent regulation of gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid levels in the rat. *Endocrinology* 1989;124:272-8.
50. Spratt DI, Finkelstein JS, Butler JP, Badger TM, Crowley WF, Jr. Effects of increasing the frequency of low doses of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) on gonadotropin secretion in GnRH-deficient men. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;64:1179-86.
51. Soules MR, Clifton DK, Bremner WJ, Steiner RA. Corpus luteum insufficiency induced by a rapid gonadotropin-releasing hormone-induced gonadotropin secretion pattern in the follicular phase. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;65:457-64.
52. Pastor CL, Griffin-Korf ML, Aloji JA, Evans WS, Marshall JC. Polycystic ovary syndrome: evidence for reduced sensitivity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator to inhibition by estradiol and progesterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:582-90.
53. Eagleson CA, Gingrich MB, Pastor CL, Arora TK, Burt CM, Evans WS, *et al.* Polycystic ovarian syndrome: evidence that flutamide restores sensitivity of the

gonadotropin-releasing hormone pulse generator to inhibition by estradiol and progesterone. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4047-52.

54. Pagan YL, Srouji SS, Jimenez Y, Emerson A, Gill S, Hall JE. Inverse relationship between luteinizing hormone and body mass index in polycystic ovarian syndrome: investigation of hypothalamic and pituitary contributions. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:1309-16.

55. Cedars MI, Steingold KA, de Ziegler D, Lapolt PS, Chang RJ, Judd HL. Long-term administrations of gonadotropin-releasing hormone agonist and dexamethasone: assessment of the adrenal role in ovarian dysfunction. *Fertil Steril* 1992;57:495-500

56. Fulghesu AM, Lanzone A, Fortini A, Guido M, Caruso A, Mancuso S. Evaluation of ovarian and adrenal sources of androgens in women with polycystic ovary syndrome. Dexamethasone and GnRH-agonist administration. *J Reprod Med* 1993;38:387-92.

57. Duleba AJ, Spaczynski RZ, Olive DL. Insulin and insulin-like growth factor I stimulate the proliferation of human ovarian theca-interstitial cells. *Fertil Steril* 1998;69:335-40.

58. Spaczynski RZ, Tilly JL, Mansour A, Duleba AJ. Insulin and insulin-like growth factors inhibit and luteinizing hormone augments ovarian theca-interstitial cell apoptosis. *Mol Hum Reprod* 2005;11:319-24.

59. Piltonen T, Koivunen R, Perheentupa A, Morin-Papunen L, Ruukonen A, Tapanainen JS. Ovarian age-related responsiveness to human chorionic gonadotropin in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3769-75.

60. Cheung AP, Pride SM, Yuen BH, Sy L. In-vivo ovarian androgen responses to recombinant FSH with and without recombinant LH in polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 2002;17:2540-7.

61. Gilling-Smith C, Story H, Rogers V, Franks S. Evidence for a primary abnormality of thecal cell steroidogenesis in the polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997;47:93-9.
62. Nelson VL, Legro RS, Strauss JF,3rd, McAllister JM. Augmented androgen production is a stable steroidogenic phenotype of propagated theca cells from polycystic ovaries. *Mol Endocrinol* 1999;13:946-57.
63. Nelson VL, Qin KN, Rosenfield RL, Wood JR, Penning TM, Legro RS, *et al.* The biochemical basis for increased testosterone production in theca cells propagated from patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5925-33.
64. Wickenheisser JK, Quinn PG, Nelson VL, Legro RS, Strauss JF,3rd, McAllister JM. Differential activity of the cytochrome P450 17alpha-hydroxylase and steroidogenic acute regulatory protein gene promoters in normal and polycystic ovary syndrome theca cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2304-11.
65. Lu AY, Junk KW, Coon MJ. Resolution of the cytochrome P-450-containing omega-hydroxylation system of liver microsomes into three components. *J Biol Chem* 1969;244:3714-21.
66. Wood JR, Ho CK, Nelson-DeGrave VL, McAllister JM, Strauss JF,3rd. The molecular signature of polycystic ovary syndrome (PCOS) theca cells defined by gene expression profiling. *J Reprod Immunol* 2004;63:51-60.
67. Wickenheisser JK, Nelson-DeGrave VL, Quinn PG, McAllister JM. Increased cytochrome P450 17alpha-hydroxylase promoter function in theca cells isolated from patients with polycystic ovary syndrome involves nuclear factor-1. *Mol Endocrinol* 2004;18:588-605.
68. Wickenheisser JK, Nelson-DeGrave VL, McAllister JM. Human ovarian theca cells in culture. *Trends Endocrinol Metab* 2006;17:65-71.

69. Wickenheisser JK, Nelson-DeGrave VL, Hendricks KL, Legro RS, Strauss JF,3rd, McAllister JM. Retinoids and retinol differentially regulate steroid biosynthesis in ovarian theca cells isolated from normal cycling women and women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4858-65.
70. Wickenheisser JK, Nelson-DeGrave VL, McAllister JM. Dysregulation of cytochrome P450 17alpha-hydroxylase messenger ribonucleic acid stability in theca cells isolated from women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:1720-7.
71. Wood JR, Nelson VL, Ho C, Jansen E, Wang CY, Urbanek M, *et al.* The molecular phenotype of polycystic ovary syndrome (PCOS) theca cells and new candidate PCOS genes defined by microarray analysis. *J Biol Chem* 2003;278:26380-90.
72. Wickenheisser JK, Biegler JM, Nelson-DeGrave VL, Legro RS, Strauss JF,3rd, McAllister JM. Cholesterol side-chain cleavage gene expression in theca cells: augmented transcriptional regulation and mRNA stability in polycystic ovary syndrome. *PLoS One* 2012;7:e48963.
73. Maciel GA, Baracat EC, Benda JA, Markham SM, Hensinger K, Chang RJ, *et al.* Stockpiling of transitional and classic primary follicles in ovaries of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5321-7.
74. Graupp M, Wehr E, Schweighofer N, Pieber TR, Obermayer-Pietsch B. Association of genetic variants in the two isoforms of 5alpha-reductase, SRD5A1 and SRD5A2, in lean patients with polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011;157:175-9.
75. Jakimiuk AJ, Weitsman SR, Magoffin DA. 5alpha-Reductase Activity in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2414-8.
76. Drummond AE. The role of steroids in follicular growth. *Reprod Biol Endocrinol* 2006;4:16.

77. Agarwal SK, Judd HL, Magoffin DA. A mechanism for the suppression of estrogen production in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3686-91.
78. Kayampilly PP, Menon KM. AMPK activation by dihydrotestosterone reduces FSH-stimulated cell proliferation in rat granulosa cells by inhibiting ERK signaling pathway. *Endocrinology* 2012;153:2831-8.
79. McNatty KP, Smith DM, Makris A, Osathanondh R, Ryan KJ. The microenvironment of the human antral follicle: interrelationships among the steroid levels in antral fluid, the population of granulosa cells, and the status of the oocyte in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1979;49:851-60.
80. Almahbobi G, Anderiesz C, Hutchinson P, McFarlane JR, Wood C, Trounson AO. Functional integrity of granulosa cells from polycystic ovaries. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996;44:571-80.
81. Okohue JE, Onuh SO, Ikimalo JI. Comparison of IVF/ICSI outcome in patients with polycystic ovarian syndrome or tubal factor infertility. *Niger J Clin Pract* 2013;16:207-10.
82. Palomba S, Falbo A, La Sala GB. Effects of metformin in women with polycystic ovary syndrome treated with gonadotrophins for in vitro fertilisation and intracytoplasmic sperm injection cycles: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BJOG* 2013;120:267-76.
83. Coffler MS, Patel K, Dahan MH, Malcom PJ, Kawashima T, Deutsch R, *et al.* Evidence for abnormal granulosa cell responsiveness to follicle-stimulating hormone in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1742-7.
84. Willis DS, Watson H, Mason HD, Galea R, Brincat M, Franks S. Premature response to luteinizing hormone of granulosa cells from anovulatory women with polycystic ovary syndrome: relevance to mechanism of anovulation. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3984-91.

85. Jakimiuk AJ, Weitsman SR, Navab A, Magoffin DA. Luteinizing hormone receptor, steroidogenesis acute regulatory protein, and steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acids are overexpressed in thecal and granulosa cells from polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1318-23.
86. Franks S, Mason H, Willis D. Follicular dynamics in the polycystic ovary syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 2000;163:49-52.
87. Robinson S, Kiddy D, Gelding SV, Willis D, Niththyananthan R, Bush A, *et al.* The relationship of insulin insensitivity to menstrual pattern in women with hyperandrogenism and polycystic ovaries. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1993;39:351-5.
88. van Houten EL, Themmen AP, Visser JA. Anti-Mullerian hormone (AMH): regulator and marker of ovarian function. *Ann Endocrinol (Paris)* 2010;71:191-7.
89. Broekmans FJ, Visser JA, Laven JS, Broer SL, Themmen AP, Fauser BC. Anti-Mullerian hormone and ovarian dysfunction. *Trends Endocrinol Metab* 2008;19:340-7.
90. Fallat ME, Siow Y, Marra M, Cook C, Carrillo A. Mullerian-inhibiting substance in follicular fluid and serum: a comparison of patients with tubal factor infertility, polycystic ovary syndrome, and endometriosis. *Fertil Steril* 1997;67:962-5.
91. Visser JA, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2005;234:81-6.
92. Nardo LG, Yates AP, Roberts SA, Pemberton P, Laing I. The relationships between AMH, androgens, insulin resistance and basal ovarian follicular status in non-obese subfertile women with and without polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2009;24:2917-23.
93. Sahmay S, Aydin Y, Atakul N, Aydogan B, Kaleli S. Relation of antimullerian hormone with the clinical signs of hyperandrogenism and polycystic ovary morphology. *Gynecol Endocrinol* 2014;30:130-4.

94. Piltonen T, Morin-Papunen L, Koivunen R, Perheentupa A, Ruukonen A, Tapanainen JS. Serum anti-Mullerian hormone levels remain high until late reproductive age and decrease during metformin therapy in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2005;20:1820-6.
95. Dabkowska-Huc A, Lemm M, Sikora J, Witek A, Skalba P. Anti-Mullerian hormone dynamics during ovulation induction treatment with recombinant follicle-stimulating hormone in women with polycystic ovary syndrome. *Endokrynol Pol* 2013;64:203-7.
96. Amer SA, Mahran A, Abdelmaged A, El-Adawy AR, Eissa MK, Shaw RW. The influence of circulating anti-Mullerian hormone on ovarian responsiveness to ovulation induction with gonadotrophins in women with polycystic ovarian syndrome: a pilot study. *Reprod Biol Endocrinol* 2013;11:115,7827-11-115.
97. Kumar A, Woods KS, Bartolucci AA, Azziz R. Prevalence of adrenal androgen excess in patients with the polycystic ovary syndrome (PCOS). *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;62:644-9.
98. Moran C, Azziz R. The role of the adrenal cortex in polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2001;28:63-75.
99. Rosenfield RL. Ovarian and adrenal function in polycystic ovary syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1999;28:265-93.
100. Gennarelli G, Holte J, Stridsberg M, Lundqvist U, Massobrio M, Backstrom T, *et al.* Response of the pituitary-adrenal axis to hypoglycemic stress in women with the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:76-81.
101. Gonzalez F, Chang L, Horab T, Stanczyk FZ, Crickard K, Lobo RA. Adrenal dynamic responses to physiologic and pharmacologic adrenocorticotrophic hormone stimulation before and after ovarian steroid modulation in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 1999;71:439-44.

102. Azziz R, Owerbach D. Molecular abnormalities of the 21-hydroxylase gene in hyperandrogenic women with an exaggerated 17-hydroxyprogesterone response to short-term adrenal stimulation. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:914-8.
103. Moran C, Reyna R, Boots LS, Azziz R. Adrenocortical hyperresponsiveness to corticotropin in polycystic ovary syndrome patients with adrenal androgen excess. *Fertil Steril* 2004;81:126-31.
104. Azziz R, Gay FL, Potter SR, Bradley E, Jr, Boots LR. The effects of prolonged hypertestosteronemia on adrenocortical biosynthesis in oophorectomized women. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72:1025-30.
105. Legro RS, Kunesman AR, Dodson WC, Dunaif A. 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* 1999;84:165-9.
106. Conn JJ, Jacobs HS, Conway GS. The prevalence of polycystic ovaries in women with type 2 diabetes mellitus. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2000;52:81-6.
107. Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, Dobrjansky A. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 1989;38:1165-74.
108. Ciaraldi TP, el-Roiey A, Madar Z, Reichart D, Olefsky JM, Yen SS. Cellular mechanisms of insulin resistance in polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:577-583.
109. Ciaraldi TP, Morales AJ, Hickman MG, Odom-Ford R, Olefsky JM, Yen SS. Cellular insulin resistance in adipocytes from obese polycystic ovary syndrome subjects involves adenosine modulation of insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1421-5.

110. Dunaif A, Segal KR, Shelley DR, Green G, Dobrjansky A, Licholai T. Evidence for distinctive and intrinsic defects in insulin action in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 1992;41:1257-66.
111. 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;96:801-10.
112. Dunaif A, Wu X, Lee A, Diamanti-Kandarakis E. Defects in insulin receptor signaling in vivo in the polycystic ovary syndrome (PCOS). *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;281:E392-9.
113. Nada SE, Thompson RC, Padmanabhan V. Developmental programming: differential effects of prenatal testosterone excess on insulin target tissues. *Endocrinology* 2010;151:5165-73.
114. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* 1997;18:774-800.
115. De Fea K, Roth RA. Protein kinase C modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation requires serine 612. *Biochemistry* 1997;36:12939-12947
116. White MF. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Recent Prog Horm Res* 1998;53:119-38.
117. Maddux BA, Sbraccia P, Kumakura S, Sasson S, Youngren J, Fisher A, *et al.* Membrane glycoprotein PC-1 and insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 1995;373:448-51.
118. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- $\alpha$ - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996;271:665-8.

119. Flier JS, Minaker KL, Landsberg L, Young JB, Pallotta J, Rowe JW. Impaired in vivo insulin clearance in patients with severe target-cell resistance to insulin. *Diabetes* 1982;31:132-5.
120. Bergh C, Carlsson B, Olsson JH, Selleskog U, Hillensjo T. Regulation of androgen production in cultured human thecal cells by insulin-like growth factor I and insulin. *Fertil Steril* 1993;59:323-31.
121. Zhang G, Garmey JC, Veldhuis JD. Interactive stimulation by luteinizing hormone and insulin of the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein and 17alpha-hydroxylase/17,20-lyase (CYP17) genes in porcine theca cells. *Endocrinology* 2000;141:2735-42.
122. Willis D, Franks S. Insulin action in human granulosa cells from normal and polycystic ovaries is mediated by the insulin receptor and not the type-I insulin-like growth factor receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3788-90.
123. Munir I, Yen HW, Geller DH, Torbati D, Bierden RM, Weitsman SR, *et al.* Insulin augmentation of 17alpha-hydroxylase activity is mediated by phosphatidyl inositol 3-kinase but not extracellular signal-regulated kinase-1/2 in human ovarian theca cells. *Endocrinology* 2004;145:175-83.
124. 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;83:2001-2005.
125. Duleba AJ, Spaczynski RZ, Olive DL. Insulin and insulin-like growth factor I stimulate the proliferation of human ovarian theca-interstitial cells. *Fertil Steril* 1998;69:335-340

126. Spaczynski RZ, Tilly JL, Mansour A, Duleba AJ. Insulin and insulin-like growth factors inhibit and luteinizing hormone augments ovarian theca-interstitial cell apoptosis. *Mol Hum Reprod* 2005;11:319-324
127. Devoto L, Christenson LK, McAllister JM, Makrigiannakis A, Strauss JF,3rd. Insulin and insulin-like growth factor-I and -II modulate human granulosa-lutein cell steroidogenesis: enhancement of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) expression. *Mol Hum Reprod* 1999;5:1003-10.
128. Magoffin DA, Kurtz KM, Erickson GF. Insulin-like growth factor-I selectively stimulates cholesterol side-chain cleavage expression in ovarian theca-interstitial cells. *Mol Endocrinol* 1990;4:489-96.
129. Magoffin DA, Weitsman SR. Insulin-like growth factor-I stimulates the expression of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase messenger ribonucleic acid in ovarian theca-interstitial cells. *Biol Reprod* 1993;48:1166-1173.
130. Li X, Peegel H, Menon KM. Regulation of high density lipoprotein receptor messenger ribonucleic acid expression and cholesterol transport in theca-interstitial cells by insulin and human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 2001;142:174-81.
131. Poretsky L, Smith D, Seibel M, Pazianos A, Moses AC, Flier JS. Specific insulin binding sites in human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;59:809-11.
132. Kayampilly PP, Wanamaker BL, Stewart JA, Wagner CL, Menon KM. Stimulatory effect of insulin on 5alpha-reductase type 1 (SRD5A1) expression through an Akt-dependent pathway in ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 2010;151:5030-7.
133. Plymate SR, Matej LA, Jones RE, Friedl KE. Inhibition of sex hormone-binding globulin production in the human hepatoma (Hep G2) cell line by insulin and prolactin. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67:460-4.
134. Nestler JE. Sex hormone-binding globulin: a marker for hyperinsulinemia and/or insulin resistance? *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:273-4.

135. LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT, Jr. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor-I receptor. *Endocr Rev* 1995;16:143-163
136. De Leo V, La Marca A, Orvieto R, Morgante G. Effect of metformin on insulin-like growth factor (IGF) I and IGF-binding protein I in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1598-600.
137. Adashi EY. Intraovarian regulation: the proposed role of insulin-like growth factors. *Ann N Y Acad Sci* 1993;687:10-2.
138. Salvi R, Castillo E, Voirol MJ, Glauser M, Rey JP, Gaillard RC, *et al.* Gonadotropin-releasing hormone-expressing neurons immortalized conditionally are activated by insulin: implication of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* 2006;147:816-26.
139. Adashi EY, Hsueh AJ, Yen SS. Insulin enhancement of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release by cultured pituitary cells. *Endocrinology* 1981;108:1441-9.
140. Eagleson CA, Bellows AB, Hu K, Gingrich MB, Marshall JC. Obese patients with polycystic ovary syndrome: evidence that metformin does not restore sensitivity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator to inhibition by ovarian steroids. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5158-62.
141. Ill CR, Lepine J, Gospodarowicz D. Permissive effect of insulin on the adenosine 3',5'-monophosphate-dependent up-regulation of low density lipoprotein receptors and the stimulation of steroid release in bovine adrenal cortical cells. *Endocrinology* 1984;114:767-75.
142. Klein NA, Andersen RN, Casson PR, Buster JE, Kramer RE. Mechanisms of insulin inhibition of ACTH-stimulated steroid secretion by cultured bovine adrenocortical cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992;41:11-20.

143. Farah-Eways L, Reyna R, Knochenhauer ES, Bartolucci AA, Azziz R. Glucose action and adrenocortical biosynthesis in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004;81:120-5.
144. Hines GA, Smith ER, Azziz R. Influence of insulin and testosterone on adrenocortical steroidogenesis in vitro: preliminary studies. *Fertil Steril* 2001;76:730-5.
145. Martikainen H, Salmela P, Nuojua-Huttunen S, Perala J, Leinonen S, Knip M, *et al.* Adrenal steroidogenesis is related to insulin in hyperandrogenic women. *Fertil Steril* 1996;66:564-70.
146. Arslanian SA, Lewy V, Danadian K, Saad R. Metformin therapy in obese adolescents with polycystic ovary syndrome and impaired glucose tolerance: amelioration of exaggerated adrenal response to adrenocorticotropin with reduction of insulinemia/insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1555-9.
147. Azziz R, Ehrmann DA, Legro RS, Fereshetian AG, O'Keefe M, Ghazzi MN, *et al.* Troglitazone decreases adrenal androgen levels in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2003;79:932-7.
148. Guido M, Romualdi D, Suriano R, Giuliani M, Costantini B, Apa R, *et al.* Effect of pioglitazone treatment on the adrenal androgen response to corticotrophin in obese patients with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2004;19:534-9.
149. Nestler JE, Clore JN, Strauss JF, 3<sup>rd</sup>, Blackard WG. The effects of hyperinsulinemia on serum testosterone, progesterone, dehydroepiandrosterone sulfate, and cortisol levels in normal women and in a woman with hyperandrogenism, insulin resistance, and acanthosis nigricans. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;64:180-184.
150. Diamond MP, Grainger DA, Laudano AJ, Starick-Zych K, DeFronzo RA. Effect of acute physiological elevations of insulin on circulating androgen levels in nonobese women. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72:883-7.

151. Hubert GD, Schriock ED, Givens JR, Buster JE. Suppression of circulating delta 4-androstenedione and dehydroepiandrosterone sulfate during oral glucose tolerance test in normal females. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:781-4.
152. Balen AH, Conway GS, Kaltsas G, Techatrasak K, Manning PJ, West C, *et al.* Polycystic ovary syndrome: the spectrum of the disorder in 1741 patients. *Hum Reprod* 1995;10:2107-11.
153. Cano F, Garcia-Velasco JA, Millet A, Remohi J, Simon C, Pellicer A. Oocyte quality in polycystic ovaries revisited: identification of a particular subgroup of women. *J Assist Reprod Genet* 1997;14:254-61.
154. Tian L, Shen H, Lu Q, Norman RJ, Wang J. Insulin resistance increases the risk of spontaneous abortion after assisted reproduction technology treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1430-3.
155. Lopes IM, Baracat MC, Simoes Mde J, Simoes RS, Baracat EC, Soares Jr JM. Endometrium in women with polycystic ovary syndrome during the window of implantation. *Rev Assoc Med Bras* 2011;57:702-9.
156. Kiddy DS, Sharp PS, White DM, Scanlon MF, Mason HD, Bray CS, *et al.* Differences in clinical and endocrine features between obese and non-obese subjects with polycystic ovary syndrome: an analysis of 263 consecutive cases. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1990;32:213-20.
157. Gambineri A, Pelusi C, Vicennati V, Pagotto U, Pasquali R. Obesity and the polycystic ovary syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26:883-96.
158. Dahlgren E, Janson PO, Johansson S, Lapidus L, Oden A. Polycystic ovary syndrome and risk for myocardial infarction. Evaluated from a risk factor model based on a prospective population study of women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1992;71:599-604.
159. Cibula D, Cifkova R, Fanta M, Poledne R, Zivny J, Skibova J. Increased risk of non-insulin dependent diabetes mellitus, arterial hypertension and coronary artery disease in

perimenopausal women with a history of the polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2000;15:785-9.

160. Legro RS, Kunselman AR, Dunaif A. Prevalence and predictors of dyslipidemia in women with polycystic ovary syndrome. *Am J Med* 2001;111:607-13.

161. Barry JA, Kuczmierczyk AR, Hardiman PJ. Anxiety and depression in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2011;26:2442-51.

162. Jakimiuk AJ, Issat T. PCOS and cancer risk. *Folia Histochem Cytobiol* 2009;47:S101-5.

163. Ferriman D, Gallwey JD. Clinical assessment of body hair growth in women. *J Clin Endocrinol Metab* 1961;21:1440-7.

164. Hatch R, Rosenfield RL, Kim MH, Tredway D. Hirsutism: implications, etiology, and management. *Am J Obstet Gynecol* 1981;140:815-30.

165. Flier JS, Eastman RC, Minaker KL, Matteson D, Rowe JW. Acanthosis nigricans in obese women with hyperandrogenism. Characterization of an insulin-resistant state distinct from the type A and B syndromes. *Diabetes* 1985;34:101-107.

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

167. Hahn S, Kuehnel W, Tan S, Kramer K, Schmidt M, Roesler S, *et al.* Diagnostic value of calculated testosterone indices in the assessment of polycystic ovary syndrome. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:202-7.

168. Derksen J, Nagesser SK, Meinders AE, Haak HR, van de Velde CJ. Identification of virilizing adrenal tumors in hirsute women. *N Engl J Med* 1994;331:968-73.

169. Azziz R, Dewailly D, Owerbach D. Clinical review 56: Nonclassic adrenal hyperplasia: current concepts. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:810-5.

170. Fauser BC, Pache TD, Hop WC, de Jong FH, Dahl KD. The significance of a single serum LH measurement in women with cycle disturbances: discrepancies between immunoreactive and bioactive hormone estimates. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1992;37:445-52.
171. Escobar-Morreale HF. Macroprolactinemia in women presenting with hyperandrogenic symptoms: Implications for the management of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004;82:1697-9.
172. Corenblum B, Taylor PJ. The hyperprolactinemic polycystic ovary syndrome may not be an distinct entity. *Fertil Steril* 1982;38:549-52.
173. Balen AH, Laven JS, Tan SL, Dewailly D. Ultrasound assessment of the polycystic ovary: international consensus definitions. *Hum Reprod Update* 2003;9:505-14.
174. Dunaif A, Graf M, Mandeli J, Laumas V, Dobrjansky A. Characterization of groups of hyperandrogenic women with acanthosis nigricans, impaired glucose tolerance, and/or hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;65:499-507.
175. Bhattacharya SM. Polycystic ovary syndrome and abnormalities in glucose tolerance. *Int J Gynaecol Obstet* 2009;105:29-31.
176. Salley KE, Wickham EP, Cheang KI, Essah PA, Karjane NW, Nestler JE. Glucose intolerance in polycystic ovary syndrome--a position statement of the Androgen Excess Society. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:4546-56.
177. Wild RA, Carmina E, Diamanti-Kandarakis E, Dokras A, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, *et al.* Assessment of cardiovascular risk and prevention of cardiovascular disease in women with the polycystic ovary syndrome: a consensus statement by the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome (AE-PCOS) Society. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:2038-49.
178. Coulam CB, Annegers JF, Kranz JS. Chronic anovulation syndrome and associated neoplasia. *Obstet Gynecol* 1983;61:403-7.

179. Badawy A, Elnashar A. Treatment options for polycystic ovary syndrome. *Int J Womens Health* 2011;3:25-35.
180. ACOG Committee on Practice Bulletins--Gynecology. ACOG Practice Bulletin No. 108: Polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol* 2009;114:936-49.
181. Diamanti-Kandarakis E, Baillargeon JP, Iuorno MJ, Jakubowicz DJ, Nestler JE. A modern medical quandary: polycystic ovary syndrome, insulin resistance, and oral contraceptive pills. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1927-32.
182. Kiddy DS, Hamilton-Fairley D, Bush A, Short F, Anyaoku V, Reed MJ, *et al.* Improvement in endocrine and ovarian function during dietary treatment of obese women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1992;36:105-11.
183. Pasquali R, Gambineri A, Biscotti D, Vicennati V, Gagliardi L, Colitta D, *et al.* Effect of long-term treatment with metformin added to hypocaloric diet on body composition, fat distribution, and androgen and insulin levels in abdominally obese women with and without the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2767-74.
184. Azziz R, Ehrmann D, Legro RS, Whitcomb RW, Hanley R, Fereshetian AG, *et al.* Troglitazone improves ovulation and hirsutism in the polycystic ovary syndrome: a multicenter, double blind, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1626-32.
185. Pasquali R, Pelusi C, Genghini S, Cacciari M, Gambineri A. Obesity and reproductive disorders in women. *Hum Reprod Update* 2003;9:359-72.
186. Froen JF, Arnestad M, Frey K, Vege A, Saugstad OD, Stray-Pedersen B. Risk factors for sudden intrauterine unexplained death: epidemiologic characteristics of singleton cases in Oslo, Norway, 1986-1995. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:694-702.

187. Boomsma CM, Eijkemans MJ, Hughes EG, Visser GH, Fauser BC, Macklon NS. A meta-analysis of pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update* 2006;12:673-83.
188. Moran LJ, Noakes M, Clifton PM, Tomlinson L, Galletly C, Norman RJ. Dietary composition in restoring reproductive and metabolic physiology in overweight women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:812-9.
189. Yanovski SZ, Yanovski JA. Obesity. *N Engl J Med* 2002;346:591-602.
190. Imani B, Eijkemans MJ, te Velde ER, Habbema JD, Fauser BC. A nomogram to predict the probability of live birth after clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotropic oligoamenorrhoeic infertility. *Fertil Steril* 2002;77:91-7.
191. Dickey RP, Taylor SN, Curole DN, Rye PH, Pyrzak R. Incidence of spontaneous abortion in clomiphene pregnancies. *Hum Reprod* 1996;11:2623-8.
192. Legro RS, Barnhart HX, Schlaff WD, Carr BR, Diamond MP, Carson SA, *et al.* Clomiphene, metformin, or both for infertility in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 2007;356:551-66.
193. Homburg R. Clomiphene citrate--end of an era? A mini-review. *Hum Reprod* 2005;20:2043-51.
194. Hammond MG, Halme JK, Talbert LM. Factors affecting the pregnancy rate in clomiphene citrate induction of ovulation. *Obstet Gynecol* 1983;62:196-202.
195. Kousta E, White DM, Franks S. Modern use of clomiphene citrate in induction of ovulation. *Hum Reprod Update* 1997;3:359-65.
196. Wang CF, Gemzell C. The use of human gonadotropins for the induction of ovulation in women with polycystic ovarian disease. *Fertil Steril* 1980;33:479-86.

197. Balasch J, Fabregues F, Creus M, Casamitjana R, Puerto B, Vanrell JA. Recombinant human follicle-stimulating hormone for ovulation induction in polycystic ovary syndrome: a prospective, randomized trial of two starting doses in a chronic low-dose step-up protocol. *J Assist Reprod Genet* 2000;17:561-5.
198. Seibel MM, Kamrava MM, McArdle C, Taymor ML. Treatment of polycystic ovary disease with chronic low-dose follicle stimulating hormone: biochemical changes and ultrasound correlation. *Int J Fertil* 1984;29:39-43.
199. Schoot DC, Pache TD, Hop WC, de Jong FH, Fauser BC. Growth patterns of ovarian follicles during induction of ovulation with decreasing doses of human menopausal gonadotropin following presumed selection in polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 1992;57:1117-20.
200. van Santbrink EJ, Fauser BC. Urinary follicle-stimulating hormone for normogonadotropic clomiphene-resistant anovulatory infertility: prospective, randomized comparison between low dose step-up and step-down dose regimens. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3597-602.
201. Christin-Maitre S, Hugues JN, Recombinant FSH Study Group. A comparative randomized multicentric study comparing the step-up versus step-down protocol in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2003;18:1626-31.
202. Homburg R, Howles CM. Low-dose FSH therapy for anovulatory infertility associated with polycystic ovary syndrome: rationale, results, reflections and refinements. *Hum Reprod Update* 1999;5:493-9.
203. Gjonnaess H. Polycystic ovarian syndrome treated by ovarian electrocautery through the laparoscope. *Fertil Steril* 1984;41:20-5.
204. Farquhar CM, Williamson K, Gudex G, Johnson NP, Garland J, Sadler L. A randomized controlled trial of laparoscopic ovarian diathermy versus gonadotropin

therapy for women with clomiphene citrate-resistant polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2002;78:404-11.

205. Bayram N, van Wely M, Kaaijk EM, Bossuyt PM, van der Veen F. Using an electrocautery strategy or recombinant follicle stimulating hormone to induce ovulation in polycystic ovary syndrome: randomised controlled trial. *BMJ* 2004;328:192.

206. Kaya H, Sezik M, Ozkaya O. Evaluation of a new surgical approach for the treatment of clomiphene citrate-resistant infertility in polycystic ovary syndrome: laparoscopic ovarian multi-needle intervention. *J Minim Invasive Gynecol* 2005;12:355-8.

207. Dor J, Shulman A, Levran D, Ben-Rafael Z, Rudak E, Mashiach S. The treatment of patients with polycystic ovarian syndrome by in-vitro fertilization and embryo transfer: a comparison of results with those of patients with tubal infertility. *Hum Reprod* 1990;5:816-8.

208. Urman B, Fluker MR, Yuen BH, Fleige-Zahradka BG, Zouves CG, Moon YS. The outcome of in vitro fertilization and embryo transfer in women with polycystic ovary syndrome failing to conceive after ovulation induction with exogenous gonadotropins. *Fertil Steril* 1992;57:1269-73.

209. Griesinger G, Diedrich K, Tarlatzis BC, Kolibianakis EM. GnRH-antagonists in ovarian stimulation for IVF in patients with poor response to gonadotrophins, polycystic ovary syndrome, and risk of ovarian hyperstimulation: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2006;13:628-38.

210. Xiao J, Chen S, Zhang C, Chang S. Effectiveness of GnRH antagonist in the treatment of patients with polycystic ovary syndrome undergoing IVF: a systematic review and meta analysis. *Gynecol Endocrinol* 2013;29:187-91.

211. Lainas TG, Sfontouris IA, Zorzovilis IZ, Petsas GK, Lainas GT, Alexopoulou E, *et al.* Flexible GnRH antagonist protocol versus GnRH agonist long protocol in patients

with polycystic ovary syndrome treated for IVF: a prospective randomised controlled trial (RCT). *Hum Reprod* 2010;25:683-9.

212. Heijnen EM, Eijkemans MJ, Hughes EG, Laven JS, Macklon NS, Fauser BC. A meta-analysis of outcomes of conventional IVF in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update* 2006;12:13-21.

213. Tang T, Glanville J, Orsi N, Barth JH, Balen AH. The use of metformin for women with PCOS undergoing IVF treatment. *Hum Reprod* 2006;21:1416-25.

214. Siristatidis CS, Maheshwari A, Bhattacharya S. In vitro maturation in sub fertile women with polycystic ovarian syndrome undergoing assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev* 2009;(1):CD006606. doi:CD006606.

215. Velazquez E, Acosta A, Mendoza SG. Menstrual cyclicality after metformin therapy in polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol* 1997;90:392-5.

216. Mamputu JC, Wiernsperger NF, Renier G. Antiatherogenic properties of metformin: the experimental evidence. *Diabetes Metab* 2003;29:6S71-6.

217. Thessaloniki ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Consensus on infertility treatment related to polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2008;23:462-77.

218. Tang T, Glanville J, Hayden CJ, White D, Barth JH, Balen AH. Combined lifestyle modification and metformin in obese patients with polycystic ovary syndrome. A randomized, placebo-controlled, double-blind multicentre study. *Hum Reprod* 2006;21:80-9.

219. Tang T, Lord JM, Norman RJ, Yasmin E, Balen AH. Insulin-sensitising drugs (metformin, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for women with polycystic ovary syndrome, oligo amenorrhoea and subfertility. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;5:CD003053.

220. Costantino D, Minozzi G, Minozzi E, Guaraldi C. Metabolic and hormonal effects of myo-inositol in women with polycystic ovary syndrome: a double-blind trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2009;13:105-10.
221. Unfer V, Carlomagno G, Dante G, Facchinetti F. Effects of myo-inositol in women with PCOS: a systematic review of randomized controlled trials. *Gynecol Endocrinol* 2012;28:509-15.
222. Morgante G, Orvieto R, Di Sabatino A, Musacchio MC, De Leo V. The role of inositol supplementation in patients with polycystic ovary syndrome, with insulin resistance, undergoing the low-dose gonadotropin ovulation induction regimen. *Fertil Steril* 2011;95:2642-4.
223. Papaleo E, Unfer V, Baillargeon JP, Fusi F, Occhi F, De Santis L. Myo-inositol may improve oocyte quality in intracytoplasmic sperm injection cycles. A prospective, controlled, randomized trial. *Fertil Steril* 2009;91:1750-4.
224. Tugrul S, Kutlu T, Pekin O, Baglam E, Kiyak H, Oral O. Clinical, endocrine, and metabolic effects of acarbose, a alpha-glucosidase inhibitor, in overweight and nonoverweight patients with polycystic ovarian syndrome. *Fertil Steril* 2008;90:1144-8.
225. Hanjalic-Beck A, Gabriel B, Schaefer W, Zahradnik HP, Schories M, Tempfer C, *et al.* Metformin versus acarbose therapy in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS): a prospective randomised double-blind study. *Gynecol Endocrinol* 2010;26:690-7.
226. Armitage J. The safety of statins in clinical practice. *Lancet* 2007;370:1781-90.
227. Dostal LA, Schardein JL, Anderson JA. Developmental toxicity of the HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, in rats and rabbits. *Teratology* 1994;50:387-94.
228. Rajpathak SN, Kumbhani DJ, Crandall J, Barzilai N, Alderman M, Ridker PM. Statin therapy and risk of developing type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care* 2009;32:1924-9.

229. Hadziomerovic-Pekic D, Wildt L, Weiss JM, Moeller K, Mattle V, Seeber BE. Metformin, naltrexone, or the combination of prednisolone and antiandrogenic oral contraceptives as first-line therapy in hyperinsulinemic women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2010;94:2385-8.
230. Jayagopal V, Kilpatrick ES, Holding S, Jennings PE, Atkin SL. Orlistat is as beneficial as metformin in the treatment of polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:729-33.
231. Wehr E, Pieber TR, Obermayer-Pietsch B. Effect of vitamin D3 treatment on glucose metabolism and menstrual frequency in polycystic ovary syndrome women: a pilot study. *J Endocrinol Invest* 2011;34:757-63.
232. Gutierrez-Perez A, Cortes-Rojo C, Noriega-Cisneros R, Calderon-Cortes E, Manzo-Avalos S, Clemente-Guerrero M, *et al.* Protective effects of resveratrol on calcium-induced oxidative stress in rat heart mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 2011;43:101-7.
233. Nambiar D, Rajamani P, Singh RP. Effects of phytochemicals on ionization radiation-mediated carcinogenesis and cancer therapy. *Mutat Res* 2011;728:139-57.
234. Xuzhu G, Komai-Koma M, Leung BP, Howe HS, McSharry C, McInnes IB, *et al.* Resveratrol modulates murine collagen-induced arthritis by inhibiting Th17 and B-cell function. *Ann Rheum Dis* 2012;71:129-35.
235. Wong DH, Villanueva JA, Cress AB, Duleba AJ. Effects of resveratrol on proliferation and apoptosis in rat ovarian theca-interstitial cells. *Mol Hum Reprod* 2010;16:251-9.
236. Fabre KM, Saito K, DeGraff W, Sowers AL, Thetford A, Cook JA, *et al.* The effects of resveratrol and selected metabolites on the radiation and antioxidant response. *Cancer Biol Ther* 2011;12:915-23.

237. Vastano BC, Chen Y, Zhu N, Ho CT, Zhou Z, Rosen RT. Isolation and identification of stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum*. *J Agric Food Chem* 2000;48:253-6.
238. Lee SK, Mbwambo ZH, Chung H, Luyengi L, Gamez EJ, Mehta RG, *et al.* Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Comb Chem High Throughput Screen* 1998;1:35-46.
239. Celotti E, Ferrarini R, Zironi R, Conte LS. Resveratrol content of some wines obtained from dried Valpolicella grapes: Recioto and Amarone. *J Chromatogr A* 1996;730:47-52.
240. Cantos E, Garcia-Viguera C, de Pascual-Teresa S, Tomas-Barberan FA. Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. *J Agric Food Chem* 2000;48:4606-12.
241. Bavaresco L. Role of viticultural factors on stilbene concentrations of grapes and wine. *Drugs Exp Clin Res* 2003;29:181-7.
242. Francioso A, Mastromarino P, Masci A, d'Erme M, Mosca L. Chemistry, Stability and Bioavailability of Resveratrol. *Med Chem* 2013.
243. Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Jr, Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos* 2004;32:1377-82.
244. Poulsen MM, Vestergaard PF, Clasen BF, Radko Y, Christensen LP, Stodkilde-Jorgensen H, *et al.* High-dose resveratrol supplementation in obese men: an investigator-initiated, randomized, placebo-controlled clinical trial of substrate metabolism, insulin sensitivity, and body composition. *Diabetes* 2013;62:1186-95.
245. Yoshino J, Conte C, Fontana L, Mittendorfer B, Imai S, Schechtman KB, *et al.* Resveratrol supplementation does not improve metabolic function in nonobese women with normal glucose tolerance. *Cell Metab* 2012;16:658-64.

246. Almeida L, Vaz-da-Silva M, Falcao A, Soares E, Costa R, Loureiro AI, *et al.* Pharmacokinetic and safety profile of trans-resveratrol in a rising multiple-dose study in healthy volunteers. *Mol Nutr Food Res* 2009;53 Suppl 1:S7-15.
247. Juan ME, Maijo M, Planas JM. Quantification of trans-resveratrol and its metabolites in rat plasma and tissues by HPLC. *J Pharm Biomed Anal* 2010;51:391-8.
248. Sale S, Verschoyle RD, Boocock D, Jones DJ, Wilsher N, Ruparelia KC, *et al.* Pharmacokinetics in mice and growth-inhibitory properties of the putative cancer chemopreventive agent resveratrol and the synthetic analogue trans 3,4,5,4'-tetramethoxystilbene. *Br J Cancer* 2004;90:736-44.
249. Patel KR, Brown VA, Jones DJ, Britton RG, Hemingway D, Miller AS, *et al.* Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. *Cancer Res* 2010;70:7392-9.
250. Vitaglione P, Sforza S, Galaverna G, Ghidini C, Caporaso N, Vescovi PP, *et al.* Bioavailability of trans-resveratrol from red wine in humans. *Mol Nutr Food Res* 2005;49:495-504.
251. Boocock DJ, Faust GE, Patel KR, Schinas AM, Brown VA, Ducharme MP, *et al.* Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:1246-52.
252. Howells LM, Berry DP, Elliott PJ, Jacobson EW, Hoffmann E, Hegarty B, *et al.* Phase I randomized, double-blind pilot study of micronized resveratrol (SRT501) in patients with hepatic metastases--safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Cancer Prev Res (Phila)* 2011;4:1419-25.
253. Brown VA, Patel KR, Viskaduraki M, Crowell JA, Perloff M, Booth TD, *et al.* Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent resveratrol in healthy volunteers:

safety, pharmacokinetics, and effect on the insulin-like growth factor axis. *Cancer Res* 2010;70:9003-11.

254. Kaeberlein M, McDonagh T, Heltweg B, Hixon J, Westman EA, Caldwell SD, *et al.* Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol. *J Biol Chem* 2005;280:17038-45.

255. Gottlieb S, Esposito RE. A new role for a yeast transcriptional silencer gene, SIR2, in regulation of recombination in ribosomal DNA. *Cell* 1989;56:771-6.

256. Mills KD, Sinclair DA, Guarente L. MEC1-dependent redistribution of the Sir3 silencing protein from telomeres to DNA double-strand breaks. *Cell* 1999;97:609-20.

257. Aparicio OM, Billington BL, Gottschling DE. Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*. *Cell* 1991;66:1279-87.

258. Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, *et al.* hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 2001;107:149-59.

259. Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, *et al.* Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* 2004;429:771-6.

260. Rogina B, Helfand SL. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:15998-6003.

261. Kaeberlein M, McVey M, Guarente L. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev* 1999;13:2570-80.

262. Armstrong CM, Kaeberlein M, Imai SI, Guarente L. Mutations in *Saccharomyces cerevisiae* gene SIR2 can have differential effects on in vivo silencing phenotypes and in vitro histone deacetylation activity. *Mol Biol Cell* 2002;13:1427-38.

263. Landry J, Sutton A, Tafrov ST, Heller RC, Stebbins J, Pillus L, *et al.* The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:5807-11.
264. Voloshyna I, Hai O, Littlefield MJ, Carsons S, Reiss AB. Resveratrol mediates anti-atherogenic effects on cholesterol flux in human macrophages and endothelium via PPARgamma and adenosine. *Eur J Pharmacol* 2013;698:299-309.
265. Zhang Y, Luo Z, Ma L, Xu Q, Yang Q, Si L. Resveratrol prevents the impairment of advanced glycosylation end products (AGE) on macrophage lipid homeostasis by suppressing the receptor for AGE via peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation. *Int J Mol Med* 2010;25:729-34.
266. Ruderman NB, Xu XJ, Nelson L, Cacicedo JM, Saha AK, Lan F, *et al.* AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;298:E751-60.
267. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2002;2:301-10.
268. Chakraborty JB, Mann DA. NF-kappaB signalling: embracing complexity to achieve translation. *J Hepatol* 2010;52:285-91.
269. Shishodia S, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: a friend or a foe in cancer? *Biochem Pharmacol* 2004;68:1071-80.
270. Holmes-McNary M, Baldwin AS, Jr. Chemopreventive properties of trans-resveratrol are associated with inhibition of activation of the IkappaB kinase. *Cancer Res* 2000;60:3477-83.
271. Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol* 2000;164:6509-19.

272. Bruhn MA, Pearson RB, Hannan RD, Sheppard KE. AKT-independent PI3-K signaling in cancer - emerging role for SGK3. *Cancer Manag Res* 2013;5:281-92.
273. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:489-501.
274. She QB, Huang C, Zhang Y, Dong Z. Involvement of c-jun NH(2)-terminal kinases in resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis. *Mol Carcinog* 2002;33:244-50.
275. Pozo-Guisado E, Lorenzo-Benayas MJ, Fernandez-Salguero PM. Resveratrol modulates the phosphoinositide 3-kinase pathway through an estrogen receptor alpha-dependent mechanism: relevance in cell proliferation. *Int J Cancer* 2004;109:167-73.
276. Korbut R, Moncada S. Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) and thromboxane A<sub>2</sub> interaction in vivo. Regulation by aspirin and relationship with anti-thrombotic therapy. *Thromb Res* 1978;13:489-500.
277. Bunting S, Moncada S, Vane JR. The prostacyclin--thromboxane A<sub>2</sub> balance: pathophysiological and therapeutic implications. *Br Med Bull* 1983;39:271-6.
278. Johnson JL, Maddipati KR. Paradoxical effects of resveratrol on the two prostaglandin H synthases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 1998;56:131-43.
279. Orallo F, Alvarez E, Camina M, Leiro JM, Gomez E, Fernandez P. The possible implication of trans-Resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Mol Pharmacol* 2002;61:294-302.
280. Das S, Alagappan VK, Bagchi D, Sharma HS, Maulik N, Das DK. Coordinated induction of iNOS-VEGF-KDR-eNOS after resveratrol consumption: a potential mechanism for resveratrol preconditioning of the heart. *Vascul Pharmacol* 2005;42:281-9.
281. Holvoet P, Kritchevsky SB, Tracy RP, Mertens A, Rubin SM, Butler J, *et al.* The metabolic syndrome, circulating oxidized LDL, and risk of myocardial infarction in well-

functioning elderly people in the health, aging, and body composition cohort. *Diabetes* 2004;53:1068-73.

282. Berrougui H, Grenier G, Loued S, Drouin G, Khalil A. A new insight into resveratrol as an atheroprotective compound: inhibition of lipid peroxidation and enhancement of cholesterol efflux. *Atherosclerosis* 2009;207:420-7.

283. Tome-Carneiro J, Gonzalez M, Larrosa M, Garcia-Almagro FJ, Aviles-Plaza F, Parra S, *et al.* Consumption of a grape extract supplement containing resveratrol decreases oxidized LDL and ApoB in patients undergoing primary prevention of cardiovascular disease: a triple-blind, 6-month follow-up, placebo-controlled, randomized trial. *Mol Nutr Food Res* 2012;56:810-21.

284. Wong DH, Villanueva JA, Cress AB, Sokalska A, Ortega I, Duleba AJ. Resveratrol inhibits the mevalonate pathway and potentiates the antiproliferative effects of simvastatin in rat theca-interstitial cells. *Fertil Steril* 2011;96:1252-8.

285. Houben R, Michel B, Vetter-Kauczok CS, Pfohler C, Laetsch B, Wolter MD, *et al.* Absence of classical MAP kinase pathway signalling in Merkel cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 2006;126:1135-42.

286. Chang F, Steelman LS, Lee JT, Shelton JG, Navolanic PM, Blalock WL, *et al.* Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia* 2003;17:1263-93.

287. Villanueva JA, Sokalska A, Cress AB, Ortega I, Bruner-Tran KL, Osteen KG, *et al.* Resveratrol potentiates effect of simvastatin on inhibition of mevalonate pathway in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:E455-62.

288. Cho IJ, Ahn JY, Kim S, Choi MS, Ha TY. Resveratrol attenuates the expression of HMG-CoA reductase mRNA in hamsters. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;367:190-4.

289. Timmers S, Auwerx J, Schrauwen P. The journey of resveratrol from yeast to human. *Aging (Albany NY)* 2012;4:146-58.
290. Pearson KJ, Baur JA, Lewis KN, Peshkin L, Price NL, Labinskyy N, *et al.* Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metab* 2008;8:157-68.
291. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, *et al.* Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 2003;425:191-6.
292. Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, Helfand SL, Tatar M, *et al.* Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 2004;430:686-9.
293. Shukla Y, Singh R. Resveratrol and cellular mechanisms of cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci* 2011;1215:1-8.
294. Ulasli SS, Celik S, Gunay E, Ozdemir M, Hazman O, Ozyurek A, *et al.* Anticancer effects of thymoquinone, caffeic acid phenethyl ester and resveratrol on A549 non-small cell lung cancer cells exposed to benzo(a)pyrene. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;14:6159-64.
295. Das D, Preet R, Mohapatra P, Satapathy SR, Kundu CN. 1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea enhances the inhibitory effect of Resveratrol on 5-fluorouracil sensitive/resistant colon cancer cells. *World J Gastroenterol* 2013;19:7374-88.
296. Chen FP, Chien MH. Phytoestrogens induce apoptosis through a mitochondria/caspase pathway in human breast cancer cells. *Climacteric* 2013.
297. Wang Z, Li W, Meng X, Jia B. Resveratrol induces gastric cancer cell apoptosis via reactive oxygen species, but independent of sirtuin1. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012;39:227-32.

298. Chen YJ, Chen YY, Lin YF, Hu HY, Liao HF. Resveratrol inhibits alpha-melanocyte-stimulating hormone signaling, viability, and invasiveness in melanoma cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013;2013:632121.
299. Kang HJ, Youn YK, Hong MK, Kim LS. Antiproliferation and redifferentiation in thyroid cancer cell lines by polyphenol phytochemicals. *J Korean Med Sci* 2011;26:893-9.
300. Kim DH, Hossain MA, Kim MY, Kim JA, Yoon JH, Suh HS, *et al.* A novel resveratrol analogue, HS-1793, inhibits hypoxia-induced HIF-1alpha and VEGF expression, and migration in human prostate cancer cells. *Int J Oncol* 2013;43:1915-24.
301. Mo W, Xu X, Xu L, Wang F, Ke A, Wang X, *et al.* Resveratrol inhibits proliferation and induces apoptosis through the hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer cell. *Pancreatology* 2011;11:601-9.
302. Ge J, Liu Y, Li Q, Guo X, Gu L, Ma ZG, *et al.* Resveratrol induces apoptosis and autophagy in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by inhibiting Akt/mTOR and activating p38-MAPK. *Biomed Environ Sci* 2013;26:902-11.
303. Yang H, Zheng Y, Li TW, Peng H, Fernandez-Ramos D, Martinez-Chantar ML, *et al.* Methionine adenosyltransferase 2B, HuR, and sirtuin 1 protein cross-talk impacts on the effect of resveratrol on apoptosis and growth in liver cancer cells. *J Biol Chem* 2013;288:23161-70.
304. Baribeau S, Chaudhry P, Parent S, Asselin E. Resveratrol Inhibits Cisplatin-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Ovarian Cancer Cell Lines. *PLoS One* 2014;9:e86987.
305. Cal C, Garban H, Jazirehi A, Yeh C, Mizutani Y, Bonavida B. Resveratrol and cancer: chemoprevention, apoptosis, and chemo-immunosensitizing activities. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2003;3:77-93.

306. De Maria S, Scognamiglio I, Lombardi A, Amodio N, Caraglia M, Carteni M, *et al.* Polydatin, a natural precursor of resveratrol, induces cell cycle arrest and differentiation of human colorectal Caco-2 cell. *J Transl Med* 2013;11:264,5876-11-264.
307. Scoditti E, Calabriso N, Massaro M, Pellegrino M, Storelli C, Martines G, *et al.* Mediterranean diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: a potentially protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer. *Arch Biochem Biophys* 2012;527:81-9.
308. Liu BL, Zhang X, Zhang W, Zhen HN. New enlightenment of French Paradox: resveratrol's potential for cancer chemoprevention and anti-cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 2007;6:1833-6.
309. Zamora-Ros R, Urpi-Sarda M, Lamuela-Raventos RM, Martinez-Gonzalez MA, Salas-Salvado J, Aros F, *et al.* High urinary levels of resveratrol metabolites are associated with a reduction in the prevalence of cardiovascular risk factors in high-risk patients. *Pharmacol Res* 2012;65:615-20.
310. Bertelli AA, Giovannini L, Giannessi D, Migliori M, Bernini W, Fregoni M, *et al.* Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *Int J Tissue React* 1995;17:1-3.
311. Xuan W, Wu B, Chen C, Chen B, Zhang W, Xu D, *et al.* Resveratrol improves myocardial ischemia and ischemic heart failure in mice by antagonizing the detrimental effects of fractalkine\*. *Crit Care Med* 2012;40:3026-33.
312. Robich MP, Chu LM, Burgess TA, Feng J, Han Y, Nezafat R, *et al.* Resveratrol preserves myocardial function and perfusion in remote nonischemic myocardium in a swine model of metabolic syndrome. *J Am Coll Surg* 2012;215:681-9.
313. Chu LM, Robich MP, Lassaletta AD, Feng J, Laham RJ, Burgess T, *et al.* Resveratrol supplementation abrogates pro-arteriogenic effects of intramyocardial

vascular endothelial growth factor in a hypercholesterolemic swine model of chronic ischemia. *Surgery* 2011;150:390-9.

314. Usta E, Mustafi M, Walker T, Ziemer G. Resveratrol suppresses apoptosis in intact human cardiac tissue - in vitro model simulating extracorporeal circulation. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2011;52:399-409.

315. Zhang F, Shi JS, Zhou H, Wilson B, Hong JS, Gao HM. Resveratrol protects dopamine neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity through its anti-inflammatory actions. *Mol Pharmacol* 2010;78:466-77.

316. Saleh MC, Connell BJ, Rajagopal D, Khan BV, Abd-El-Aziz AS, Kucukkaya I, *et al.* Co-administration of resveratrol and lipoic Acid, or their synthetic combination, enhances neuroprotection in a rat model of ischemia/reperfusion. *PLoS One* 2014;9:e87865.

317. Anekonda TS, Reddy PH. Neuronal protection by sirtuins in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2006;96:305-13.

318. Villaflores OB, Chen YJ, Chen CP, Yeh JM, Wu TY. Curcuminoids and resveratrol as anti-Alzheimer agents. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2012;51:515-25.

319. Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:493-506.

320. Chen J, Zhou Y, Mueller-Steiner S, Chen LF, Kwon H, Yi S, *et al.* SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid-beta toxicity through inhibiting NF-kappaB signaling. *J Biol Chem* 2005;280:40364-74.

321. Wang Y, Xu H, Fu Q, Ma R, Xiang J. Resveratrol derived from rhizoma et radix polygoni cuspidati and its liposomal form protect nigral cells of Parkinsonian rats. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2011;36:1060-6.

322. Maher P, Dargusch R, Bodai L, Gerard PE, Purcell JM, Marsh JL. ERK activation by the polyphenols fisetin and resveratrol provides neuroprotection in multiple models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 2011;20:261-70.
323. Askanas V, Marangos PJ, Engel WK. CSF from amyotrophic lateral sclerosis patients applied to motor neurons in culture fails to alter neuron-specific enolase. *Neurology* 1981;31:1196-7.
324. Su HC, Hung LM, Chen JK. Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;290:E1339-46.
325. Palsamy P, Subramanian S. Modulatory effects of resveratrol on attenuating the key enzymes activities of carbohydrate metabolism in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *Chem Biol Interact* 2009;179:356-62.
326. Palsamy P, Subramanian S. Resveratrol, a natural phytoalexin, normalizes hyperglycemia in streptozotocin-nicotinamide induced experimental diabetic rats. *Biomed Pharmacother* 2008;62:598-605.
327. Palsamy P, Subramanian S. Ameliorative potential of resveratrol on proinflammatory cytokines, hyperglycemia mediated oxidative stress, and pancreatic beta-cell dysfunction in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *J Cell Physiol* 2010;224:423-32.
328. Chi TC, Chen WP, Chi TL, Kuo TF, Lee SS, Cheng JT, *et al.* Phosphatidylinositol-3-kinase is involved in the antihyperglycemic effect induced by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* 2007;80:1713-20.
329. Penumathsa SV, Thirunavukkarasu M, Zhan L, Maulik G, Menon VP, Bagchi D, *et al.* Resveratrol enhances GLUT-4 translocation to the caveolar lipid raft fractions through AMPK/Akt/eNOS signalling pathway in diabetic myocardium. *J Cell Mol Med* 2008;12:2350-61.

330. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, *et al.* Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 2006;444:337-42.
331. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, *et al.* Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 2006;127:1109-22.
332. Szkudelski T. Resveratrol inhibits insulin secretion from rat pancreatic islets. *Eur J Pharmacol* 2006;552:176-81.
333. Szkudelska K, Nogowski L, Szkudelski T. Resveratrol, a naturally occurring diphenolic compound, affects lipogenesis, lipolysis and the antilipolytic action of insulin in isolated rat adipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009;113:17-24.
334. Henry LA, Witt DM. Resveratrol: phytoestrogen effects on reproductive physiology and behavior in female rats. *Horm Behav* 2002;41:220-8.
335. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, *et al.* Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 1997;138:863-70.
336. Levenson AS, Gehm BD, Pearce ST, Horiguchi J, Simons LA, Ward JE, 3rd, *et al.* Resveratrol acts as an estrogen receptor (ER) agonist in breast cancer cells stably transfected with ER alpha. *Int J Cancer* 2003;104:587-96.
337. Bowers JL, Tyulmenkov VV, Jernigan SC, Klinge CM. Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 2000;141:3657-67.
338. Henry LA, Witt DM. Effects of neonatal resveratrol exposure on adult male and female reproductive physiology and behavior. *Dev Neurosci* 2006;28:186-95.
339. Benrick A, Maliqueo M, Miao S, Villanueva JA, Feng Y, Ohlsson C, *et al.* Resveratrol is not as effective as physical exercise for improving reproductive and

metabolic functions in rats with dihydrotestosterone-induced polycystic ovary syndrome. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013;2013:964070.

340. Magoffin DA, Erickson GF. Purification of ovarian theca-interstitial cells by density gradient centrifugation. *Endocrinology* 1988;122:2345-7.

341. Schreiber JR, Nakamura K, Erickson GF. Progestins inhibit FSH-stimulated steroidogenesis in cultured rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 1980;19:165-73.

342. Wang C, Hsueh AJ, Erickson GF. LH stimulation of estrogen secretion by cultured rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 1981;24:17-28.

343. Rzepczynska IJ, Piotrowski PC, Wong DH, Cress AB, Villanueva J, Duleba AJ. Role of isoprenylation in simvastatin-induced inhibition of ovarian theca-interstitial growth in the rat. *Biol Reprod* 2009;81:850-5.

344. Pizarro JG, Verdaguer E, Ancrenaz V, Junyent F, Sureda F, Pallas M, *et al.* Resveratrol inhibits proliferation and promotes apoptosis of neuroblastoma cells: role of sirtuin 1. *Neurochem Res* 2011;36:187-94.

345. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 2004;64:5245-50.

346. Ortega I, Cress AB, Wong DH, Villanueva JA, Sokalska A, Moeller BC, *et al.* Simvastatin reduces steroidogenesis by inhibiting Cyp17a1 gene expression in rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol Reprod* 2012;86:1-9.

347. Shapiro DJ, Imblum RL, Rodwell VW. Thin-layer chromatographic assay for HMG-CoA reductase and mevalonic acid. *Anal Biochem* 1969;31:383-90.

348. Fukuda S, Orisaka M, Tajima K, Hattori K, Kotsuji F. Luteinizing hormone-induced Akt phosphorylation and androgen production are modulated by MAP Kinase in bovine theca cells. *J Ovarian Res* 2009;2:17,2215-2-17.
349. Yamazaki Y, Tsuruga M, Zhou D, Fujita Y, Shang X, Dang Y, *et al.* Cytoskeletal disruption accelerates caspase-3 activation and alters the intracellular membrane reorganization in DNA damage-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 2000;259:64-78.
350. White SR, Williams P, Wojcik KR, Sun S, Hiemstra PS, Rabe KF, *et al.* Initiation of apoptosis by actin cytoskeletal derangement in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;24:282-94.
351. Supornsilchai V, Svechnikov K, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W, Soder O. Phytoestrogen resveratrol suppresses steroidogenesis by rat adrenocortical cells by inhibiting cytochrome P450 c21-hydroxylase. *Horm Res* 2005;64:280-6.
352. Svechnikov K, Spatafora C, Svechnikova I, Tringali C, Soder O. Effects of resveratrol analogs on steroidogenesis and mitochondrial function in rat Leydig cells in vitro. *J Appl Toxicol* 2009;29:673-80.
353. Chemler JA, Yan Y, Koffas MA. Biosynthesis of isoprenoids, polyunsaturated fatty acids and flavonoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact* 2006;5:20.
354. Inglese J, Koch WJ, Caron MG, Lefkowitz RJ. Isoprenylation in regulation of signal transduction by G-protein-coupled receptor kinases. *Nature* 1992;359:147-50.
355. Sokalska A, Wong DH, Cress A, Piotrowski PC, Rzepczynska I, Villanueva J, *et al.* Simvastatin induces apoptosis and alters cytoskeleton in endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:3453-9.
356. Trapp J, Jung M. The role of NAD<sup>+</sup> dependent histone deacetylases (sirtuins) in ageing. *Curr Drug Targets* 2006;7:1553-60.

357. Jin Q, Yan T, Ge X, Sun C, Shi X, Zhai Q. Cytoplasm-localized SIRT1 enhances apoptosis. *J Cell Physiol* 2007;213:88-97.
358. Fernandez AF, Fraga MF. The effects of the dietary polyphenol resveratrol on human healthy aging and lifespan. *Epigenetics* 2011;6:870-4.
359. Knight CM, Gutierrez-Juarez R, Lam TK, Arrieta-Cruz I, Huang L, Schwartz G, *et al.* Mediobasal hypothalamic SIRT1 is essential for resveratrol's effects on insulin action in rats. *Diabetes* 2011;60:2691-700.
360. Mendez E, Maeland M, Skalhegg BS, Planas JV. Activation of the cAMP-dependent protein kinase signaling pathway by luteinizing hormone in trout theca layers. *Mol Cell Endocrinol* 2003;205:11-20.
361. Nelson-Degrave VL, Wickenheisser JK, Hendricks KL, Asano T, Fujishiro M, Legro RS, *et al.* Alterations in mitogen-activated protein kinase kinase and extracellular regulated kinase signaling in theca cells contribute to excessive androgen production in polycystic ovary syndrome. *Mol Endocrinol* 2005;19:379-90.
362. Tajima K, Yoshii K, Fukuda S, Orisaka M, Miyamoto K, Amsterdam A, *et al.* Luteinizing hormone-induced extracellular-signal regulated kinase activation differently modulates progesterone and androstenedione production in bovine theca cells. *Endocrinology* 2005;146:2903-10.
363. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 2005;9:59-71.
364. Fulda S, Debatin KM. Resveratrol modulation of signal transduction in apoptosis and cell survival: a mini-review. *Cancer Detect Prev* 2006;30:217-23.
365. Iijima K, Yoshizumi M, Hashimoto M, Kim S, Eto M, Ako J, *et al.* Red wine polyphenols inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells and downregulate expression of cyclin A gene. *Circulation* 2000;101:805-11.

366. Kawada N, Seki S, Inoue M, Kuroki T. Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology* 1998;27:1265-74.
367. Alkhalaf M, Jaffal S. Potent antiproliferative effects of resveratrol on human osteosarcoma SJSA1 cells: Novel cellular mechanisms involving the ERKs/p53 cascade. *Free Radic Biol Med* 2006;41:318-25.
368. Cui J, Sun R, Yu Y, Gou S, Zhao G, Wang C. Antiproliferative effect of resveratrol in pancreatic cancer cells. *Phytother Res* 2010;24:1637-44.
369. Kim YA, Rhee SH, Park KY, Choi YH. Antiproliferative effect of resveratrol in human prostate carcinoma cells. *J Med Food* 2003;6:273-80.
370. Ragione FD, Cucciolla V, Borriello A, Pietra VD, Racioppi L, Soldati G, *et al.* Resveratrol arrests the cell division cycle at S/G2 phase transition. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;250:53-8.
371. Schneider Y, Vincent F, Duranton B, Badolo L, Gosse F, Bergmann C, *et al.* Antiproliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. *Cancer Lett* 2000;158:85-91.
372. Kuwajerwala N, Cifuentes E, Gautam S, Menon M, Barrack ER, Reddy GP. Resveratrol induces prostate cancer cell entry into s phase and inhibits DNA synthesis. *Cancer Res* 2002;62:2488-92.
373. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35:495-516.
374. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326 ( Pt 1):1-16.
375. Singh CK, Kumar A, Hitchcock DB, Fan D, Goodwin R, LaVoie HA, *et al.* Resveratrol prevents embryonic oxidative stress and apoptosis associated with diabetic

embryopathy and improves glucose and lipid profile of diabetic dam. *Mol Nutr Food Res* 2011;55:1186-96.

376. MacCarrone M, Lorenzon T, Guerrieri P, Agro AF. Resveratrol prevents apoptosis in K562 cells by inhibiting lipoxygenase and cyclooxygenase activity. *Eur J Biochem* 1999;265:27-34.

377. Clement MV, Hirpara JL, Chawdhury SH, Pervaiz S. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood* 1998;92:996-1002.

378. Hsieh TC, Wu JM. Differential effects on growth, cell cycle arrest, and induction of apoptosis by resveratrol in human prostate cancer cell lines. *Exp Cell Res* 1999;249:109-15.

379. Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 2001;122:829-38.

380. Gilchrist RB, Ritter LJ, Myllymaa S, Kaivo-Oja N, Dragovic RA, Hickey TE, *et al.* Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. *J Cell Sci* 2006;119:3811-21.

381. Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:2890-4.

382. Hillier SG, Whitelaw PF, Smyth CD. Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. *Mol Cell Endocrinol* 1994;100:51-4.

383. Wang Y, Leung LK. Pharmacological concentration of resveratrol suppresses aromatase in JEG-3 cells. *Toxicol Lett* 2007;173:175-80.

384. Wang Y, Lee KW, Chan FL, Chen S, Leung LK. The red wine polyphenol resveratrol displays bilevel inhibition on aromatase in breast cancer cells. *Toxicol Sci* 2006;92:71-7.

385. Whitehead SA, Lacey M. Phytoestrogens inhibit aromatase but not 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) type 1 in human granulosa-luteal cells: evidence for FSH induction of 17beta-HSD. *Hum Reprod* 2003;18:487-94.
386. Rice S, Mason HD, Whitehead SA. Phytoestrogens and their low dose combinations inhibit mRNA expression and activity of aromatase in human granulosa-luteal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006;101:216-25.
387. Basini G, Tringali C, Baioni L, Bussolati S, Spatafora C, Grasselli F. Biological effects on granulosa cells of hydroxylated and methylated resveratrol analogues. *Mol Nutr Food Res* 2010;54 Suppl 2:S236-43.
388. Behringer RR, Finegold MJ, Cate RL. Mullerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* 1994;79:415-25.
389. Baarends WM, Hoogerbrugge JW, Post M, Visser JA, De Rooij DG, Parvinen M, *et al.* Anti-mullerian hormone and anti-mullerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression during postnatal testis development and in the adult testis of the rat. *Endocrinology* 1995;136:5614-22.
390. Kamat BR, Brown LF, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. Role in corpus luteum development. *Am J Pathol* 1995;146:157-65.
391. Villasante A, Pacheco A, Ruiz A, Pellicer A, Garcia-Velasco JA. Vascular endothelial cadherin regulates vascular permeability: Implications for ovarian hyperstimulation syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:314-21.
392. Yang R, Zhang H, Zhu L. Inhibitory effect of resveratrol on the expression of the VEGF gene and proliferation in renal cancer cells. *Mol Med Rep* 2011;4:981-3.
393. Yu HB, Zhang HF, Zhang X, Li DY, Xue HZ, Pan CE, *et al.* Resveratrol inhibits VEGF expression of human hepatocellular carcinoma cells through a NF-kappa B-mediated mechanism. *Hepatogastroenterology* 2010;57:1241-6.

394. Trapp V, Parmakhtiar B, Papazian V, Willmott L, Fruehauf JP. Anti-angiogenic effects of resveratrol mediated by decreased VEGF and increased TSP1 expression in melanoma-endothelial cell co-culture. *Angiogenesis* 2010;13:305-15.

395. Das M, Djahanbakhch O, Hacıhanefioglu B, Saridogan E, Ikram M, Ghali L, *et al.* Granulosa cell survival and proliferation are altered in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:881-7.

396. Stubbs SA, Stark J, Dilworth SM, Franks S, Hardy K. Abnormal preantral folliculogenesis in polycystic ovaries is associated with increased granulosa cell division. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:4418-26.