

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
PROGRAMA ÚNICO DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**EVALUACIÓN DE LA DINÁMICA DE SECRECIÓN DE
GONADOTROPINAS HIPOFISIARIAS ANTES Y DESPUÉS DEL
TRATAMIENTO CON METFORMINA EN MUJERES CON
SÍNDROME DE OVARIOS POLIQUÍSTICOS**

Tesis para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS MÉDICAS

Que presenta la alumna

Lesly Aminta Portocarrero Ortiz

Tutor: **Dr. Alfredo Ulloa Aguirre**

México D.F., 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

<i>Sección</i>	<i>Página</i>
RESÚMEN	3
ANTECEDENTES	4
JUSTIFICACIÓN	11
OBJETIVOS	12
MATERIAL Y MÉTODOS	13
RESULTADOS	19
DISCUSIÓN	29
REFERENCIAS	34

RESÚMEN

Antecedentes: El Síndrome de Ovarios Poliquísticos (SOP) es una enfermedad caracterizada por anomalías metabólicas (resistencia a la insulina), oligo- o anovulación crónica e hiperandrogenismo. La disfunción del eje reproductivo está asociada a una dinámica anormal de la secreción de la hormona luteinizante (LH) y a anomalías en la función ovárica. Se desconoce si las alteraciones neuroendocrinas presentes en el SOP tienen alguna asociación con o son consecuencia de la resistencia a la insulina presente en aproximadamente el 50% de mujeres con esta enfermedad.

Objetivo: El objetivo del estudio fue analizar la relación entre resistencia a la insulina y las anomalías en la dinámica de secreción de la LH en el SOP, mediante la administración de un agente sensibilizador de insulina a un grupo de mujeres con SOP, resistencia a la insulina e hiperinsulinemia.

Sujetos y Métodos: Se reclutaron 13 mujeres con SOP. A cada voluntaria se le estudió en condiciones basales y después de 3 meses de tratamiento con metformina a dosis de 1.5g/día. En los dos días de estudio se obtuvieron muestras a intervalos frecuentes (cada 10 minutos) por 10 horas; al término de la octava hora de muestreo se administró una dosis intravenosa de GnRH exógena. Se analizaron las concentraciones seriadas de LH y testosterona, así como las de glucosa, insulina, androstendiona, globulina transportadora de hormonas sexuales, estradiol, progesterona, dehidroepiandrosterona sulfato y androstendiona, éstas últimas en la primera muestra de cada día de estudio. La dinámica de secreción de LH y las características de sus pulsos se analizaron mediante análisis de conglomerados y de desconvolución; la sincronización de las concentraciones pareadas de LH y testosterona se analizó mediante correlación cruzada.

Resultados: Después del tratamiento, las concentraciones basales de LH, la amplitud de sus pulsos, su amplitud secretora, y su respuesta a la GnRH exógena, así como las concentraciones basales de testosterona circulante disminuyeron significativamente en 7 mujeres, mientras que en el resto estos parámetros permanecieron sin modificaciones. Antes del tratamiento, todas las pacientes mostraron una secreción coordinada de LH y testosterona disminuída, la cual fue restablecida mediante la administración de metformina. El tratamiento no modificó el cociente glucosa:insulina ni las concentraciones circulantes de insulina.

Conclusiones: La resistencia a la insulina en el SOP no tiene relación con las anomalías neuroendocrinas del SOP. La administración de metformina permite la identificación de 2 subtipos de mujeres con SOP en quienes las alteraciones neuroendocrinas de la enfermedad podrían mejorar independientemente de la presencia de resistencia a la insulina o de hiperinsulinemia.

ANTECEDENTES

Mecanismos de control del eje reproductor en la mujer

En los mamíferos, la función reproductora esta regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (EHHG), el cual constituye una unidad funcional. La maduración sexual y el desarrollo de competencia reproductiva dependen del preciso y coordinado funcionamiento de este eje. Los componentes del EHHG se comunican entre sí a través de señales endocrinas. En el hipotálamo se sintetiza la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), que estimula la síntesis y secreción de las gonadotropinas hipofisarias: la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH). En el ovario las gonadotropinas tienen como células blanco a las células de la teca y de la granulosa, en tanto que en testículo los blancos son las células intersticiales (o de Leydig) y las células de Sertoli (Fig. 1). Bajo el estímulo de la gonadotropinas, las gónadas producen y secretan hormonas tanto de naturaleza esteroideal (esteroides sexuales) como peptídica (activina e inhibina), las cuales a su vez modulan la función del EHHG (Fig. 1). Como en otros sistemas endocrinos, la función del eje reproductor, particularmente la de la unidad hipotálamo-hipofisaria (HH), se caracteriza por la secreción periódica o intermitente de sus señales. La respuesta de las células blanco y, eventualmente, el funcionamiento armónico de la glándula, dependerán de la adecuada dinámica de secreción de dichas señales.¹

La GnRH es un decapeptido producido por las neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo medial basal y del área preóptica del hipotálamo anterior. Los axones de estas neuronas se proyectan a diferentes regiones del cerebro, donde la GnRH tiene funciones como neurotransmisor y neuromodulador del comportamiento reproductivo, así como a la eminencia media, en donde entra a la circulación portal hipofisaria para interactuar con su receptor membranal en los gonadotropos y estimular la síntesis y secreción de las gonadotropinas. La vida media plasmática del GnRH es relativamente corta (2 a 4 minutos), debido a que no circula unida a proteínas; el péptido es altamente sensible a la actividad de endopeptidasas y otras enzimas que hidrolizan el piroglutamato, o separan el extremo carboxilo terminal del resto de la molécula.¹ La secreción e interacción del GnRH con su receptor ocurre de manera pulsátil e intermitente, debido a la actividad de un sistema oscilador o generador de pulsos localizado en el hipotálamo medial basal. Esta intermitencia

en la liberación del GnRH es sumamente importante desde el punto de vista funcional, ya que evita la desensibilización o refractariedad de la respuesta del gonadotropo provocada por la

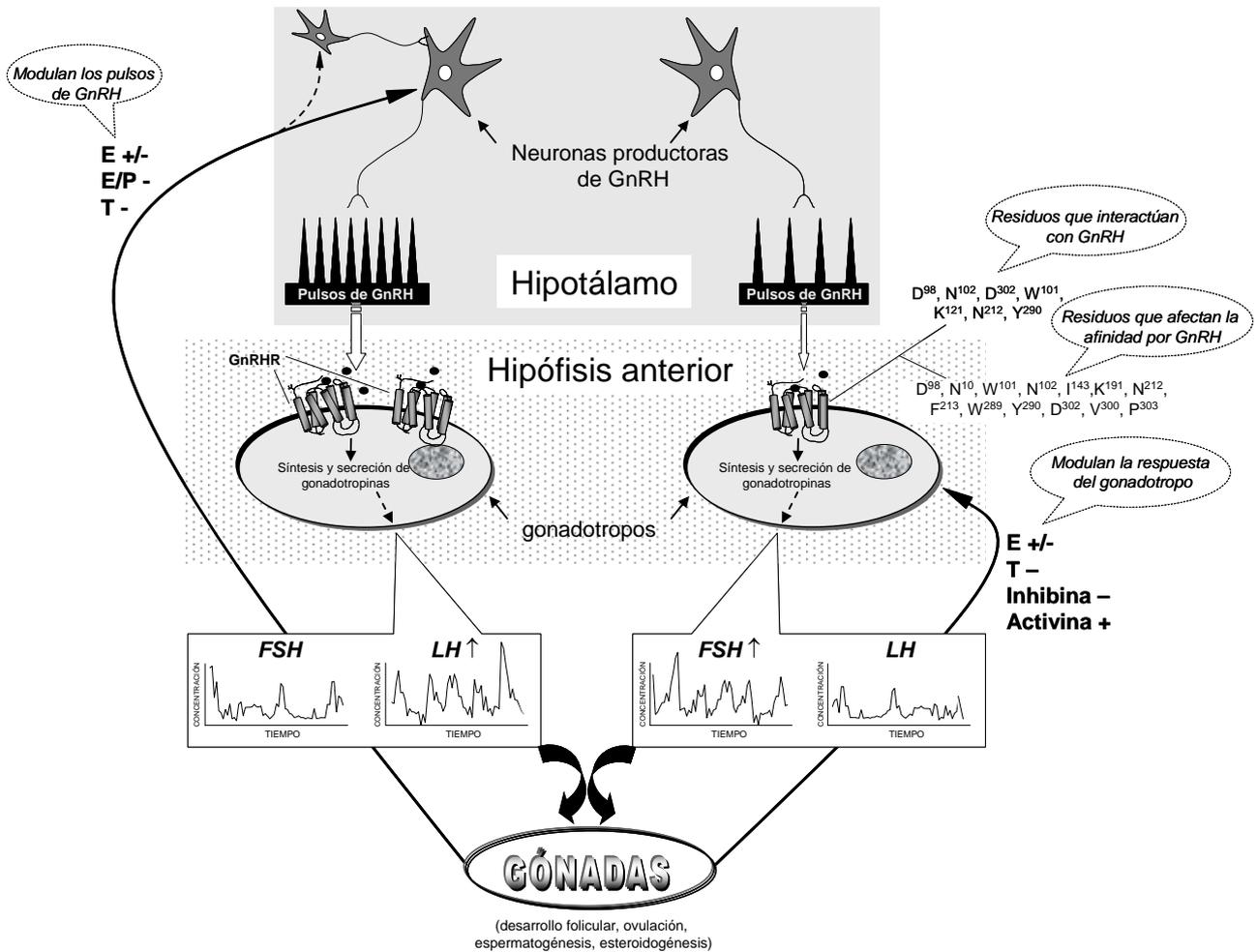


Figura 1. Modulación de la secreción de gonadotropinas por el GnRH y asas de retroalimentación regulatorias del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. La secreción de GnRH con su receptor (GnRHR) en el gonadotropo ocurre de una manera intermitente y pulsátil. El gonadotropo responde con la secreción pulsátil de las gonadotropinas LH y FSH. La secreción de LH es favorecida cuando la frecuencia de los pulsos de GnRH es rápida, mientras que la de FSH se favorece con frecuencias lentas. Las gonadotropinas se unen a sus receptores en las gónadas para estimular la producción de esteroides sexuales [17β -estradiol (E), progesterona (P), y testosterona (T)] y de hormonas peptídicas (inhibina y activina), las cuales modulan la secreción de GnRH y de las gonadotropinas. En el hipotálamo, el E actúa directamente en las neuronas productoras del GnRH; sin embargo, todos los esteroides sexuales pueden actuar indirectamente a través de otras neuronas hipotalámicas que pueden potencialmente influenciar la secreción de GnRH (flechas discontinuas). Las concentraciones elevadas de testosterona suprimen (-) los pulsos hipotalámicos de GnRH y la respuesta hipofisaria a éste. En la hipófisis anterior, los estrógenos incrementan el número de receptores del GnRH y la respuesta de los genes de la LH al estímulo del GnRH; los estrógenos pueden también suprimir directamente la secreción de LH. Se muestran también los residuos de aminoácidos del receptor del GnRH que regulan la unión y afinidad del GnRH.

exposición continua a la hormona y permite que la magnitud de la síntesis y secreción de LH y FSH, ocurra de manera diferencial, dependiendo de los cambios en la frecuencia de los pulsos del péptido liberador.¹

La fase folicular del ciclo menstrual se caracteriza por pulsos de alta frecuencia de GnRH que disminuyen progresivamente durante la fase lútea. De la misma manera, y como consecuencia de lo anterior, la secreción de FSH y de LH también muestra variaciones importantes en frecuencia y amplitud, desde pulsos de LH de alta frecuencia y baja amplitud en la fase folicular temprana, hasta pulsos de muy baja frecuencia con amplitudes alternantes (bajas y altas) en la fase lútea.²⁻⁶ Durante el medio ciclo ha sido posible detectar la ocurrencia de pulsos de alta amplitud, sin alteraciones importantes en la frecuencia.^{5,7}

La disminución en la frecuencia fisiológica de los pulsos del GnRH (aproximadamente cada 60 a 90 minutos) incrementa las concentraciones circulantes de FSH y disminuye las de LH. El análisis indirecto de las características de esta secreción pulsátil durante el ciclo menstrual mediante la cuantificación de las concentraciones circulantes de las gonadotropinas ha intervalos frecuentes, ha demostrado la existencia de variaciones importantes en la frecuencia de los pulsos de secreción del GnRH.¹ Debido a que la secreción de GnRH es intrínsecamente episódica, la LH es liberada en una serie de pulsos. Los picos en las concentraciones plasmáticas circulantes resultantes tienen amplitudes que varían desde el 35 al 270% de los valores basales y ocurren con una frecuencia de un pulso cada 1 a 2 horas.^{5,8-11}

En el ovario, la FSH regula la función de la célula de la granulosa, incluyendo el desarrollo y selección de los folículos ováricos, la producción de estrógenos y proteínas reguladoras (inhibina y activina), la maduración del ovocito y de forma secundaria la ovulación. La LH regula la esteroidogénesis (principalmente la producción de andrógenos en las células intersticiales y de la teca, y la de progesterona en las células de la granulosa luteinizadas y en las células del cuerpo lúteo), así como la producción de inhibina y otros factores reguladores en las células de la teca y del cuerpo lúteo. Los andrógenos producidos por las células de la teca, son aromatizados a estrógenos en la capa granulosa gracias a la acción de la FSH, la cual induce la transcripción del gene del citocromo P450 aromatasa. Con base en este mecanismo, se ha especulado que el tratamiento con metformina podría reducir las concentraciones circulantes de andrógenos y LH al disminuir las concentraciones de insulina, por lo que el uso de este agente sería una forma racional de tratamiento de las anormalidades en la esteroidogénesis ovárica presentes en el síndrome de ovarios poliquísticos (SOP).¹²⁻¹⁸ A pesar del efecto comprobado de este agente en la ruptura de la resistencia a la insulina en el SOP, la cinética de los cambios en la dinámica de secreción

episódica de las gonadotropinas inducidas por este medicamento no ha sido estudiada en detalle.

Síndrome de ovarios poliquísticos

El SOP, descrito inicialmente en 1935 por Stein-Leventhal,¹⁹ es la alteración endocrinológica más común en mujeres en edad reproductiva, afectando entre 5 y 10% de las mujeres en este grupo de edad.²⁰⁻²⁴ Los síntomas del SOP incluyen hirsutismo y acné, como evidencia de producción excesiva de andrógenos, así como alteraciones menstruales que conllevan a la anovulación crónica y a la infertilidad.^{25,26} Estos síntomas aparecen después de la menarca y las alteraciones bioquímicas al final de la adrenarca, con repercusiones importantes durante la vida reproductiva (como infertilidad), y a largo plazo, alteraciones metabólicas como la diabetes mellitus (DM), enfermedades cardiovasculares y neoplasias malignas, como el cáncer mamario y endometrial.^{20,25,27-29} El hallazgo característico en el ovario es la detención en la maduración folicular, que ocasiona la formación de pequeños quistes foliculares subcorticales y un incremento en el volumen del estroma ovárico; ambos se pueden detectar mediante ultrasonografía y la presencia de quistes es por lo que el síndrome adquirió el nombre con el que se conoce.²⁷ En la actualidad, el SOP se define como un síndrome heterogéneo de etiología desconocida caracterizado por hiperandrogenismo y anovulación/oligoovulación, con alteraciones menstruales que pueden llegar a la amenorrea, y presencia de concentraciones circulantes discretamente elevadas de LH, en ausencia de otra enfermedad hipotalámica, pituitaria, ovárica ó suprarrenal concomitante.^{27,30}

Se han propuesto 3 hipótesis para explicar la anormalidad primaria en el SOP. La primera de origen central, está basada en la presencia de anomalías en el patrón de secreción de LH, que implica que mujeres con SOP tengan un incremento en la amplitud y en la frecuencia de los pulsos, comparada con mujeres normales con ciclos ovulatorios, así como un aumento en la concentración inter-pulso, dando como resultado una alteración en el cociente LH/FSH.^{23,31-40} La segunda es la hipótesis ovárica, que se apoya en la presencia de hipertrofia de la teca y la sobreproducción de andrógenos, que son características reconocidas del SOP. En una prueba dinámica corta, análogos del GnRH estimulan una respuesta ovárica exagerada (en términos de 17-hidroxiprogesterona), reflejando un incremento en la masa tecal,⁴¹⁻⁴³ pero también podría interpretarse como una desregulación de la actividad de la enzima P450c17, la cual es responsable de la hidroxilación en posición 17 de la progesterona (17 α -hidroxilación) y de la conversión de esteroides de 21 átomos de carbono en moléculas con 19 átomos

(actividad de 17,20 desmolasa), la cual es necesaria para síntesis de andrógenos.⁴⁴ Por último, la hipótesis suprarrenal, se basa en la presencia de irregularidades menstruales después de la menarca en las mujeres con SOP, lo que sugiere la existencia de una producción excesiva de andrógenos suprarrenales durante la pubertad, lo que provee de sustratos para la aromatización extragonadal, resultando en una inhibición de la secreción de FSH.⁴⁵

Por otro lado, la insulina estimula directamente la esteroidogénesis (la actividad de 17 α -hidroxilasa), estimula o inhibe a la aromatasas, sobrerregula los receptores de LH, promueve el crecimiento ovárico y la formación de quistes sinérgicamente con LH y potencializa el efecto de GnRH sobre la secreción de LH y FSH.⁴⁶⁻⁴⁸

El origen del defecto fisiopatológico del SOP permanece desconocido. Sin embargo, existe el consenso de que el síndrome es la consecuencia de una serie alteraciones que incluyen: a) resistencia a la insulina, b) exceso de andrógenos y c) una dinámica anormal de la secreción de las gonadotropinas. La secreción episódica de la LH se encuentra incrementada a expensas de un incremento en la masa y frecuencia de sus pulsos secretorios, así como de un aumento en las concentraciones inter-pulso (basales).⁴⁹⁻⁵³

Diversos estudios han informado que entre el 50% y el 70% de las pacientes con SOP cursan con obesidad, la cual a su vez se asocia con resistencia a la insulina. Sin embargo, en las mujeres con SOP, la resistencia a la insulina es mayor que en las mujeres obesas sin SOP.^{54,55} El patrón de distribución del tejido adiposo en el SOP es generalmente abdominal y representa un predictor importante de los factores de riesgo para DM tipo 2, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina, hipertensión arterial sistémica e hipercolesterolemia, así como cáncer mamario y endometrial. En estudios realizados en mujeres obesas con SOP, el 40% presentaron intolerancia a la glucosa o DM, comparados con el 5% en la población en general. En un estudio retrospectivo, se demostró que el 15% de las mujeres postmenopáusicas con historia de SOP tenían DM tipo 2, en comparación con 2.3% de un grupo control.³⁹

Existe una correlación lineal entre las concentraciones periféricas de andrógenos e hiperinsulinemia, pareciendo que la dirección del trastorno metabólico es de insulina hacia andrógenos más que a la inversa.⁵⁶ La insulina modula la secreción de andrógenos y actúa sinérgicamente con la LH en la producción de andrógenos ováricos, más allá de lo que la LH puede estimular por sí misma. Por otra parte, la insulina inhibe la producción de la proteína

transportadora de hormonas sexuales, lo que conlleva al incremento en la biodisponibilidad de andrógenos.⁵⁷

Metformina

La metformina o metformina, es una metilbiguanida introducida en 1956 como hipoglucemiante oral para el tratamiento de la DM tipo 2. Este medicamento es un sensibilizador a la insulina con potente efecto antihiperoglucemiante. Las propiedades antihiperoglucemiantes de la metformina son debidas a diversos mecanismos, incluyendo la supresión de la producción hepática de glucosa (gluconeogénesis hepática) y el incremento en la sensibilidad periférica a la insulina. Se desconoce el mecanismo preciso de la acción antihiperoglucemiante del metformin, pero se ha sugerido que interrumpe los procesos oxidativos mitocondriales a nivel hepático y corrige las anomalías en el metabolismo del calcio intracelular en tejidos sensibles a la insulina (hígado, músculo liso y adipositos) y en el tejido cardiovascular.⁵⁸

Existen varios métodos rápidos para la determinación de resistencia a la insulina. El cociente glucosa basal: insulina basal (cociente G:I) tiene 84% de especificidad y 95% de sensibilidad en pacientes con SOP y obesidad.⁵⁹ Cuando este cociente (producto de dividir la concentración de glucosa en ayuno (mg/dl) entre la concentración de insulina en ayuno(mU/L) es menor de 4.5, es altamente probable que exista resistencia a la insulina.⁶⁰ La metformina mejora la sensibilidad a la insulina a nivel tisular y disminuye las concentraciones de ésta, sin afectar su secreción. Este efecto es útil en los pacientes con SOP, ya que mejorando la sensibilidad a la insulina es posible disminuir las concentraciones de testosterona libre e incrementar los de estradiol.^{15,17,54,61-63} En las mujeres con SOP, esto se refleja en una disminución del hiperandrogenismo, normalización de los ciclos menstruales y ovulación.^{15,62,64-68} En un estudio reciente, 31 de 35 pacientes (89%) obesas con SOP que recibieron 1.5g diarios de metformina ovularon ya sea espontáneamente o en respuesta a citrato de clomifeno, en tanto que únicamente el 12% de las pacientes que recibieron placebo presentaron ovulación espontánea.⁶⁹

En el consenso de criterios diagnósticos y factores de riesgo a largo plazo asociados a SOP de Rotterdam,⁷⁰ se concluyó que debido a la falta de consenso entre los diferentes autores acerca del papel (deletéreo o benéfico) de las concentraciones elevadas de LH en la

fisiopatogenia de la disfunción ovárica en el SOP, éstas no deben ser un criterio clínico diagnóstico para la enfermedad.⁷⁰

En un estudio que siguió prospectivamente un grupo de 39 mujeres con SOP, a las que se les administró metformina durante 12 semanas (500mg tres veces al día), se observó una disminución en la producción tanto de insulina en ayuno como de testosterona, mejoría clínica del hiperandrogenismo, disminución en el índice de masa corporal y normalización de la ovulación, sin encontrarse cambios en las concentraciones de LH, ni en el cociente LH/FSH.⁷¹ De la misma forma, en un grupo de mujeres brasileñas a las que se administró metformina durante 1 mes (500mg tres veces al día), se encontró una disminución en la producción tanto de insulina en ayuno como de testosterona, pero en un subgrupo de mujeres obesas solo se observó disminución en las concentraciones de testosterona. En este estudio tampoco se observaron cambios en las concentraciones de LH, ni en el cociente LH/FSH, tanto en mujeres obesas como no obesas.⁷² Más aún en un estudio en que se siguió por 12 semanas a un grupo de 20 mujeres obesas mórbidas tratadas con metformin (850mg tres veces al día), no se observaron cambios en la resistencia a la insulina, en las concentraciones de testosterona o de las gonadotropinas, ni en los datos clínicos de hiperandrogenismo. Estas mujeres mantuvieron su peso a lo largo de todo el estudio.⁷³

Contrario a lo anterior, en otro estudio en que se siguieron prospectivamente 20 mujeres escocesas obesas con oligomenorrea y SOP, tratadas con metformina (850mg dos veces al día) durante 8 semanas, se observó un descenso importante tanto de HL y testosterona dentro de la primera semana de tratamiento con metformina. En este estudio se observó que las pacientes con mayor éxito terapéutico en cuanto a normalización de la ovulación fueron aquellas con concentraciones elevadas de testosterona y de LH al inicio del tratamiento.⁵⁵ De la misma manera, en otro estudio en que se siguió un grupo de 20 mujeres venezolanas con oligomenorrea o amenorrea, hirsutismo y SOP a las que se administró metformina (500mg tres veces al día) durante 6 meses, se observó una disminución significativa tanto de LH como del cociente LH/FSH, acompañada de mejorías en la ovulación y en la fertilidad.⁷⁴ En otro grupo de 30 mujeres italianas seguidas durante 6 meses, a las que se administró metformin a la misma dosis, también se encontró notable mejoría tanto clínica (disminución del hiperandrogenismo y de los trastornos menstruales) como bioquímica (sensibilidad a la insulina, reducción de la testosterona), resaltando una notable disminución en las concentraciones de LH en las mujeres respondedoras al tratamiento.⁶²

Finalmente, en un estudio en que se evaluó el efecto de metformin en la liberación episódica espontánea de LH en un grupo de 12 mujeres italianas no obesas con SOP, antes y 6 meses después del tratamiento (500mg dos veces al día), se observó una reducción significativa de LH, androstenediona, testosterona, 17 α - hidroxiprogesterona y del cociente LH/FSH, así como una mejoría en la sensibilidad a la insulina. Hubo una significativa reducción en la amplitud de los pulsos de la LH, más no así en la frecuencia de éstos. Mejoró la ciclicidad de las mujeres amenorreicas y oligomenorreicas y hubo un descenso notable en el volumen ovárico.¹⁶

JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, el SOP es la enfermedad endocrinológica más frecuente en mujeres en edad reproductiva a nivel mundial (5 a 10% de mujeres en edad reproductiva) y los trastornos que ocasiona merman la calidad de vida y repercuten directamente en la fertilidad de las mujeres que lo padecen. Se han realizado diferentes estudios que demuestran el efecto benéfico de la metformina en la corrección del hiperandrogenismo, los trastornos menstruales y la fertilidad en el SOP. Se han sugerido y demostrado diferentes mecanismos que explican la fisiopatología de los trastornos en la secreción y regulación de las diferentes hormonas implicadas en este padecimiento, pero quedan algunas preguntas sin aclarar relacionadas con el papel de las gonadotropinas, principalmente LH, en los trastornos de la fertilidad en el SOP así como con el impacto de la resistencia a la insulina en las concentraciones circulantes de esta gonadotropina. Diferentes autores han cuantificado las concentraciones de LH y calculado el cociente LH/FSH posterior a la corrección de la resistencia a la insulina y la mejoría de los síntomas del SOP después de tratamiento prolongado con metformin, obteniendo diferentes resultados. La mayoría demuestran un descenso en los concentraciones de LH y del cociente LH/FSH, pero esto ha sido mediante mediciones únicas al principio y al final del tratamiento, sin demostrarse cambios en la secreción episódica de las gonadotropinas. Existen en menor cantidad estudios en los que se han obtenido muestras seriadas para la cuantificación de gonadotropinas, siendo los intervalos de muestreo muy cortos (4 a 6 horas), lo que ha llevado a datos poco concluyentes acerca del papel que juega la resistencia a la insulina en las anormalidades secretoras de estas hormonas. Es necesario, por lo tanto, realizar estudios en mujeres con SOP en los que se analice de forma detallada la secreción episódica de las gonadotropinas a intervalos más frecuentes, antes y después del tratamiento con metformina durante un tiempo más prolongado, para un mejor conocimiento de la cinética de su secreción y del impacto que sobre ésta tiene la resistencia a la insulina.

De documentar una relación entre la cinética anormal de secreción de la LH y la resistencia a la insulina en el SOP, así como la corrección de la misma con agentes sensibilizadores de la insulina, ofrecerá opciones terapéuticas enfocadas básicamente hacia la corrección de la anormalidad metabólica en el SOP y la prevención de alteraciones a largo plazo (DM, hipertensión arterial, dislipidemia).

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar el papel de la hiperinsulinemia en las anormalidades neuroendócrinas del SOP mediante el análisis de la dinámica de secreción de la LH y su modificación al corregir la hiperinsulinemia y resistencia a la insulina mediante la administración de metformina.

Objetivos particulares

- A. Cuantificar las concentraciones circulantes de LH a intervalos frecuentes, antes y después de la administración de un sensibilizador de la insulina (metformina).
- B. Analizar la vida media y la tasa de producción de LH antes y después de la administración de metformina.
- C. Cuantificar la masa de LH secretada por pulso espontáneo antes y después de la administración de metformina.
- D. Cuantificar la sensibilidad hipofisaria al GnRH exógeno así como la reserva de LH y FSH, antes y después de la administración de metformina.
- E. Analizar los cambios en la secreción coordinada de LH y de testosterona en respuesta a la administración de metformina.

HIPÓTESIS

La resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia en mujeres con SOP causan anormalidades en la cinética de secreción de la LH, las cuales son susceptibles de ser corregidas mediante la administración de un sensibilizador de insulina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Se realizó un estudio de carácter comparativo, longitudinal y experimental en el que se analizaron las características de la secreción episódica de la LH y la reserva hipofisiaria en mujeres con SOP antes y después de la administración de metformina. Para estudiar las características de la secreción episódica de la LH, las pacientes fueron sometidas a un muestreo sanguíneo a intervalos frecuentes (cada 10 minutos durante 12 horas consecutivas) así como a una prueba de reto con GnRH exógeno. Las concentraciones circulantes de la LH fueron sometidas a un análisis matemático empleando 2 algoritmos para determinar las características de los pulsos de secreción, la masa de hormona secretada por pulso, su tasa de producción y su vida media. Estos procedimientos se llevaron a cabo en condiciones basales (sin tratamiento) y posteriormente después de tres meses de tratamiento con metformina. Se estudió también un grupo de mujeres sanas, de edades similares a las pacientes, que fueron sometidas voluntariamente a los procedimientos señalados.

Sujetos

Se estudiaron 13 mujeres en edad reproductiva, con diagnóstico clínico y ultrasonográfico de SOP, que acudieron a atención médica al Servicio de Ginecología Endocrina de la Unidad de Alta Especialidad Hospital de Ginec Obstetricia No.4 “Luis Castelazo Ayala”, IMSS, en el periodo comprendido entre abril del 2001 y abril del 2002.

Los criterios de elegibilidad fueron los siguientes:

Criterios de inclusión

Mujeres entre 20 y 35 años con diagnóstico de SOP de acuerdo a los criterios de Róterdam y que reunieran 3 de los siguientes criterios:

- Tener resistencia a la insulina.
- Presentar menos de 6 periodos menstruales en el último año) o amenorrea.
- Historia de infertilidad.
- Cociente LH/FSH mayor de 2.
- Hiperandrogenismo clínico (hirsutismo y/o acné) o bioquímico.

- Ultrasonografía (USG) transvaginal en mujeres con vida sexual activa o USG pélvica en mujeres que no habían iniciado su vida sexual, que mostraran por lo menos 6 quistes subcorticales <1cm y compromiso de ambos ovarios.

Criterios de exclusión

- Mujeres embarazadas en el momento del estudio.
- Tratamiento con inductores de la ovulación en los 3 meses previos al estudio.
- Cualquier otro tratamiento hormonal durante los 3 meses previos al estudio.
- Presencia de enfermedades concomitantes como diabetes mellitus, hipotiroidismo, hipertensión arterial, cualquier otra enfermedad cardiovascular o hepática, o cáncer.

Criterios de eliminación

- Pacientes que no siguieron el tratamiento con metformina de manera adecuada.
- No haber acudido a cualquiera de las citas programadas durante el periodo del estudio.
- Embarazo durante el estudio.
- Desarrollo de enfermedades graves durante el seguimiento, independientemente del tratamiento.

Inicialmente 17 mujeres con diagnóstico de SOP que cumplieron con los criterios de elegibilidad, aceptaron participar en el estudio. La edad de las pacientes fue de 18 a 35 años (mediana 25.7 años), el índice de masa corporal (IMC) fue normal en 4 mujeres [20.2-25Kg/m² (mediana 21.8Kg/m²)] y elevado en 13 [27.7-42.2Kg/m² (mediana 32.1g/m²)], todas presentaban hirsutismo, resistencia a la insulina (cociente G:I <4.5), ovarios poliquísticos y aumentados de volumen (volumen >10cm³ por USG transvaginal o pélvica), y concentraciones circulantes de prolactina y de 17 α -hidroxiprogesterona normales (<310mUI/ml y <7nmol/l, respectivamente). La función hepática, renal, hematológica y tiroidea fueron normales. A todas las pacientes se les recomendó usar métodos contraceptivos de barrera hasta el final del estudio. Se obtuvo el consentimiento informado escrito antes de su participación. Cuatro pacientes fueron eventualmente eliminadas del estudio (embarazo, cirugía por torción de quiste ovárico, rechazo para continuar en el estudio e inasistencia al segundo día del muestreo).

Muestreo

Las voluntarias fueron estudiadas en condiciones basales y después de 12 a 14 semanas de tratamiento con metformina (Glucophage, Roche-Syntex, México D.F.) a dosis de 500mg tres veces al día. El primer día del estudio, las pacientes acudieron a las 7:00 horas y fueron sometidas a un examen clínico. Posteriormente se les puncionó una vena antecubital con un catéter Jelco No. 18, dejando una vía de acceso venosa permeable con una infusión lenta de solución NaCl 0.9% (50ml/hora). La obtención de las muestras sanguíneas (1ml/muestra, cada 10 minutos) se inició a las 8:00 horas y concluyó a las 20:00 horas, recibiendo al inicio de la hora 10 del estudio un bolo intravenoso rápido de 100µg de GnRH sintético (Serono de México SA de CV, México). El muestreo se repitió de manera idéntica antes y después de completado el tratamiento con metformina. Las mujeres en amenorrea estudiaron basalmente en cualquier día, en tanto que las oligomenorreicas se estudiaron 3 a 8 días después del inicio de la menstruación. Las pacientes permanecieron en decúbito dorsal con el respaldo elevado 45° y no se les permitió dormir. Las muestras fueron conservadas a temperatura ambiente durante 1 hora y posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm a 4° C durante 15 minutos. El suero resultante se congeló a -20° C, hasta la determinación de su contenido en LH y FSH mediante radioinmunoanálisis.

Las primeras dos muestras sanguíneas se procesaron adicionalmente para analizar las concentraciones circulantes de glucosa, insulina, estradiol, testosterona, androstenediona y globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) mediante métodos colorimétricos, radioinmunoanálisis o fluoroinmunoanálisis según correspondió. También se incluyó un grupo control de mujeres sanas, de edades similares a las pacientes, en las cuales se realizaron las cuantificaciones hormonales y de glucosa solamente de manera basal, durante la fase folicular temprana de un ciclo ovulatorio. Se evaluó el apego al tratamiento cada mes, mediante el conteo de los empaques vacíos del medicamento.

Tamaño de la muestra

El tamaño de muestra se determinó considerando un nivel de confianza $(1-\alpha)$ del 95% (probabilidad de que si las muestras difieren esto refleje una diferencia entre las dos poblaciones), una potencia $(1 - \beta)$ del 80% (probabilidad de que si las dos poblaciones difieren, estas muestren una diferencia significativa), una relación entre el número de expuestos y de no expuestos de 1:1, con una frecuencia esperada de la enfermedad en el grupo

no expuesto de 30% e intervalos de confianza del 95%. Todo esto indicó un tamaño de muestra de 11 pacientes por grupo.

Análisis hormonales

La LH fue cuantificada mediante radioinmunoanálisis (RIA) empleando como trazador la preparación LH-I3, radiomarcada mediante el método de la cloramina T (actividad específica 70-90 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ de proteína), el antisuero LH-2 (dilución final 1:800,000) y LER-907 como estándar [1mg LER= 277UI de la 2ª.Preparación Internacional de Referencia de Gonadotropinas Menopáusicas Humanas] (National Hormone & Pituitary Program, Torrance, CA, EUA).^{75,76} La detección mínima de este RIA fue 0.7 IU/1. Los coeficientes de variación intra- e interanálisis fueron de 4.1-6.2% y 6.1-11.3% en los intervalos de desplazamiento de 15-23, 45-59 y 75-84% respectivamente. Las concentraciones de FSH en suero fueron determinadas mediante RIA utilizando el 2ª.Preparación Internacional de Referencia, como se describió anteriormente.⁷⁷ Las concentraciones de testosterona fueron cuantificadas en cada una de las 10 series de muestreo mediante RIA de fase sólida (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA. EUA). Las muestras seriadas de cada participante fueron analizadas por duplicado en la misma corrida. La SHBG fue cuantificada mediante inmunofluorometría (Delfia, Wallac Oy, Turku, Finlandia). El 17β -estradiol, la androstenediona, la 17α -hidroxiprogesterona (17-OHP) y el sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S) fueron medidos en la primera muestra de la mañana de cada día del estudio mediante RIA de fase sólida (Diagnostic Products Corporation). Los coeficientes de variación intra-análisis promediaron <8% (FSH), <5% (estradiol, androstenediona, progesterona, 17-OHP, testosterona y DHEA-S), y <3.5% (SHBG). Las concentraciones de insulina y glucosa se analizaron mediante un ensayo de absorción inmuno-enzimático (ELISA) y por el método de glucosa-oxidasa,⁷⁸ respectivamente. Las muestras para la determinación de FSH, hormonas esteroideas, SHBG, glucosa e insulina fueron analizadas por duplicado en la misma corrida. Las concentraciones basales (primera muestra de la mañana) de todas las mediciones se compararon con los valores obtenidos en 23 mujeres eumenorreicas que participaron voluntariamente en el estudio y que fueron muestreadas a las 08:00 horas. En 9 de estas mujeres se obtuvieron muestras cada 10 minutos durante 2 horas antes de recibir una dosis de GnRH (100ng/kg) y los valores de sus concentraciones de LH se utilizaron como referencia para comparar la respuesta inmunoactiva y bioactiva de LH del grupo de estudio a la administración exógena de GnRH.

Bioensayo in-vitro de LH

Se realizó un bioensayo in-vitro de LH y un RIA, de manera separada, a un grupo de muestras de suero obtenidas de forma basal y después de estimulación (2 horas) con GnRH (Fig. 2). Para ambos ensayos se empleó LH humana recombinante (gentilmente donada por Organon International BV, Oss, Holanda) como estándar para construir las curvas de referencia correspondientes. Este bioensayo de LH monitoriza la producción de AMPc por la línea celular de riñón de embrión humano-293 (HEK-293) transfectada de manera estable con el ADNc del receptor humano de la LH.^{75,76} Las concentraciones totales (intracelular y extracelular) de AMPc fueron determinadas mediante RIA después de la acetilación de las muestras.⁷⁹ Para normalizar el volumen final de incubación, las muestras fueron diluidas con suero de mujeres tratadas con contraceptivos orales donde la inmunoreactividad y bioactividad de LH fue indetectable. Cada muestra fue analizada en 3 diluciones (12.5, 25 y 50 μ l) por triplicado. La concentración final (vol/vol) de suero en cada muestra fue menor del 10%.

Análisis de conglomerados (cluster) y por desconvolución de los pulsos de LH espontáneos e inducidos por GnRH exógeno

Se aplicó inicialmente un análisis convencional (Cluster)⁸⁰ para analizar las características pulsátiles de la secreción espontánea de LH. Para definir picos y valles, se consideraron valores de t de 2.0 tanto para el ascenso como para descenso de las concentraciones, con un tamaño de conglomerados para nadir y pico de 2 y 1 punto, respectivamente, lo que permitió una precisión y sensibilidad aceptables. En base a los resultados obtenidos, se aplicó posteriormente un análisis por desconvolución para cuantificar la frecuencia, amplitud y masa de la secreción de LH en las series de muestras de 10 horas (basal) y 2 horas (post-GnRH).⁸¹ Para una determinación más precisa de estos parámetros se utilizó un valor poblacional de la vida media plasmática (de 2 componentes) de la LH fijo (15.6 minutos), como ha sido previamente sugerido.⁸²⁻⁸⁴

Entropía Aproximada

Se utilizó el método de la entropía aproximada (ApEn) univariada para cuantificar el patrón de regularidad de las mediciones de LH.^{83,85,86} Esta aproximación estadística permite la medición de la ordinalidad relativa en tiempo de una serie de datos, con una dependencia mínima

de la amplitud media de los pulsos, el valor basal interpulso, o la incertidumbre ocasionada por valores debajo del umbral de detección, y por lo tanto complementa la detección convencional de los pulsos.^{83,85,87} Para cada serie muestras en el tiempo, se calculó el cociente observado-aleatorizado de ApEN como cociente medio de los valores observados-aleatorizados, repitiendo al azar 1000 veces la serie de datos originales.⁸⁵ Cocientes de ApEn por debajo de la unidad denotan patrones más ordenados de liberación hormonal y viceversa.

Análisis de correlación cruzada

El análisis de correlación cruzada cuantifica la fuerza de la relación lineal entre 2 mediciones pareadas sucesivas y espaciadas igualmente en tiempo.^{83,87,88} Este procedimiento computariza coeficientes de correlación de Pearson sucesivos y tiempo-específicos. La correlación cruzada se aplica para parrear valores de datos considerados simultáneamente (al tiempo cero de retardo) y en varios periodos de tiempo de retardo definidos por los intervalos de muestreo.⁸⁷ En el presente estudio las concentraciones de LH (serie A) se compararon de manera pareada con las de testosterona (serie B) medidas simultáneamente (retardo cero), después (intervalo positivo) y antes (intervalo negativo). Las estimaciones del error de los valores de r de la correlación cruzada fueron propagadas del pool de varianzas intramuestra, con base en la longitud de las series y el número de unidades de retardo (k) consideradas.⁷¹ La significancia estadística global del grupo de valores r a un tiempo determinado fueron analizados mediante la prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov de una muestra, aplicada a la hipótesis nula de que la puntuación z de la distribución de los valores de r es aleatoriamente normal con una media de cero y una desviación estándar.⁸⁷

Definiciones operacionales:

- **Obesidad:** Se consideró cuando el IMC fue >27 (peso/talla²)
- **Glucosa sérica:** Cifras normales entre 80 y 105mg/dl
- **Insulina:** 7.1 ± 5.2 μ U/ml
- **Cociente glucosa/insulina:** Normal, ≥ 4.5 ⁶⁰
- **Testosterona:** Cifras normales <1 ng/ml
- **Androstenediona:** Cifras normales <1.5 ng/ml en fase folicular temprana
- **Estradiol.** Cifras normales 30-80 pg/ml en fase folicular temprana o media
- **LH Y FSH.** Cifras normales, 5-15 UI/L (FSH) y 5-25 UI/L (LH) del 2° estándar de referencia internacional (IRP-HMG), en fase folicular temprana o media .

- **Síndrome de ovarios poliquísticos (SOP):** Se consideró el diagnóstico de SOP cuando la paciente tuvo 2 de los 3 siguientes criterios: ⁷⁰
 - Oligo-ovulación o anovulación
 - Hiperandrogenismo clínico o bioquímico
 - Ovarios poliquísticos por USG (presencia de quistes <1cm, subcorticales, bilaterales y en número de por lo menos 10).

Análisis Estadístico: Se aplicó la prueba de *t* de Student pareada para comparar todas las mediciones antes y después del tratamiento con metformina. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Bonferroni para prueba de *t* de Student no pareada utilizada, para comparar las concentraciones basales de LH, FSH, hormonas esteroideas, SHBG, razón molar de testosterona/SHBG, insulina, cociente glucosa/insulina y respuesta de LH a la estimulación con GnRH, entre los diferentes grupos (respondedoras *vs.* no respondedoras y pacientes sanas *vs.* pacientes con SOP). Los datos fueron transformados logarítmicamente para normalizar la varianza residual previo al ANOVA. Se calcularon las áreas bajo la curva de LH (ABCLH) en condiciones basales (periodo de muestreo de 10 horas) y en respuesta a GnRH exógena, mediante el método del trapecioide. Se definió como Δ LH a la diferencia entre la concentración máxima de LH estimulada por GnRH exógeno y la concentración media precedente a la administración del decapeptido. Se empleó un análisis multivariado de varianza (MANOVA) para analizar los cambios en las concentraciones basales de testosterona y progesterona (primeras muestras de la mañana) durante el tiempo, considerando como una variable mixta la respuesta de LH al tratamiento con metformina (respuesta o no respuesta en términos de disminución de LH). Los valores basales de testosterona y de progesterona fueron transformados logarítmicamente y las mediciones repetidas de ambos esteroides fueron utilizadas en un modelo anidado; los contrastes post-hoc fueron realizados utilizando la prueba exacta de Fisher. Los valores se informan como la media \pm error estándar de la media (EEM). Se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

El análisis de las concentraciones séricas de LH durante 10 horas (liberación espontánea de LH por estimulación del GnRH endógeno) antes y después del tratamiento con metformina, permitió la identificación de 2 grupos diferentes de mujeres con SOP de acuerdo a la respuesta de LH a la administración del agente sensibilizador de la insulina. Para el propósito del estudio, las mujeres respondedoras fueron definidas *a priori* como aquellas que mostraron una disminución del 30% [que corresponde al doble del coeficiente de variación interensayo máximo aceptado en el laboratorio para el RIA de LH (15%)] en el ABCLH en respuesta a la administración de metformina. Basados en este criterio, se identificaron claramente a siete mujeres con SOP como respondedoras y a seis como no respondedoras (Fig. 2 y Tabla 1). Ambos grupos fueron similares en edad e IMC; 2 mujeres en cada grupo no eran obesas. Ninguno de los grupos presentó mejoría clínica en la regularidad de los ciclos menstruales y todas las mujeres persistieron con oligomenorrea durante el periodo de tratamiento. Las concentraciones en suero de insulina, LH, FSH, DHEA-S, progesterona y estradiol antes del tratamiento con metformina fueron similares en ambos grupos, así como el cociente LH/FSH. Los andrógenos en suero, el índice testosterona/SHBG, y la 17α -OHP fueron significativamente mayores en el grupo no respondedor ($p < 0.05$).

Secreción espontánea de LH

La figura 2 muestra la media (\pm EEM) de las concentraciones de LH en las muestras obtenidas cada 10 minutos durante 10 horas (liberación espontánea de LH). Se aplicaron los análisis de conglomerados (cluster) y por deconvolución para evaluar la respuesta de LH al tratamiento con metformina. Las mujeres con SOP que respondieron a la administración con metformina de acuerdo con los criterios descritos anteriormente, exhibieron una reducción significativa en la concentración media de LH, la media de las concentraciones de los nadires y de los valles, y la amplitud de los pulsos de LH a juzgar por el análisis por conglomerados ($p < 0.05$); no se detectaron cambios en estos parámetros en el grupo de mujeres no respondedoras (Tabla 2).

Cuando los datos fueron procesados mediante el análisis por desconvolución, las mujeres que respondieron al metformin mostraron una reducción del 40% en la masa de LH secretada por pulso y por lo tanto en la tasa de secreción pulsátil de LH (Tabla 3). Esto fue debido a la

Tabla 1. Datos clínicos, bioquímicos y hormonales en mujeres con SOP, agrupados de acuerdo a su respuesta al tratamiento con metformina. También se muestran los datos de 23 mujeres normales estudiadas durante la fase folicular temprana de un ciclo ovulatorio. Los valores corresponden a la primera muestra de la mañana obtenida en cada día de estudio.

	Respondedoras (n = 7)		No respondedoras (n = 6)		Mujeres normales (n = 23)
	Pretratamiento	Post-tratamiento	Pretratamiento	Post-tratamiento	
Edad (mediana y rango)	27(18-35)	-	25(19-32)	-	27 (24-30)
IMC (kg/m²)	34.2 ± 2.1	34.1 ± 2.3	33.0 ± 2.0	32.2±2.2	22.4 ± 1.0
Glucosa (mg/dl)	77.0 ± 4.0	80.0 ± 5.3	78.0 ± 7.3	79.0 ± 5.1	83.0 ± 1.5
Insulina (µU/ml)	29,7 ±4.1 ^a	29.5 ± 5.9 ^a	34.00 ± 7.7 ^a	35.0 ± 9.3 ^a	9.7±1.3
Razón I/G	3.0 ± 0.4 ^a	2.8 ± 0.4 ^a	2.7 ± 0.4 ^a	3.7±1.2 ^a	10.1 ±0.9
LH (UI/l)	19.0 ±4.0 ^a	12.0±2.0 ^b	27.0 ± 7.0 ^a	26.0 ± 6.0 ^{a,c}	11.0 ± 1
FSH (IU/l)	12.0±0.5	11.0 ± 1.2	10.0±0.9	11.0 ± 0.8	12±2
Cociente LH/FSH	1.6 ± 0.4	1.2±0.2	2.5 ±0.5 ^{a,c}	2.4 ± 0.4 ^{a,c}	0.92 ±0.1
ABCLH (UI/10h)	10,447 ± 2575	6447±1430 ^b	8792 ± 2660	10.925 ± 2425 ^c	-
Androstenodiona (nmol/l)	9.7±1.1	10.1±0.5	15.1 ±0.7 ^{a,c}	17.2±1.7 ^{a,c}	10.7 ±0.7
Testosterona (nmol/l)	2.1±0.2 ^a	1.4±0.1 ^b	3.3 ±0.3 ^{a,c}	2.9±0.6 ^{a,c}	1.4 ±0.1
Testosterona (nmol/l/10h)	1.1 ± 0.1	0.8±0.1 ^b	2.0 ± 0.4 ^c	1.8±0.3	-
SHBG (nmol/l)	35.8±5.3 ^a	32.4 ±7.1 ^a	19.4 ± 2.4 ^{a,c}	24.2±4.4 ^a	71.0±8.1
Índice testosterona/SHBG^d	6.6±0.9 ^a	5.5 ± 0.9 ^a	19.8 ± 3.7 ^{a,c}	18.8+4.2 ^{a,c}	2.5 ± 0.5
17-OHP (nmol/l)	3.9±0.5	3.3±0.3	6.2±0.1 ^{a,c}	5.3±0.2 ^{a,c}	3.7±0.4
S-DHEA (µmol/l)	5.3±0.6	5.5 ±0.8	6.7±0.9	7.2±1.1	5.9 ±0.8
Progesterona (nmol/l)	2.1 ± 0.4	1.3 ±0.3	2.7±0.3 ^a	2.0±0.2	1.7 ± 0.1
Estradiol (pmol/l)	157±18	131 ±14	162±26	197 ± 27 ^a	118 ± 11

^aP < 0.05 vs mujeres normales.

^bP < 0,05 vs tratamiento.

^cP < 0.05 vs respondedoras en el mismo periodo de estudio

^dTestosterona x 100/SHBG.

IMC = Índice de masa corporal; 17-OHP = 17α-hidroxyprogesterona; ABCLH = área bajo la curva de LH; índice de masa corporal; S-DHEA = sulfato de dehidroepiandrosterona; cociente G:I = cociente glucosa:insulina; SHBG = globulina transportadora de hormonas sexuales.

Tabla 2. Resultados del análisis por conglomerados y por desconvolución, y entropía aproximada (cociente ApEn) de LH en pacientes con SOP antes y después del tratamiento con 1.5g de metformina al día durante 3 meses.

	Respondedoras		No respondedoras	
	Pretratamiento	Post-tratamiento	Pretratamiento	Post-tratamiento
Análisis de conglomerados				
No. de picos/10 h	8 ± 1	8 ± 1	9 ± 1	10 ± 1
Altura máxima del pico(UI/l)	22 ± 5	14 ± 3 ^a	27 ± 6	29 ± 4 ^b
Incremento de amplitud del pico (UI/l)	7 ± 1	4 ± 1 ^a	8 ± 2	8 ± 1 ^b
Area del pico (UI/l)	212 ± 51	96 ± 27 ^a	181 ± 30	183 ± 25
Número de valles/10 h	8 ± 1	9 ± 1	9 ± 1	10 ± 1
Nivel medio de los valles (UI/l)	16 ± 4	10 ± 2 ^a	21 ± 5	23 ± 4 ^b
Nadir de concentraciones (UI/l/10 h)	15 ± 4	9 ± 2 ^a	18 ± 4	20 ± 4 ^b
Análisis por desconvolución				
Número de picos/10 h	9	10	10	10
Masa de pulsos (UI/1)	13 ± 2	8 ± 2 ^a	10 ± 2	11 ± 1
Rango de secreción pulsátil (UI/l/10 h)	131 ± 25	78 ± 18 ^a	103 ± 25	116 ± 10
Concentración media de HL (UI/l/10 h)	19 ± 5	11 ± 3 ^a	22 ± 5	24 ± 4 ^b
Cociente EpEn (1.35%)	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.6	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1

^aP < 0.05 vs pretratamiento

^bP < 0.05 vs respondedoras

atenuación selectiva de la amplitud del impulso secretor de LH (por reducción en la tasa máxima de secreción /impulso). La administración de metformina no se asoció a una alteración significativa en la frecuencia de los pulsos de LH, tanto por análisis de

conglomerados como por desconvolución. En las figuras 3 y 4 se muestran ejemplos de las concentraciones en suero de LH y de sus perfiles secretorios en mujeres de cada grupo, antes y después del tratamiento con metformina. Para demostrar los cambios en la linealidad de la liberación de LH en las mujeres con SOP tratadas con metformina, se usó la ApEn. Como se muestra en la Tabla 2, la pérdida de la secreción sincronizada de LH en el grupo de respondedoras fue indistinguible del presentado por las no respondedoras, tanto antes como después del tratamiento. De hecho, el cociente (1,35%) de la ApEn en ambos grupos fue similar al informado previamente durante la fase folicular temprana.⁸⁹

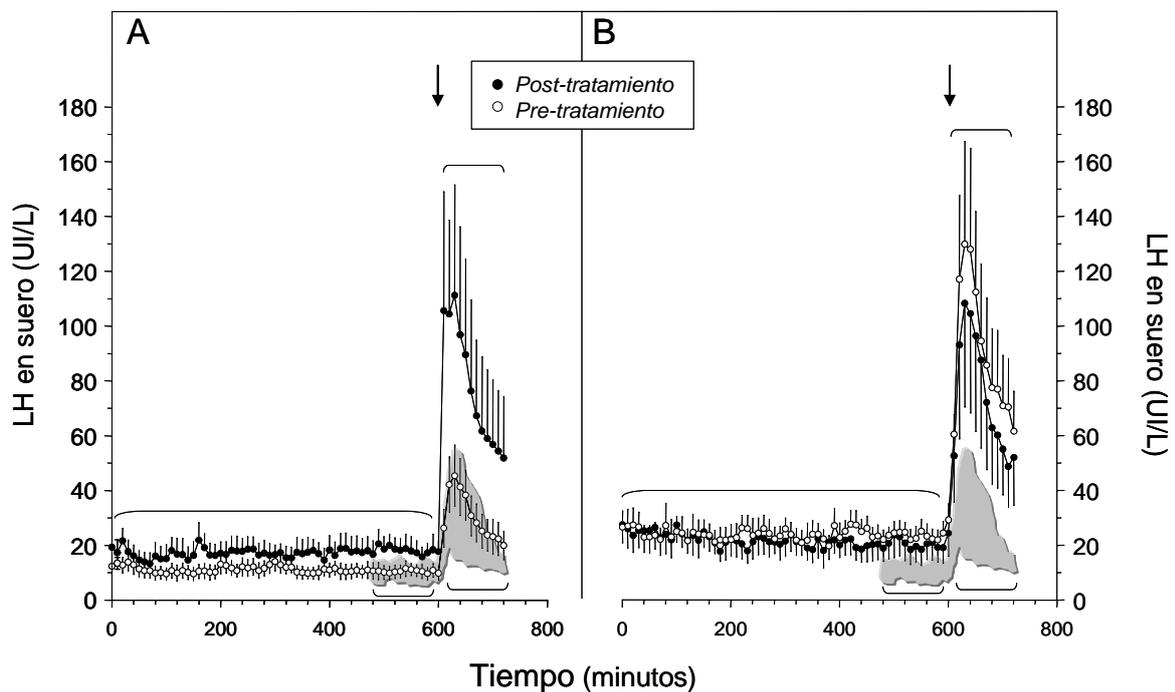


Figura 2. Concentraciones inmunoreactivas de LH en muestras de suero obtenidas cada 10 minutos por 10 horas antes y después de un pulso i.v. de GnRH (flechas) en mujeres con SOP antes (círculos negros) y después (círculos vacíos) de tratamiento con 1.5g diarios de metformina por 3 meses. **A:** Mujeres que mostraron una disminución $\geq 30\%$ en el área bajo la curva de LH bajo tratamiento con metformina; **B:** Mujeres que no respondieron a tratamiento con metformina por el criterio señalado anteriormente. Las áreas en gris (en A y B) muestran el rango de las concentraciones de LH en suero en 9 mujeres normales estudiadas por 4 horas. Se obtuvieron alícuotas de las muestras de cada periodo de estudio [periodo basal y estimulado con GnRH (conectores por arriba y debajo de las curvas de concentración)] y se formaron pozas de suero que fueron analizadas en su contenido inmunoreactivo y bioactivo de LH.

Secreción de LH estimulada por GnRH exógeno

Antes del tratamiento con metformina, las concentraciones de LH presentaron su pico a los 20 minutos y 25 minutos (mediana) después de la inyección de GnRH en los grupos de mujeres respondedoras y no respondedoras, respectivamente; el tiempo para alcanzar la respuesta

máxima de LH después de la estimulación con GnRH exógeno posterior al tratamiento con metformina fue también similar en ambos grupos (30 minutos). En condiciones basales, la masa pulsátil de secreción de LH estimulada por GnRH, la respuesta absoluta de LH (LHA), la concentración media de LH, y la ABCLH fueron similares en ambos grupos de pacientes, pero mayor que las presentadas por mujeres normales. Las pacientes que respondieron a la administración de metformina mostraron una atenuación significativa (<50%, $p < 0.05$) de todas las mediciones, mientras que en las no respondedoras permanecieron inalteradas (Tabla 3 y Fig. 2). La atenuación de la respuesta de LH después de la estimulación con GnRH exógena presentada por las pacientes respondedoras a la metformina, no se debió a diferencias en las concentraciones basales ya que los porcentajes de los incrementos en la respuesta de LH antes y después del tratamiento fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Tabla 3. Respuesta absoluta a LH (Δ LH), concentración media de LH, área bajo la curva de LH, masa del pulso y porcentaje de cambio de LH respecto a las concentraciones basales, en muestras de mujeres con SOP estimuladas con GnRH exógeno, antes y después de tratamiento con 1.5g de metformina al día durante 3 meses. También se muestran los datos de 9 mujeres normales en las que se obtuvieron muestras cada 10 min por 4 horas durante la fase folicular temprana de un ciclo ovulatorio.

	Respondedoras (n = 7)		No respondedoras (n = 6)		Mujeres normales (n = 9)
	Pretratamiento	Post-tratamiento	Pretratamiento	Post-tratamiento	
ΔLH (UI/l)	124 ± 44 ^a	38 ± 9 ^b	92 ± 33 ^a	111 ± 70 ^{a,c}	23 ± 4
Concentración media UI/l	84 ± 33 ^a	29 ± 7 ^b	74 ± 25 ^a	90 ± 24 ^{a,c}	25 ± 8
ABCLH (UI/l/2h)	9199 ± 3585	3625 ± 874 ^b	8782 ± 2915	10.925 ± 2657 ^{a,c}	3995 ± 560
Masa del pulso (UI/l)	118 ± 45	41 ± 13 ^b	93 ± 37	84 ± 30	62 ± 19
Porcentaje de cambio de LH	764 ± 153 ^a	445 ± 67 ^b	608 ± 159 ^a	623 ± 169 ^a	331 ± 54

^a $P < 0.05$ vs mujeres normales

^b $P < 0,05$ vs tratamiento

^c $P < 0.05$ vs respondedoras en el mismo periodo de estudio

Concentraciones bioactivas de LH y cociente bioactividad:inmunoactividad (B:I) de LH

El tratamiento con metformina no modificó las concentraciones basales bioactivas de LH en el grupo de respondedoras, mientras que en las no respondedoras estas concentraciones se incrementaron de 32±6 a 42±7 UI/l después del tratamiento con metformina (Tabla 4). El cociente B:I de LH basal antes y después del tratamiento se mantuvo prácticamente inalterado en el grupo de respondedoras, mientras que en el grupo de no respondedoras el cociente disminuyó modestamente de 1.9±0.4 a 1.4±0.3; esta reducción del cociente B:I de LH fue aparentemente debida al incremento en el contenido de LH inmunoreactiva en la poza de suero correspondiente ($p < 0.05$; Tabla 4). Después de la administración de GnRH, las concentraciones bioactivas de LH se incrementaron en ambos grupos; la respuesta de LH bioactiva al GnRH exógeno bajo el tratamiento con metformina se atenuó en el grupo de respondedoras, pero no así en el grupo de no respondedoras. A pesar de que el cociente B:I

post-GnRH fue mayor en las respondedoras, tanto antes como después del tratamiento, estas diferencias no alcanzaron significancia estadística. En ambos grupos de mujeres con SOP, las concentraciones de LH bioactiva y su cociente B:I durante la secreción espontánea (basal) y la estimulada por el GnRH exógeno, fueron mayores que las detectadas en las pozas de suero de las mujeres eumenorreicas estudiadas durante la fase folicular temprana de un ciclo

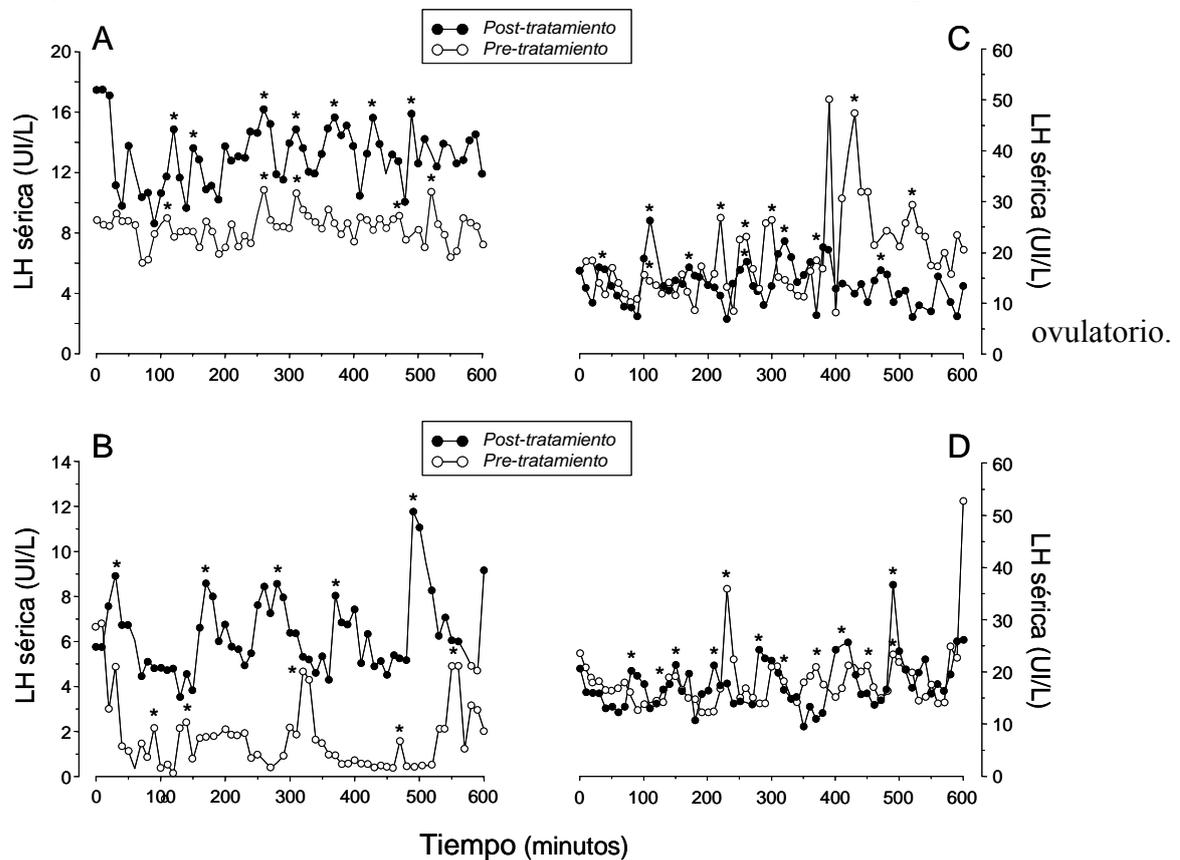


Figura 3. Perfiles de 10 horas ilustrativos de las concentraciones inmunoreactivas de LH en 4 mujeres con SOP antes y después de tratamiento con metformina. **A** y **B** muestran los patrones en 2 pacientes clasificadas como respondedoras, en tanto que **C** y **D** muestran los patrones en 2 mujeres no respondedoras. Los asteriscos señalan el valor máximo del pulso determinado por análisis de conglomerados.

Concentraciones en suero de insulina y hormonas esteroides y análisis de correlación cruzada de LH vs testosterona

La administración de metformina no provocó cambios detectables en las concentraciones circulantes de glucosa o de insulina. Consecuentemente, el cociente glucosa/insulina permaneció inalterado en todas las mujeres con SOP, excepto en dos (una de cada grupo). Se detectó una reducción significativa ($p < 0.05$) en las concentraciones totales de testosterona (cuantificada en la primera muestra de la mañana y en las muestras obtenidas a lo largo de 10

horas) en el grupo de mujeres con SOP que presentaron una disminución significativa tanto en la secreción espontánea de LH como en la inducida por GnRH exógeno en respuesta a la administración de metformina (Tabla 1 y Figuras 5A y B). Tres pacientes en el grupo no respondedor presentaron una reducción detectable (21-60%) en la concentración de testosterona en la primera muestra de la mañana y 5 mostraron una disminución modesta, aunque no significativa, en la concentración media de testosterona (promedio de 10 horas). Sin embargo, el análisis de varianza multivariado reveló que en ambos grupos las concentraciones basales de testosterona (primera muestra de la mañana) declinaron modestamente con el tiempo, independientemente de la respuesta al tratamiento con metformina [$p < 0.048$ para los grupos de respuesta a la LH (grupo respondedor y no respondedor) y $p < 0.052$ para el tiempo (pretratamiento y post-tratamiento)]. Se encontraron resultados similares para las concentraciones de progesterona en usuario (MANOVA para los grupos de LH, $p < 0.087$; para tiempo, $p < 0.029$). Las concentraciones en usuario de androstenediona, progesterona, estradiol y SHBG así como el índice molar testosterona/SHBG no cambiaron en respuesta a la metformina en ambos grupos de pacientes. Hubo una reducción discreta post-tratamiento (no estadísticamente significativa) en las concentraciones de 17α -OHP en ambos grupos.

Tabla 4. Concentraciones inmunorreactivas y bioactivas de LH en suero, en mujeres con SOP antes (basal) y después de la estimulación con GnRH exógeno, antes y después del tratamiento con 1.5g de metformina al día durante 3 meses. También se muestran los datos de 9 mujeres normales en las que se obtuvieron muestras cada 10 min por 4 horas durante la fase folicular temprana de un ciclo ovulatorio y a las que se les administró GnRH después de 2 horas de muestreo.

	Respondedoras (n = 7)		No respondedoras (n = 6)		Mujeres normales (n = 9)
	Pretratamiento	Post-tratamiento	Pretratamiento	Post-tratamiento	
Basal					
LH inmunorreactiva (UI/l)	14 ± 2 ^a	12 ± 2 ^a	18 ± 2 ^{a,d}	42 ± 13 ^{b,c,d}	10 ± 1
LH bioactiva (UI/l)	29 ± 5 ^{a,d}	27 ± 5 ^{a,d}	32 ± 6 ^{a,d}	42 ± 7 ^{a,b,c,d}	10 ± 2
Cociente B:l	2.2 ± 0.4 ^d	2.2 ± 0.2 ^d	1.9 ± 0.4 ^d	1.4 ± 0.3	1.1 ± 0.1
Post-GnRH					
LH inmunorreactiva (UI/l)	34 ± 9	29 ± 9	47 ± 11 ^d	56 ± 11 ^{b,c,d}	22 ± 5
LH bioactiva (UI/l)	122 ± 16 ^d	68 ± 6 ^{c,d}	82 ± 9 ^d	114 ± 12 ^{b,c,d}	17 ± 3
Cociente B:l	4.6 ± 1.8 ^d	2.9 ± 0.7 ^d	1.8 ± 0.2 ^d	2.2 ± 0.5 ^d	0.85 ± 0.1

Razón B:l = razón bioactiva:inmunorreactiva

^a $P < 0.05$ basal versus post-GnRH en el mismo grupo.

^b $P < 0,05$ vs respondedoras en el mismo periodo de estudio

^c $P < 0.05$ vs periodo de pretratamiento en el mismo grupo

^d $P < 0.05$ vs mujeres normales

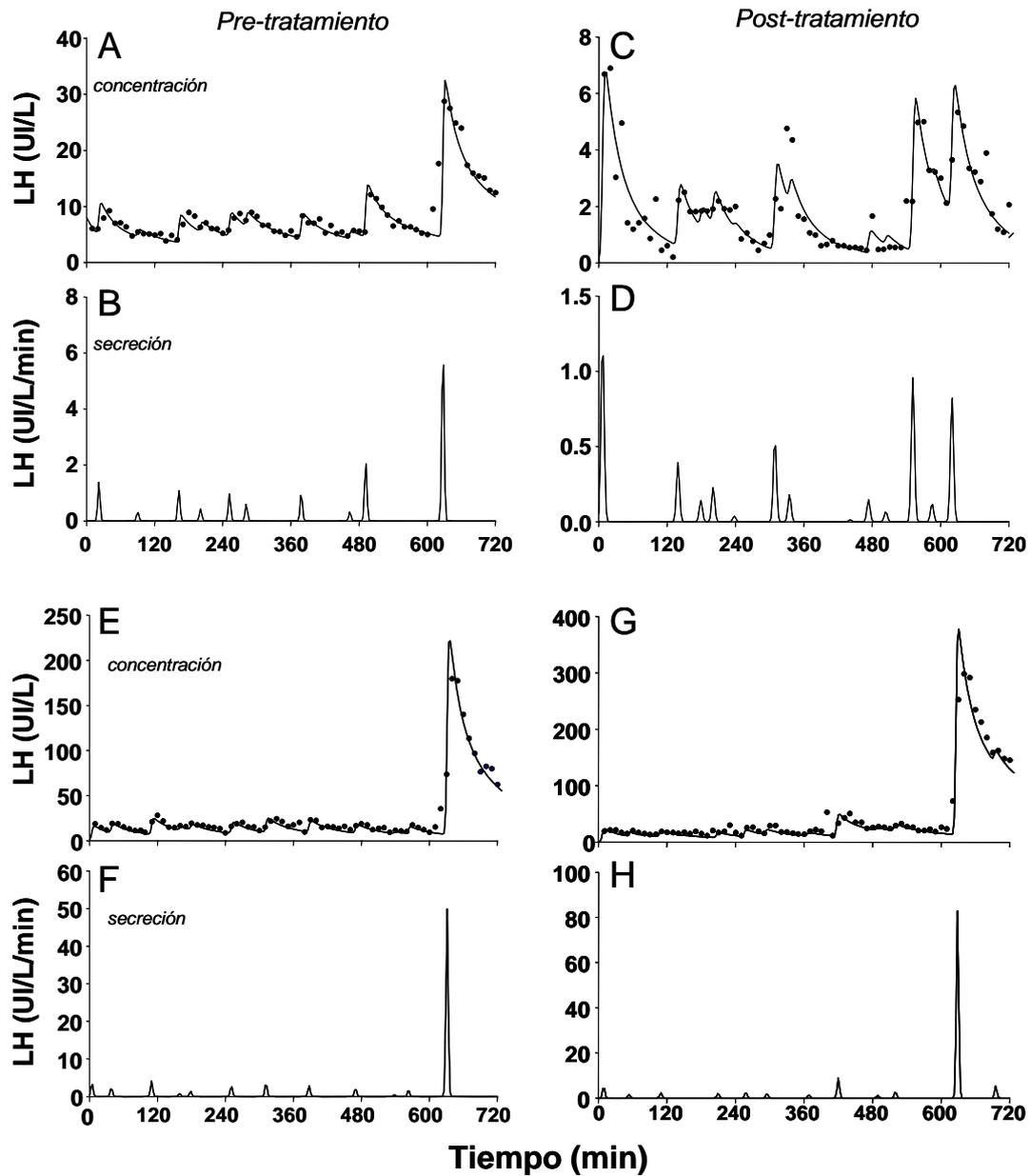


Figura 4. Perfiles de concentración de LH inmunoreactiva (A, C, E y G) y tasas de secreción de LH resueltas por análisis de deconvolución (B, D, F y H) en 2 pacientes con SOP antes (gráficas a la izquierda) y después (gráficas a la derecha) de tratamiento con 1.5 g de metformin diarios. A a D, muestran los patrones en una paciente clasificada como respondedora; E a H, muestran los patrones en una paciente no respondedora.

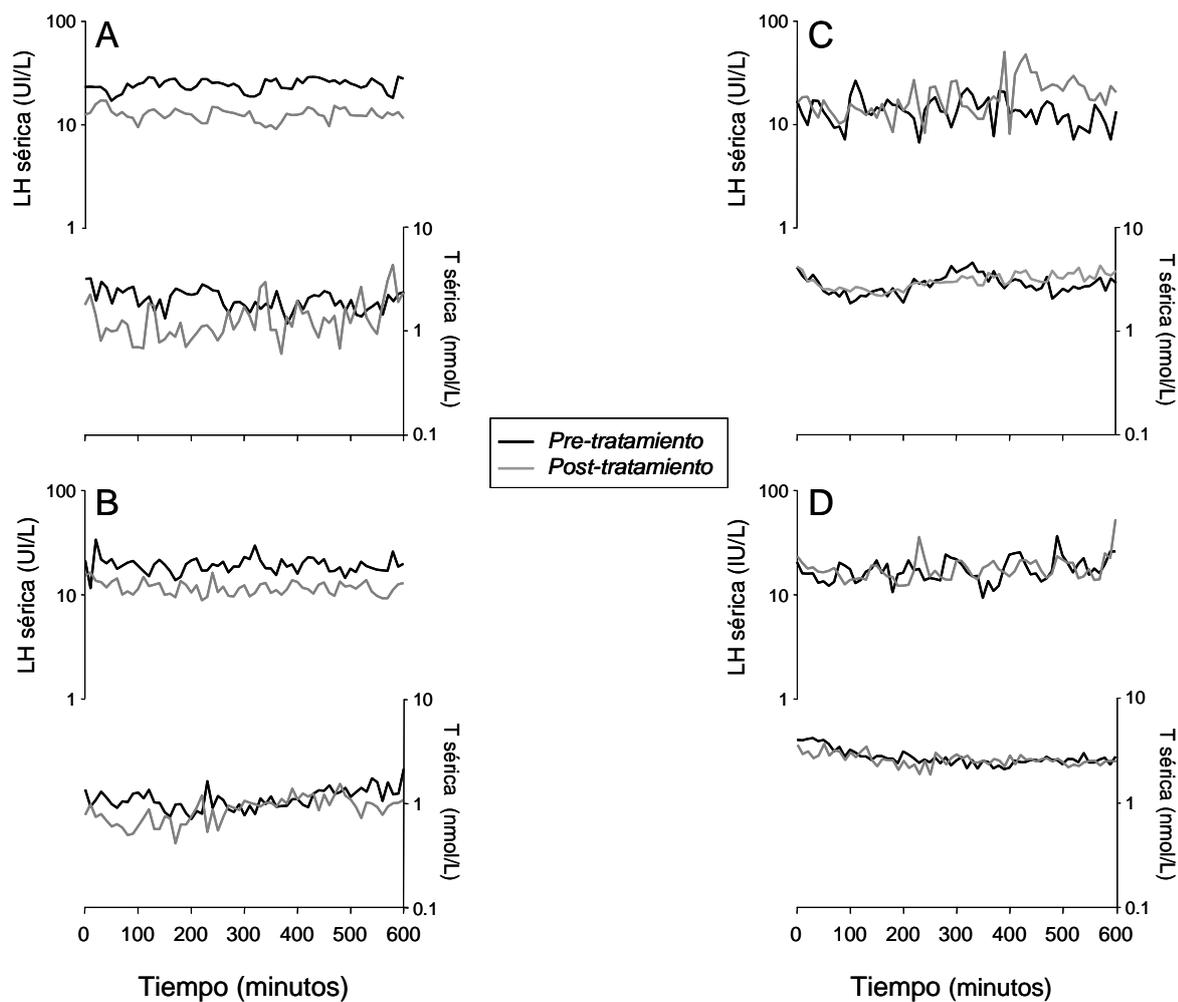
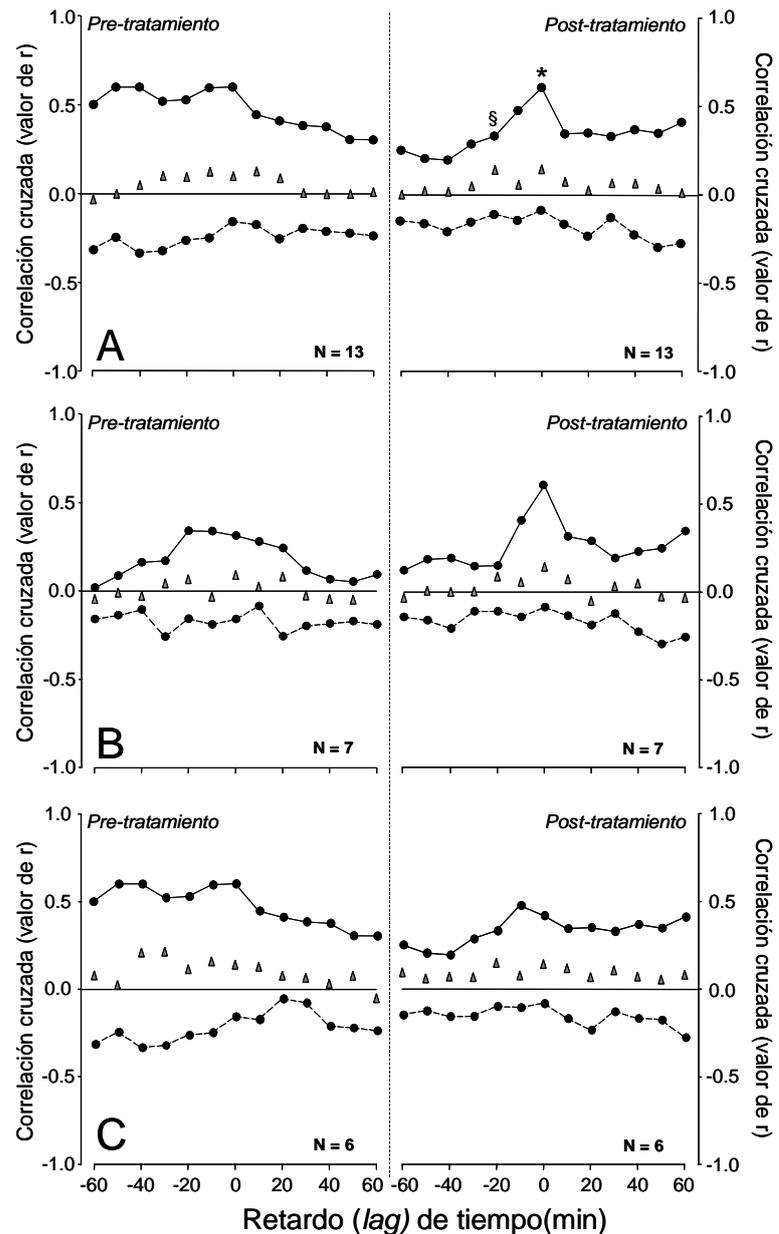


Figura 5. Patrones ilustrativos de las concentraciones de LH y testosterona durante 10 horas en 4 mujeres con SOP, antes (líneas negras) y después (líneas grises) de tratamiento con metformina. **A** y **B** muestran los patrones en 2 pacientes clasificadas como respondedoras, en tanto que **C** y **D** muestran los patrones en 2 mujeres no respondedoras.

Se aplicó el análisis de correlación cruzada para evaluar la relación lineal bivariada (con retardo en el tiempo) en la secreción hormonal. Los resultados se resumen en la figura 6. Cuando se analizaron las muestras seriadas de mujeres con SOP, ya sea agrupadas en un solo grupo o en grupos separados (respondedoras y no respondedoras) no se detectaron asociaciones significativas entre las concentraciones en suero de LH y testosterona en condiciones basales (o sea, antes del tratamiento con metformina). Después del tratamiento, las concentraciones de LH y testosterona se correlacionaron negativamente a intervalos (retardos) de tiempo de 0-20 minutos [o sea, la LH se incrementó (o disminuyó) 0-20 minutos después de que la concentración de testosterona disminuyó (o se incrementó) recíprocamente]. A pesar de que el poder del estudio fue suficiente para demostrar la

significancia estadística de esta relación en retroalimentación negativa únicamente cuando se consideró al grupo de mujeres con SOP como un todo, el perfil de correlación cruzada mostrado por las mujeres con SOP que respondieron a la metformina (Fig.6B) sugiere fuertemente que la significancia de la correlación encontrada ocurrió a expensas de los cambios presentado por este grupo.

Figura 6. Mediana (\pm rango absoluto) de los coeficientes de correlación cruzada (valores de r en los ejes y) en función de varios tiempos de retardo (la g en los ejes x , que es el tiempo en minutos que separa las concentraciones hormonales sucesivamente correlacionadas) en 13 mujeres con SOP (**A**), y en pacientes clasificadas como respondedoras (**B**) o no respondedoras (**C**), antes (gráficas a la izquierda) y después (gráficas a la derecha) de tratamiento con metformina. El análisis de correlación cruzada se aplicó a los perfiles de concentraciones pareados de LH-testosterona. Los símbolos en varios intervalos en la gráfica **A** reflejan la significancia estadística del coeficiente de correlación del grupo en este intervalo en particular ($^{\S}p=0.021$; *, $p=0.018$).



Discusión

El SOP se caracteriza por la secreción inadecuada de las gonadotropinas hipofisarias, con una secreción aumentada de LH y concentraciones disminuidas de FSH. La secreción aumentada de LH ocurre a expensas de un incremento tanto en la frecuencia como la amplitud de los pulsos de LH.^{31,34-40,90} A pesar de que el mecanismo responsable de la secreción aumentada de LH no es claro, se ha propuesto a la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia compensatoria (presentes tanto en mujeres delgadas como obesas con SOP) como un mecanismo potencial para las anomalías neurosecretorias características de este síndrome.^{28,29,91-95} Sin embargo, diversos estudios que han utilizado hipoglucemiantes orales para corregir este defecto, han encontrado resultados contradictorios. En algunos de éstos se encontró una disminución importante de las concentraciones séricas de LH después del tratamiento con agentes sensibilizadores de la insulina,^{15-17,55,71,95} mientras que en otros no se documentaron cambios en la liberación basal de LH ni en la respuesta de LH a la estimulación con GnRH exógeno en respuesta al tratamiento.^{62,73,96-98} Por ejemplo, Metha y colaboradores informaron que la administración de pioglitazona durante 20 semanas a mujeres obesas con SOP e hiperinsulinemia no modificó las concentraciones medias de LH, la frecuencia o amplitud de los pulsos de LH, ni la respuesta de esta gonadotropina al GnRH exógeno,⁹⁹ mientras que en otro estudio la administración de metformina durante 6 meses restableció a la normalidad tanto la secreción episódica espontánea de LH como la función ovárica en mujeres con SOP no obesas y normoinsulinémicas.¹⁶ A pesar de que las diferencias en el IMC podrían explicar estas discrepancias⁷² se ha demostrado que las mujeres obesas y no obesas con SOP no representan un subtipo patofisiológico diferente de esta enfermedad, sino más bien un espectro continuo de anomalías en las gonadotropinas que varía con la grasa corporal.^{31,40,100} En las mujeres con SOP estudiadas en el proyecto de investigación desarrollado, tanto la frecuencia como la amplitud de los pulsos de LH se incrementaron uniformemente cuando se comparan con aquellos informados previamente en mujeres normales estudiadas en la fase folicular del ciclo menstrual.^{101,102} En esta población de mujeres con SOP resistentes a la insulina, en la que predominó el sobrepeso, la administración de metformina durante 3 meses permitió la identificación de 2 subtipos de pacientes: uno en la que la metformina fue marcadamente efectiva para disminuir tanto la secreción espontánea (basal) de LH como la estimulada con GnRH, y otro en el que el tratamiento fue totalmente inefectivo en la modificación de las anomalías secretorias de LH y en la respuesta hipofisaria a la administración de GnRH exógena. Es más, en el grupo respondedor a la

metformina, los cambios en la función neuroendocrina ocurrieron en presencia de un cociente glucosa/insulina persistentemente bajo (este cociente es una medida útil de la sensibilidad a la insulina en las mujeres con SOP).^{60,103} Este último hallazgo (que podría esperarse considerando los resultados variables sobre la resistencia a la insulina encontrados con el uso de esta droga en particular en mujeres delgadas u obesas con SOP^{55,62,72,73,96,97} indica que la corrección de la secreción inapropiada de LH y la respuesta al GnRH exógeno presentada por el grupo respondedor, no se relacionó con la mejoría en la respuesta de la insulina y/o de la hiperinsulinemia al tratamiento. Los hallazgos presentados difieren de aquellos informados por Eagleson y colaboradores⁹⁸ los cuales encontraron un incremento marcado en la concentración media de LH y de la amplitud de sus pulsos posterior a la administración de metformina durante 4 semanas en algunas (mas no en todas) mujeres con SOP. Este hallazgo contradictorio no es totalmente claro y las diferencias podrían ser debidas a variaciones en el tiempo del estudio, grado de obesidad y/o duración del tratamiento. De hecho, Genazzani y colaboradores¹⁶ encontraron que la administración de metformina durante 6 meses restauró a la normalidad la secreción episódica de LH en mujeres con SOP no obesas ni insulino-resistentes.

La disparidad en la respuesta de LH a la metformina en las mujeres con SOP estudiadas, es aparentemente contradictoria. Debe considerarse, sin embargo, que las mujeres con SOP refractarias al tratamiento con metformina presentaron cocientes LH/FSH, así como concentraciones basales de androstenediona, testosterona total, índice testosterona/SHBG y 17-OHP mayores, y concentraciones de SHBG menores que las mujeres en el grupo respondedor. Además, las mujeres del grupo respondedor presentaron una reducción modesta pero significativa ($p < 0.05$) de las concentraciones en suero de testosterona como resultado de la exposición a la metformina. En este subgrupo de mujeres con SOP, la menor exposición a andrógenos a nivel hipotalámico e hipofisario pudo haber facilitado la disminución en las concentraciones medias de LH y en la sensibilidad hipofisaria al GnRH *endógeno* en respuesta al tratamiento con metformina. Siguiendo esta línea, también fue interesante encontrar que las pacientes respondedoras a metformina mostraron así mismo una disminución significativa ($p < 0.05$) en la respuesta máxima de LH al GnRH exógeno, la cual no se relacionó con la reducción en las concentraciones de la LH previas a la administración del péptido liberador, ya que el cambio porcentual con respecto a las basales también difirió entre los estados de pre-tratamiento y post-tratamiento.

Debido a que los efectos de la metformina en la función hipotálamo-hipofisaria de las pacientes con SOP respondedoras a la metformina no se correlacionó con una mejoría en la resistencia a la insulina o en la hiperinsulinemia compensatoria (o con pérdida de peso durante el tiempo del estudio), parecería razonable identificar a la unidad hipotálamo-hipofisaria y/o al ovario como potenciales blancos de la acción de la metformina. A nivel hipotálamo-hipofisario, la metformina podría influenciar la actividad de uno o más factores que controlan directa o indirectamente la fuerza del impulso hipotalámico de GnRH y/o la síntesis de LH,¹⁰⁴⁻¹⁰⁸ y consecuentemente atenuar la señal secretora dependiente de GnRH, la liberación de LH y la producción de testosterona. La posibilidad de que la unidad hipotálamo-hipofisaria pueda representar un blanco de la acción de la metformina se apoya en un estudio reciente en el que la administración de esta droga a pacientes con hipotiroidismo primario suprimió las concentraciones en suero de la hormona estimulante de tiroides.^{109,110} La observación de que el tratamiento con metformin no modificó la frecuencia de los pulsos de LH en el grupo respondedor y que el análisis por deconvolución documentó una marcada reducción en la masa de LH secretada después de la infusión del GnRH exógeno, indican que el gonadotropo podría ser el blanco de los efectos del tratamiento con metformina en la liberación de LH. Estos hallazgos sugieren además la existencia de un defecto hipotalámico intrínseco (y autónomo) como factor potencial adicional en la secreción inapropiada de gonadotropinas en el SOP. Alternativamente, la metformina podría actuar directamente en el ovario y así atenuar la biosíntesis de testosterona, con la consecuente reducción en la exposición hipotalámica y/o hipofisaria a los andrógenos y la corrección de la secreción inapropiada de LH. En este escenario, la reducción del sustrato androgénico para la enzima aromatasas, tanto a nivel ovárico como hipofisario, podría contribuir adicionalmente a la disminución en la secreción de LH inducida por GnRH.¹¹¹ Esta posibilidad es consistente con estudios in-vitro e in-vivo que indican que la metformina puede actuar directamente en el ovario inhibiendo la producción de andrógenos en las células de la teca,¹¹⁰ así como atenuar la actividad del citocromo P450c17 α inducido por el estímulo gonadotrópico.¹¹²

Algunos estudios han demostrado que la liberación de LH, tanto basal como inducida por el GnRH, no se afectan por el tratamiento con metformina.⁹⁸ Consistente con estas observaciones, en el presente estudio se encontró que un subgrupo de mujeres obesas con SOP fue completamente refractario al tratamiento con esta droga, a pesar de presentar un fenotipo similar al subgrupo de pacientes que respondieron al tratamiento. Diferencias en la concentración y/o acción de otros reguladores del eje reproductor (como la leptina, por

ejemplo), en el tiempo de depuración periférica de la metformina y en la gravedad de la enfermedad, podrían haber influido también en las diferentes respuestas a la metformina encontradas en la población de mujeres con SOP estudiada. A este respecto, se han identificado recientemente numerosos genes involucrados en una serie de funciones biológicas que son expresados diferencialmente en ovarios normales y poliquísticos,^{26,113,114} lo que apoya la posibilidad de que existan subtipos de pacientes con SOP que difieran entre sí en el grado de alteración en la expresión de ciertos genes. La existencia de diferentes “signos” moleculares en subgrupos de mujeres con SOP explican razonablemente la amplia heterogeneidad genética, clínica y bioquímica característica de esta compleja enfermedad¹¹⁵ y, consecuentemente, la variedad de respuestas a estrategias terapéuticas similares o idénticas.

Un estudio previo en adolescentes con SOP documentó una disrupción prominente en la sincronía de la secreción bihormonal de LH y testosterona.¹¹⁶ Este estudio detectó una pérdida de la retroalimentación en ambos sentidos entre LH y testosterona. Se han propuesto varias características patofisiológicas del SOP (incluyendo la falla de la progesterona para controlar negativamente la secreción pulsátil de LH, el estímulo excesivo de LH, y la pérdida de la capacidad de la unidad hipotálamo-hipofisaria para responder a las concentraciones aumentadas de andrógenos biodisponibles) como responsables de las anomalías en el retrocontrol LH-testosterona-LH en esta enfermedad.¹⁰⁷ Los resultados del presente estudio sugieren que la disminución en la secreción coordinada de LH y testosterona que presentan las adolescentes con SOP puede persistir hasta la edad adulta; adicionalmente, el estudio demuestra que el tratamiento con metformina puede restablecer la normalidad del retrocontrol de la testosterona (o de su producto aromatizado) sobre la tasa de secreción de LH por -20 a 0 minutos. Este hallazgo sugiere que la secreción relativamente autónoma de LH (menos dependiente de retroalimentación negativa) que prevalece en el SOP es susceptible de corregirse parcialmente mediante la administración de esta droga en un subgrupo particular de pacientes.¹¹⁶

Consistente con estudios previos que han utilizado bioensayos heterólogos in-vitro para evaluar la bioactividad de la LH circulante,¹¹⁷ el bioensayo homólogo empleado en el presente estudio mostró valores elevados de LH bioactiva en condiciones basales y estimuladas por el GnRH exógeno en mujeres con SOP, las cuales no se modificaron con la administración de metformina en ninguno de los grupos estudiados. El aumento en la bioactividad de LH en el SOP se ha atribuido a la alteración que en el microambiente hipofisario ejercen las hormonas

esteroides sexuales¹¹⁸ y/o la hiperinsulinemia.¹¹⁹ Este incremento en la potencia biológica de LH a nivel de su célula blanco, podría ser un factor adicional para la producción excesiva de andrógenos en la mujer con SOP. Es posible que la atenuación en las concentraciones de testosterona observado en el grupo respondedor, aunque suficiente para alterar la dinámica secretora de LH, no haya sido de la magnitud requerida para modificar la glicosilación de la gonadotropina, que es un determinante importante tanto para la vida media como para la potencia de la gonadotropina a nivel de su órgano blanco.¹¹⁷ Alternativamente, la hiperinsulinemia persistente pudo haber oscurecido el efecto de los cambios en el medio ambiente de esteroides sexuales provocado por la metformina, en la síntesis de LH bioactiva y/o en su liberación.

En resumen, en un subgrupo de mujeres con SOP, la administración de metformina durante 3 meses disminuyó tanto la secreción espontánea de LH como la estimulada por GnRH exógeno, así como las concentraciones basales de testosterona, permitiendo el restablecimiento del retrocontrol de los esteroides ováricos en la dinámica de secreción de LH, sin alterar la frecuencia de sus pulsos ni la potencia biológica de la gonadotropina. Ya que la restauración parcial de la secreción inapropiada de LH que resultó de la exposición a metformina ocurrió en ausencia de cambios detectables en la sensibilidad a la insulina, es posible que los efectos de esta droga hayan sido el resultado de acciones directas o indirectas en la hipófisis, el compartimiento de células teca del ovario, o en ambas. Se requieren de estudios adicionales para identificar con mayor precisión el o los factores de los que depende la respuesta a metformina en el SOP, así como los subgrupos de pacientes que se pueden beneficiar con este medicamento en particular.

REFERENCIAS

1. Ulloa-Aguirre A, Timossi C. Biochemical and functional aspects of gonadotrophin-releasing hormone and gonadotrophins. *Reprod Biomed Online* 2000;**1**(2):48-62.
2. Conn PM, Crowley WF, Jr. Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. *N Engl J Med* 1991;**324**(2):93-103.
3. Conn PM, Janovick JA, Stanislaus D, Kuphal D, Jennes L. Molecular and cellular bases of gonadotropin-releasing hormone action in the pituitary and central nervous system. *Vitam Horm* 1995;**50**:151-214.
4. Dobbs KE, Dumesic DA, Dumesic JA, Shapiro SS. Differences in serum follicle-stimulating hormone uptake after intramuscular and subcutaneous human menopausal gonadotropin injection. *Fertil Steril* 1994;**62**(5):978-83.
5. Filicori M, Campaniello E, Michelacci L, et al. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) analog suppression renders polycystic ovarian disease patients more susceptible to ovulation induction with pulsatile GnRH. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;**66**(2):327-33.
6. Hillier SG. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Hum Reprod* 1994;**9**(2):188-91.
7. LaPolt PS, Nishimori K, Fares FA, Perlas E, Boime I, Hsueh AJ. Enhanced stimulation of follicle maturation and ovulatory potential by long acting follicle-stimulating hormone agonists with extended carboxyl-terminal peptides. *Endocrinology* 1992;**131**(6):2514-20.
8. le Cotonnec JY, Porchet HC, Beltrami V, Khan A, Toon S, Rowland M. Clinical pharmacology of recombinant human follicle-stimulating hormone (FSH). I. Comparative pharmacokinetics with urinary human FSH. *Fertil Steril* 1994;**61**(4):669-78.
9. le Cotonnec JY, Porchet HC, Beltrami V, Munafo A. Clinical pharmacology of recombinant human luteinizing hormone: Part II. Bioavailability of recombinant human luteinizing hormone assessed with an immunoassay and an in vitro bioassay. *Fertil Steril* 1998;**69**(2):195-200.
10. le Cotonnec JY, Porchet HC, Beltrami V, Munafo A. Clinical pharmacology of recombinant human luteinizing hormone: Part I. Pharmacokinetics after intravenous administration to healthy female volunteers and comparison with urinary human luteinizing hormone. *Fertil Steril* 1998;**69**(2):189-94.
11. Porchet HC, le Cotonnec JY, Loumaye E. Clinical pharmacology of recombinant human follicle-stimulating hormone. III. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling after repeated subcutaneous administration. *Fertil Steril* 1994;**61**(4):687-95.
12. Kriplani A, Agarwal N. Effects of metformin on clinical and biochemical parameters in polycystic ovary syndrome. *J Reprod Med* 2004;**49**(5):361-7.
13. Hoeger KM, Guzick DS. Review: metformin used alone or combined with clomifene may improve ovulation rates in the polycystic ovary syndrome. *ACP J Club* 2004;**140**(3):75.
14. Glueck CJ, Goldenberg N, Wang P, Loftspring M, Sherman A. Metformin during pregnancy reduces insulin, insulin resistance, insulin secretion, weight, testosterone and development of gestational diabetes: prospective longitudinal assessment of women with polycystic ovary syndrome from preconception throughout pregnancy. *Hum Reprod* 2004;**19**(3):510-21.
15. Velazquez EM, Mendoza S, Hamer T, Sosa F, Glueck CJ. Metformin therapy in polycystic ovary syndrome reduces hyperinsulinemia, insulin resistance,

- hyperandrogenemia, and systolic blood pressure, while facilitating normal menses and pregnancy. *Metabolism* 1994;**43**(5):647-54.
16. Genazzani AD, Battaglia C, Malavasi B, Strucchi C, Tortolani F, Gamba O. Metformin administration modulates and restores luteinizing hormone spontaneous episodic secretion and ovarian function in nonobese patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004;**81**(1):114-9.
 17. Barbieri RL. Metformin for the treatment of polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol* 2003;**101**(4):785-93.
 18. Barbieri RL, Gargiulo AR. Metformin for the treatment of the polycystic ovary syndrome. *Minerva Ginecol* 2004;**56**(1):63-79.
 19. Stein IF, Leventhal ML. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol* 1935;**29**:181.
 20. 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**(9):3078-82.
 21. Goldzieher JW, Young RL. Selected aspects of polycystic ovarian disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1992;**21**(1):141-71.
 22. Dunaif A. Hyperandrogenic anovulation (PCOS): a unique disorder of insulin action associated with an increased risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Med* 1995;**98**(1A):33S-39S.
 23. Tsilchorozidou T, Overton C, Conway GS. The pathophysiology of polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;**60**(1):1-17.
 24. 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**(6):2745-9.
 25. Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 2005;**352**(12):1223-36.
 26. Escobar-Morreale HF, Luque-Ramirez M, San Millan JL. The molecular-genetic basis of functional hyperandrogenism and the polycystic ovary syndrome. *Endocr Rev* 2005;**26**(2):251-82.
 27. Strauss JF, 3rd, Dunaif A. Molecular mysteries of polycystic ovary syndrome. *Mol Endocrinol* 1999;**13**(6):800-5.
 28. Legro RS, Kunesman AR, Dunaif A. Prevalence and predictors of dyslipidemia in women with polycystic ovary syndrome. *Am J Med* 2001;**111**(8):607-13.
 29. Paradisi G, Steinberg HO, Hempfling A, et al. Polycystic ovary syndrome is associated with endothelial dysfunction. *Circulation* 2001;**103**(10):1410-5.
 30. Franks S. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1995;**333**(13):853-61.
 31. Morales AJ, Laughlin GA, Butzow T, Maheshwari H, Baumann G, Yen SS. Insulin, somatotrophic, and luteinizing hormone axes in lean and obese women with polycystic ovary syndrome: common and distinct features. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;**81**(8):2854-64.
 32. Kazer RR, Kessel B, Yen SS. Circulating luteinizing hormone pulse frequency in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;**65**(2):233-6.
 33. Berga SL, Daniels TL. Can polycystic ovary syndrome exist without concomitant hypothalamic dysfunction? *Semin Reprod Endocrinol* 1997;**15**(2):169-75.
 34. 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**(4):435-42.
 35. Burger CW, Korsen T, van Kessel H, van Dop PA, Caron FJ, Schoemaker J. Pulsatile luteinizing hormone patterns in the follicular phase of the menstrual cycle, polycystic

- ovarian disease (PCOD) and non-PCOD secondary amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;**61**(6):1126-32.
36. 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**(5):1320-9.
 37. Venturoli S, Porcu E, Fabbri R, et al. Episodic pulsatile secretion of FSH, LH, prolactin, oestradiol, oestrone, and LH circadian variations in polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1988;**28**(1):93-107.
 38. Berga SL, Guzik DS, Winters SJ. Increased luteinizing hormone and alpha-subunit secretion in women with hyperandrogenic anovulation. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;**77**(4):895-901.
 39. Arroyo A, Laughlin GA, Morales AJ, Yen SS. Inappropriate gonadotropin secretion in polycystic ovary syndrome: influence of adiposity. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;**82**(11):3728-33.
 40. Taylor AE, McCourt B, Martin KA, et al. Determinants of abnormal gonadotropin secretion in clinically defined women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;**82**(7):2248-56.
 41. Ehrmann DA, Rosenfield RL, Barnes RB, Brigell DF, Sheikh Z. Detection of functional ovarian hyperandrogenism in women with androgen excess. *N Engl J Med* 1992;**327**(3):157-62.
 42. Barnes RB, Rosenfield RL, Burstein S, Ehrmann DA. Pituitary-ovarian responses to nafarelin testing in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1989;**320**(9):559-65.
 43. White D, Leigh A, Wilson C, Donaldson A, Franks S. Gonadotrophin and gonadal steroid response to a single dose of a long-acting agonist of gonadotrophin-releasing hormone in ovulatory and anovulatory women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995;**42**(5):475-81.
 44. Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL. Polycystic ovary syndrome as a form of functional ovarian hyperandrogenism due to dysregulation of androgen secretion. *Endocr Rev* 1995;**16**(3):322-53.
 45. Yen SS. The polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1980;**12**(2):177-207.
 46. Vrbikova J, Bendlova B, Hill M, Vankova M, Vondra K, Starka L. Insulin sensitivity and beta-cell function in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care* 2002;**25**(7):1217-22.
 47. Vrbikova J, Cibula D, Dvorakova K, et al. Insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;**89**(6):2942-5.
 48. Cheang KI, Nestler JE. Should insulin-sensitizing drugs be used in the treatment of polycystic ovary syndrome? *Reprod Biomed Online* 2004;**8**(4):440-7.
 49. Poretsky L, Piper B. Insulin resistance, hypersecretion of LH, and a dual-defect hypothesis for the pathogenesis of polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol* 1994;**84**(4):613-21.
 50. Garcia-Rudaz MC, Ropelato MG, Escobar ME, Veldhuis JD, Barontini M. Augmented frequency and mass of LH discharged per burst are accompanied by marked disorderliness of LH secretion in adolescents with polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* 1998;**139**(6):621-30.
 51. Ropelato MG, Garcia-Rudaz MC, Castro-Fernandez C, et al. A preponderance of basic luteinizing hormone (LH) isoforms accompanies inappropriate hypersecretion of both basal and pulsatile LH in adolescents with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;**84**(12):4629-36.
 52. Patel K, Coffler MS, Dahan MH, Malcom PJ, Deutsch R, Chang RJ. Relationship of GnRH-stimulated LH release to episodic LH secretion and baseline endocrine-

- metabolic measures in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;**60**(1):67-74.
53. Kim LH, Taylor AE, Barbieri RL. Insulin sensitizers and polycystic ovary syndrome: can a diabetes medication treat infertility? *Fertil Steril* 2000;**73**(6):1097-8.
 54. Pugeat M, Ducluzeau PH. Insulin resistance, polycystic ovary syndrome and metformin. *Drugs* 1999;**58 Suppl 1**:41-6; discussion 75-82.
 55. Pirwany IR, Yates RW, Cameron IT, Fleming R. Effects of the insulin sensitizing drug metformin on ovarian function, follicular growth and ovulation rate in obese women with oligomenorrhoea. *Hum Reprod* 1999;**14**(12):2963-8.
 56. Arthur LS, Selvakumar R, Seshadri MS, Seshadri L. Hyperinsulinemia in polycystic ovary disease. *J Reprod Med* 1999;**44**(9):783-7.
 57. Crave JC, Fimbel S, Lejeune H, Cugnardey N, Dechaud H, Pugeat M. Effects of diet and metformin administration on sex hormone-binding globulin, androgens, and insulin in hirsute and obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;**80**(7):2057-62.
 58. Kirpichnikov D, McFarlane SI, Sowers JR. Metformin: an update. *Ann Intern Med* 2002;**137**(1):25-33.
 59. Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, Dobrjansky A. Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 1989;**38**(9):1165-74.
 60. Legro RS, Finegood D, Dunaif A. A fasting glucose to insulin ratio is a useful measure of insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;**83**(8):2694-8.
 61. Harborne L, Fleming R, Lyall H, Norman J, Sattar N. Descriptive review of the evidence for the use of metformin in polycystic ovary syndrome. *Lancet* 2003;**361**(9372):1894-901.
 62. Moghetti P, Castello R, Negri C, et al. Metformin effects on clinical features, endocrine and metabolic profiles, and insulin sensitivity in polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled 6-month trial, followed by open, long-term clinical evaluation. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;**85**(1):139-46.
 63. Lord JM, Flight IH, Norman RJ. Metformin in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *Bmj* 2003;**327**(7421):951-3.
 64. Glueck CJ, Wang P, Fontaine R, Tracy T, Sieve-Smith L. Metformin-induced resumption of normal menses in 39 of 43 (91%) previously amenorrhoeic women with the polycystic ovary syndrome. *Metabolism* 1999;**48**(4):511-9.
 65. Nestler JE. Polycystic ovary syndrome: a disorder for the generalist. *Fertil Steril* 1998;**70**(5):811-2.
 66. Nestler JE, Jakubowicz DJ, Evans WS, Pasquali R. Effects of metformin on spontaneous and clomiphene-induced ovulation in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1998;**338**(26):1876-80.
 67. De Leo V, la Marca A, Ditto A, Morgante G, Cianci A. Effects of metformin on gonadotropin-induced ovulation in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 1999;**72**(2):282-5.
 68. Batukan C, Baysal B. Metformin improves ovulation and pregnancy rates in patients with polycystic ovary syndrome. *Arch Gynecol Obstet* 2001;**265**(3):124-7.
 69. Parsanezhad ME, Alborzi S, Zarei A, Dehbashi S, Omrani G. Insulin resistance in clomiphene responders and non-responders with polycystic ovarian disease and therapeutic effects of metformin. *Int J Gynaecol Obstet* 2001;**75**(1):43-50.
 70. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod* 2004;**19**(1):41-7.

71. Kolodziejczyk B, Duleba AJ, Spaczynski RZ, Pawelczyk L. Metformin therapy decreases hyperandrogenism and hyperinsulinemia in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2000;**73**(6):1149-54.
72. Maciel GA, Soares Junior JM, Alves da Motta EL, Abi Haidar M, de Lima GR, Baracat EC. Nonobese women with polycystic ovary syndrome respond better than obese women to treatment with metformin. *Fertil Steril* 2004;**81**(2):355-60.
73. Ehrmann DA, Cavaghan MK, Imperial J, Sturis J, Rosenfield RL, Polonsky KS. Effects of metformin on insulin secretion, insulin action, and ovarian steroidogenesis in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;**82**(2):524-30.
74. Velazquez EM, Mendoza SG, Wang P, Glueck CJ. Metformin therapy is associated with a decrease in plasma plasminogen activator inhibitor-1, lipoprotein(a), and immunoreactive insulin levels in patients with the polycystic ovary syndrome. *Metabolism* 1997;**46**(4):454-7.
75. Castro-Fernandez C, Olivares A, Soderlund D, et al. A preponderance of circulating basic isoforms is associated with decreased plasma half-life and biological to immunological ratio of gonadotropin-releasing hormone-releasable luteinizing hormone in obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;**85**(12):4603-10.
76. Lopez-Alvarenga JC, Zarinan T, Olivares A, Gonzalez-Barranco J, Veldhuis JD, Ulloa-Aguirre A. Poorly controlled type I diabetes mellitus in young men selectively suppresses luteinizing hormone secretory burst mass. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;**87**(12):5507-15.
77. Zarinan T, Olivares A, Soderlund D, Mendez JP, Ulloa-Aguirre A. Changes in the biological:immunological ratio of basal and GnRH-releasable FSH during the follicular, pre-ovulatory and luteal phases of the human menstrual cycle. *Hum Reprod* 2001;**16**(8):1611-8.
78. Aguilar-Salinas CA, Rojas R, Gomez-Perez FJ, et al. Prevalence and characteristics of early-onset type 2 diabetes in Mexico. *Am J Med* 2002;**113**(7):569-74.
79. Zambrano E, Zarinan T, Olivares A, Barrios-de-Tomasi J, Ulloa-Aguirre A. Receptor binding activity and in vitro biological activity of the human FSH charge isoforms as disclosed by heterologous and homologous assay systems: implications for the structure-function relationship of the FSH variants. *Endocrine* 1999;**10**(2):113-21.
80. Veldhuis JD, Johnson ML. Cluster analysis: a simple, versatile, and robust algorithm for endocrine pulse detection. *Am J Physiol* 1986;**250**(4 Pt 1):E486-93.
81. Veldhuis JD, Johnson ML. Deconvolution analysis of hormone data. *Methods Enzymol* 1992;**210**:539-75.
82. Keenan DM, Alexander S, Irvine CH, et al. Reconstruction of in vivo time-evolving neuroendocrine dose-response properties unveils admixed deterministic and stochastic elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;**101**(17):6740-5.
83. Pincus SM. Approximate entropy as a measure of system complexity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1991;**88**:2297-2301.
84. Keenan D, Sun W, Veldhuis J. A stochastic biomathematical model of the male reproductive hormone system. *SIAM Journal on Applied Mathematics* 2000;**61**:934-965.
85. Veldhuis JD, Johnson ML, Veldhuis OL, Straume M, Pincus SM. Impact of pulsatility on the ensemble orderliness (approximate entropy) of neurohormone secretion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;**281**(6):R1975-85.
86. Veldhuis JD, Straume M, Iranmanesh A, et al. Secretory process regularity monitors neuroendocrine feedback and feedforward signaling strength in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;**280**(3):R721-9.

87. Veldhuis J, Johnson M, Faunt L. Assessing temporal coupling between two, or among three or more, neuroendocrine pulse trains: cross-correlation analysis, simulation methods, and conditional probability testing. *Methods in Neuroscience* 1994;**20**:336-376.
88. Mulligan T, Iranmanesh A, Johnson ML, Straume M, Veldhuis JD. Aging alters feed-forward and feedback linkages between LH and testosterone in healthy men. *Am J Physiol* 1997;**273**(4 Pt 2):R1407-13.
89. Pincus SM, Veldhuis JD, Mulligan T, Iranmanesh A, Evans WS. Effects of age on the irregularity of LH and FSH serum concentrations in women and men. *Am J Physiol* 1997;**273**(5 Pt 1):E989-95.
90. Garcia-Rudaz C, Armando I, Levin G, Escobar ME, Barontini M. Peripheral catecholamine alterations in adolescents with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998;**49**(2):221-8.
91. 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**(8):599-604.
92. Dahlgren E, Janson PO. Polycystic ovary syndrome--long-term metabolic consequences. *Int J Gynaecol Obstet* 1994;**44**(1):3-8.
93. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* 1997;**18**(6):774-800.
94. Ehrmann DA. Insulin-lowering therapeutic modalities for polycystic ovary syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1999;**28**(2):423-38, viii.
95. Fleming R. Recruitment prior to ovarian stimulation: ways of improving follicular recruitment. *Reproductive BioMedicine Online* 2005;**10**(55-59).
96. Morin-Papunen LC, Koivunen RM, Ruokonen A, Martikainen HK. Metformin therapy improves the menstrual pattern with minimal endocrine and metabolic effects in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 1998;**69**(4):691-6.
97. Hung YNE, Ming SWA, Kung HP. Effects of metformin on ovulation rate, hormonal and metabolic profiles in women with clomiphene-resistant polycystic ovaries: a randomized, doubleblinded placebo-controlled trial. *Human Reproduction* 2001;**16**:1625-1631.
98. 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**(11):5158-62.
99. Mehta RV, Patel KS, Coffler MS, et al. Luteinizing hormone secretion is not influenced by insulin infusion in women with polycystic ovary syndrome despite improved insulin sensitivity during pioglitazone treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;**90**(4):2136-41.
100. Legro RS. Insulin resistance in polycystic ovary syndrome: treating a phenotype without a genotype. *Mol Cell Endocrinol* 1998;**145**(1-2):103-10.
101. Evans WS, Sollenberger MJ, Booth RA, Jr., et al. Contemporary aspects of discrete peak-detection algorithms. II. The paradigm of the luteinizing hormone pulse signal in women. *Endocr Rev* 1992;**13**(1):81-104.
102. South SA, Asplin CM, Carlsen EC, et al. Alterations in luteinizing hormone secretory activity in women with insulin-dependent diabetes mellitus and secondary amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;**76**(4):1048-53.

103. Parra A, Ramirez A, Espinosa de los Monteros A. Fasting glucose/insulin ratio. An index to differentiate normo from hyperinsulinemic women with polycystic ovary syndrome. *Rev Invest Clin* 1994;**46**(5):363-8.
104. Morin-Papunen LC, Koivunen RM, Tomas C, Ruukonen A, Martikainen HK. Decreased serum leptin concentrations during metformin therapy in obese women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;**83**(7):2566-8.
105. Berga SL, Yen SS. Opioidergic regulation of LH pulsatility in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1989;**30**(2):177-84.
106. Spritzer PM, Poy M, Wiltgen D, Mylius LS, Capp E. Leptin concentrations in hirsute women with polycystic ovary syndrome or idiopathic hirsutism: influence on LH and relationship with hormonal, metabolic, and anthropometric measurements. *Hum Reprod* 2001;**16**(7):1340-6.
107. Veldhuis JD, Pincus SM, Garcia-Rudaz MC, Ropelato MG, Escobar ME, Barontini M. Disruption of the synchronous secretion of leptin, LH, and ovarian androgens in nonobese adolescents with the polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;**86**(8):3772-8.
108. Ortega-Gonzalez C, Cardoza L, Coutino B, Hidalgo R, Arteaga-Troncoso G, Parra A. Insulin sensitizing drugs increase the endogenous dopaminergic tone in obese insulin-resistant women with polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol* 2005;**184**(1):233-9.
109. Vigersky RA, Filmore-Nassar A, Glass AR. Thyrotropin suppression by metformin. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;**91**(1):225-7.
110. la Marca A, Morgante G, Palumbo M, Cianci A, Petraglia F, De Leo V. Insulin-lowering treatment reduces aromatase activity in response to follicle-stimulating hormone in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2002;**78**(6):1234-9.
111. Attia GR, Rainey WE, Carr BR. Metformin directly inhibits androgen production in human thecal cells. *Fertil Steril* 2001;**76**(3):517-24.
112. la Marca A, Egbe TO, Morgante G, et al. Metformin treatment reduces ovarian cytochrome P-450c17alpha response to human chorionic gonadotrophin in women with insulin resistance-related polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2000;**15**(1):21-3.
113. Diao FY, Xu M, Hu Y, et al. The molecular characteristics of polycystic ovary syndrome (PCOS) ovary defined by human ovary cDNA microarray. *J Mol Endocrinol* 2004;**33**(1):59-72.
114. Wood JR, Nelson VL, Ho C, 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**(29):26380-90.
115. Chang WY, Knochenhauer ES, Bartolucci AA, Azziz R. Phenotypic spectrum of polycystic ovary syndrome: clinical and biochemical characterization of the three major clinical subgroups. *Fertil Steril* 2005;**83**(6):1717-23.
116. Veldhuis JD, Pincus SM, Garcia-Rudaz MC, Ropelato MG, Escobar ME, Barontini M. Disruption of the joint synchrony of luteinizing hormone, testosterone, and androstenedione secretion in adolescents with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;**86**(1):72-9.
117. Bergendahl M, Veldhuis JD. Is there a physiological role for gonadotrophin oligosaccharide heterogeneity in humans? III. Luteinizing hormone heterogeneity: a medical physiologist's perspective. *Hum Reprod* 2001;**16**(6):1058-64.
118. Ding YQ, Huhtaniemi I. Preponderance of basic isoforms of serum luteinizing hormone (LH) is associated with the high bio/immune ratio of LH in healthy women and in women with polycystic ovarian disease. *Hum Reprod* 1991;**6**(3):346-50.

119. Nagamani M, Osuampke C, Kolver ME. Increased bioactive luteinizing hormone levels and bio/immuno ratio in women with hyperthecosis of the ovaries: possible role of hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;**84**(5):1685-9.