



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN
DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EN
PACIENTES PREPÚBERES Y PÚBERES CON
DIFERENTES ESTADOS DE
HIPERANDROGENISMO**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICO GENETISTA

PRESENTA

DR.ALEXIS MONGE BAQUEIRO



**Hospital General
de México**

MÉXICO D. F.

JULIO 2010

**“A la Vanguardia en el
Cuidado de la Vida”**



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN**

SECRETARIA DE SALUD

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO O. D.

**ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN DEL
RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EN PACIENTES
PREPÚBERES Y PÚBERES CON DIFERENTES
ESTADOS DE HIPERANDROGENISMO**

TESIS

QUE PRESENTA EL

DR. ALEXIS MONGE BAQUEIRO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICO GENETISTA

Dr. SERGIO CUEVAS COVARRUBIAS

Jefe del Servicio de Genética

Dra. Gloria Queipo García

Asesor de Tesis

Médico Adscrito al Servicio de Genética

Hospital General de México



**Hospital General
de México**

**"A la Vanguardia en el
Cuidado de la Vida"**

MÉXICO D. F. JULIO 2010



**Hospital General
de México**

**“A la Vanguardia en el
Cuidado de la Vida”**



SALUD

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora la Dra. Gloria Queipo por su dedicación y paciencia.

Al Servicio de Genética y a la Dirección de Investigación del Hospital General de México por haber brindado las facilidades para realizar el presente trabajo de tesis.

Este trabajo se realizó con financiamiento CONACYT SEP48017, PAPIIT 201909.



**Hospital General
de México**

**“A la Vanguardia en el
Cuidado de la Vida”**



SALUD

DEDICATORIA

A mi madre y a mi esposa por su apoyo incondicional.



**Hospital General
de México**

“A la Vanguardia en el
Cuidado de la Vida”



SALUD

ÍNDICE

RESÚMEN ESTRUCTURADO.....	6
INTRODUCCIÓN.....	9
MARCO TEÓRICO.....	11
JUSTIFICACIÓN.....	33
OBJETIVOS.....	34
TIPO DE ESTUDIO.....	35
SUJETOS Y MÉTODOS.....	35
CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	35
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	35
ÉTICA Y BIOSEGURIDAD.....	45
RESULTADOS.....	45
DISCUSIÓN.....	55
CONCLUSIONES.....	64
BIBLIOGRAFÍA.....	65
GLOSARIO.....	76



**Hospital General
de México**

**"A la Vanguardia en el
Cuidado de la Vida"**



RESÚMEN ESTRUCTURADO

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El mecanismo molecular por el cual los estados hiperandrogénicos condicionan alteraciones metabólicas en la vía de señalización de la insulina es desconocido, por lo que el estudio de la participación del receptor de andrógenos en este proceso permitirá conocer el mecanismo fisiopatológico de la resistencia a la insulina y daño metabólico en este grupo de pacientes.

OBJETIVOS

Estudiar las características genéticas, moleculares y fenotípicas en niñas y adolescentes que cursan con estados hiperandrogénicos relacionados con el síndrome de resistencia a la insulina.

HIPÓTESIS

Las pacientes con pubertad precoz, estados hiperandrogénicos y resistencia a la insulina presentan alteraciones funcionales en el receptor de andrógenos.

DISEÑO

Se trata de un estudio básico, descriptivo y transversal.



Hospital General
de México

“A la Vanguardia en el
Cuidado de la Vida”



METODOLOGÍA

Se incluyeron 37 pacientes prepúberes divididas en 4 grupos, hiperandrogénicas con SOP, hiperandrogénicas sin SOP, con HSC y sanos, el grupo de pacientes con hiperandrogenismo, con y sin SOP se dividió nuevamente entre las que presentaban resistencia a la insulina y las que no.

Se realizó una evaluación clínica y antropométrica completa donde se obtuvieron los siguientes datos: edad, peso, talla, IMC, índice cintura cadera, índice cintura talla, estadios de tanner, escala de Ferriman, tensión arterial sistólica y diastólica.

Se tomó biopsia muscular de vasto externo y se extrajo RNA, empleando reverso transcriptasas, se obtuvo DNAc y se cuantificó la dosis génica del RA (Receptor de andrógenos) empleando PCR-Q, de la misma forma se cuantificaron otras moléculas como Adiponectina y GLUT 4. Se realizó secuenciación del microsatélite CAG en el exón 1 de AR y se realizaron pruebas para identificar inactivación sesgada del cromosoma X. A las pacientes, se les realizó un perfil de andrógenos incluyendo: androstenediona, DHEA-S, testosterona total, índice de andrógenos libres y SHBG, se midieron citocinas como FNT- α , se les

tomó un perfil lipídico donde incluimos: colesterol total, triglicéridos, HDL y LDL. Con el fin de evaluar el empleo de la glucosa se midió glucosa sanguínea e insulina y se obtuvo un índice de HOMA y la relación glucosa/ insulina.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Encontramos que las pacientes con SOP y resistencia a la insulina presentan una menor expresión del receptor de andrógenos que las pacientes sin SOP con resistencia a la insulina. El grupo de pacientes con SOP sin resistencia a la insulina presentó una menor expresión del RA que el grupo sin SOP sin resistencia a la insulina.

PALABRAS CLAVES: Síndrome de ovarios poliquísticos, hiperandrogenismo, receptor de andrógenos, resistencia a la insulina.

INTRODUCCIÓN



El síndrome de ovarios poliquísticos (SOP) afecta 5 – 10% de las mujeres en edad reproductiva, se encuentra frecuentemente asociado a otras alteraciones como obesidad, dislipidemias, oligomenorrea (menos de 6 ciclos menstruales por año), hiperandrogenismo, acné, hirsutismo, resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), así como alteración en la relación de LH/FSH.(Moran, 2008).

El SOP por las alteraciones asociadas representa una causa importante de morbilidad en la población mundial y es considerado una de las causas más comunes de infertilidad femenina, su etiología no es del todo clara y se han atribuido múltiples causas dentro de las cuales figuran: la disfunción hipotálamo-hipofisaria, el hiperandrogenismo adrenal y el hiperinsulinismo entre otras.

Actualmente el SOP recibe el nombre de síndrome de resistencia a la insulina con hiperandrogenismo (SRIHA), ya que se observó que el grupo de alteraciones presentes en el SOP puede estar presente sin la morfología diagnóstica preexistente conocida como Criterios de Róterdam (más de 8 quistes, de más de 10 mm con incremento del estroma ovárico). El SOP se define por la evidencia de hiperandrogenismo y oligomenorrea.

Un 20% de las pacientes con SOP y obesidad presentan intolerancia a los carbohidratos o DM2 antes de los 40 años, en controles pareados a sexo, edad y peso, la presencia de intolerancia a carbohidratos o DM2 es bastante menor, lo que hace pensar que las pacientes con

SOP presentan una desregulación metabólica inicial que les confiere un riesgo más alto.

Este riesgo fue atribuido inicialmente al hiperandrogenismo, sin embargo las mujeres transexuales que se administran testosterona y aquellas pacientes con hiperplasia suprarrenal congénita que cursan con hiperandrogenismo, no tienen un riesgo tan elevado de presentar trastornos en el metabolismo de carbohidratos, estos y otros datos han generado controversia del papel que juega el hiperandrogenismo en el síndrome metabólico.

Por lo que ha surgido la idea de una vía común entre andrógenos e insulina como base patogénica en el SOP.

El siguiente trabajo busca identificar las alteraciones musculares hasta hoy poco descritas en el receptor de andrógenos y sus mecanismos de señalización que pudieran estar involucradas en el desarrollo de la resistencia a la insulina e hiperandrogenismo en mujeres púberes y prepúberes.

MARCO TEÓRICO

ANTECEDENTES

Actualmente en México problemas como la obesidad, resistencia a la insulina y síndrome dismetabólico constituyen uno de los principales problemas de salud en edad pediátrica. En la mayoría de las pacientes púberes y prepúberes con hiperandrogenismo resulta muy complicado establecer un diagnóstico etiológico definitivo, una vez descartadas causas evidentes como hipercortisolismo, tumores ováricos y suprarrenales, hiperprolactinemia y pubertad precoz. La mayoría de las causas de hiperandrogenismo (HA) en mujeres se asocian con resistencia a la insulina (RI) y Diabetes Mellitus tipo 2 (DM 2). (Kangduk et al 2010) La pubarca y/o adrenarquia prematura, así como algunos casos de hiperplasia adrenal congénita muestran hiperinsulinemia en etapas tempranas de la vida e incluso con evidencia de componentes del síndrome dismetabólico. La prevalencia de Diabetes Mellitus tipo 2 en pacientes Afro-Americanas e Hispano-Caribeñas con pubarca prematura es del 70%. Es factible que estas pacientes manifiesten desde etapas tempranas signos de síndrome hipermetabólico. El mecanismo por el cual se dan estos eventos aún se encuentra en estudio, sin embargo, por las características de la población mexicana, esta constituye un modelo interesante para poder definir algunas de las características clínicas y moleculares de estos padecimientos.

El hiperandrogenismo se define como la presencia de signos y síntomas de la secreción excesiva de andrógenos; dichos síntomas

incluyen hirsutismo, acné grave e irregularidades menstruales en mujeres (desde oligomenorrea hasta amenorrea secundaria) (Witchel, 2002). Así mismo, puede presentarse como pseudopubertad precoz en niñas. Estas alteraciones son causadas por alteraciones genéticas o bien hormonas parácrinas que estimulan el complejo enzimático que interviene en la síntesis de hormonas esteroideas tanto a nivel ovárico como suprarrenal (Miller, 1997).

Algunas entidades que cursan con hiperandrogenismo en mujeres prepúberes y en edad reproductiva son de particular interés ya que la fuerte asociación entre éstas y obesidad, riesgo cardiovascular, síndrome de resistencia a la insulina y desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 han sido descritas cada vez con mayor frecuencia (Orio F, 2004, Gambineri A, 2004).

En 1921 se describió por primera vez la asociación entre los estados hiperandrogénicos y las alteraciones con el metabolismo de los carbohidratos (Achard y Thiers 2002). Estudios moleculares posteriores han permitido conocer otras entidades relacionadas con el hiperandrogenismo y la resistencia a la insulina, como son el Leprechaunismo, caracterizado por presentar lipodistrofia generalizada, retraso del crecimiento intrauterino, resistencia a la insulina, precocidad sexual e hirsutismo, esta enfermedad está ocasionada por mutaciones en el receptor de la insulina. El síndrome de Rabson-Mendenhall caracterizado por la apariencia senil, resistencia a la insulina hirsutismo y dentición temprana, es una

variante alélica. Estas entidades bien caracterizadas han servido para establecer una clara asociación entre el metabolismo de los carbohidratos y los estados hiperandrogénicos, sugiriendo que ambas condiciones están relacionadas a través de una vía metabólica común. La prevalencia global de hiperandrogenismo en la consulta de endocrinología del Hospital Infantil de México es de 9.5%. El síndrome de ovarios poliquísticos (SOP) es una alteración caracterizada por hiperandrogenismo y resistencia a la insulina que puede ser diagnosticada 3 años después de la menarca y esta frecuentemente asociada a síndrome metabólico. Afecta al 10-20% de las mujeres en edad reproductiva y resulta de una compleja interacción entre factores genéticos predisponentes y ambientales (Dunaif, 1999; Ibanez et al., 1994; Tucci et al., 2001).

Los criterios actualmente aceptados para definir al síndrome de ovarios poliquísticos incluyen: evidencia de hiperandrogenismo (manifestado por la elevación sérica de por lo menos un andrógeno), o bien la presencia de hirsutismo acompañado de oligo-ovulación (definida como seis o menos episodios de sangrado uterino en un año) (Lewy et al., 2001; Zacur, 2001). Algunas mujeres presentan obesidad y resistencia a la insulina y así mismo tienen un riesgo 7 veces mayor para desarrollar diabetes mellitus tipo 2 (Tucci et al., 2001). Este diagnóstico es de exclusión, sin embargo en muchas ocasiones es difícil realizarlo debido a que las pacientes con este síndrome tienen alteraciones endocrinas que simulan dicha entidad, dentro de las cuales se encuentran la hiperplasia suprarrenal congénita variedad no

clásica, síndrome de Cushing y tumores de ovario o glándula suprarrenal productores de andrógenos (Zacur, 2001).

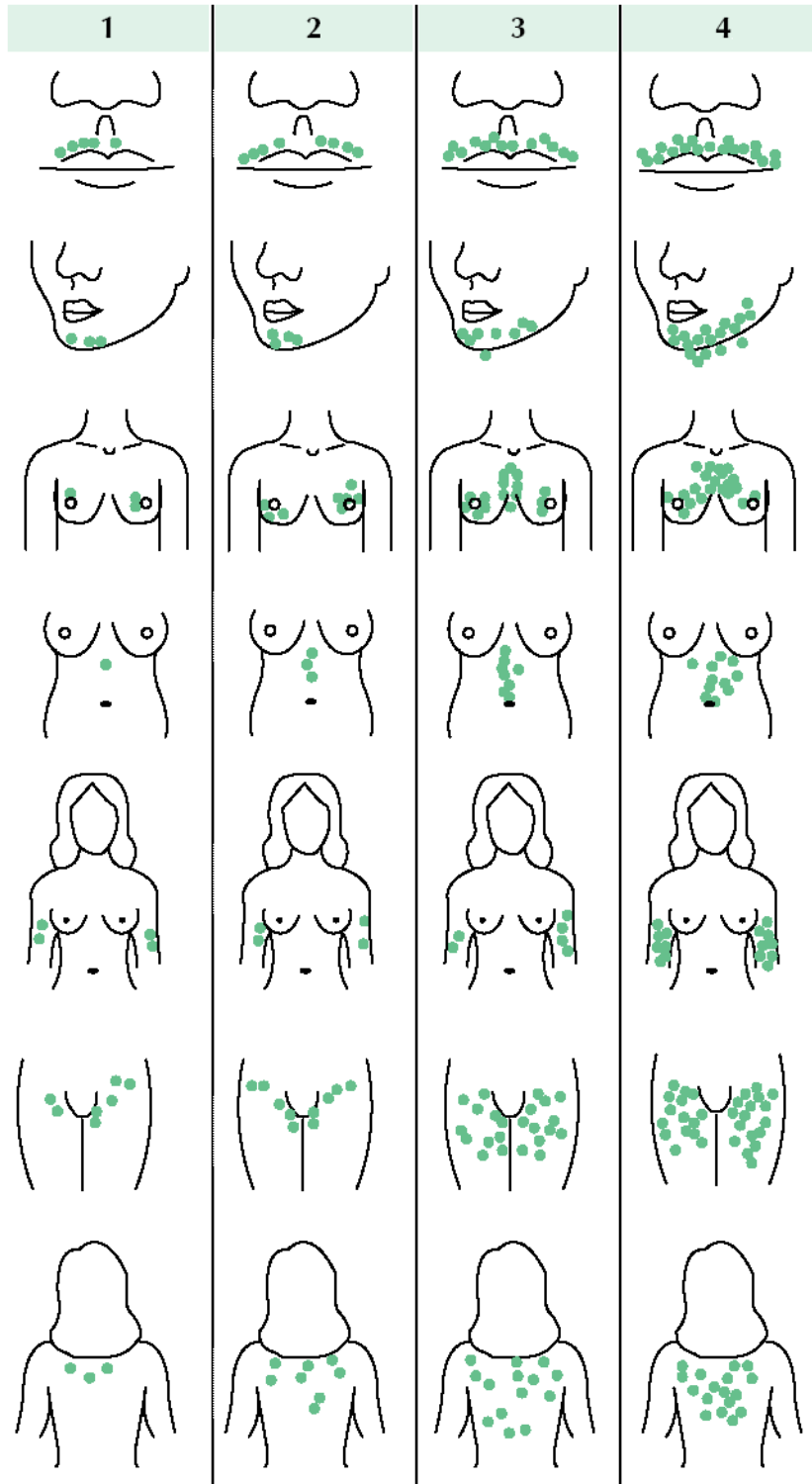
Recientemente se ha propuesto la asociación entre niveles excesivos de andrógenos y resistencia a la insulina (Zacur, 2001).

Diversos estudios han mostrado que la intolerancia a los carbohidratos (IC) presenta una incidencia 30 veces mayor en mujeres obesas con SOP que en controles pareados por sexo, peso y edad, (Dunaif et al., 1996). Las pacientes con SOP presentan una mayor producción hepática de glucosa, la cual requiere mayores cantidades de insulina para suprimirse, por lo que las células β del páncreas incrementan la producción de insulina para compensar la resistencia, fenómeno que favorece el agotamiento de la reserva pancreática.

El diagnóstico de resistencia a la insulina se puede valorar mediante el índice de HOMA (Homeostasis Model Assessment), este índice predice la presencia de resistencia a la insulina en un individuo. Es la relación que existe entre los niveles de insulina y glucosa ($\text{glucosa} \times \text{insulina} / 22.5$). Otro parámetro clínico es la acantosis nígricans la cual también puede ser valorada de manera objetiva por la escala para la clasificación de la acantosis nígricans. (Tabla 1)(James P. et al., 1997)

Tabla 1	Escala para ACANTOSIS NÍGRICANS
COLORACIÓN DEL CUELLO	
0	Ausente
1	Muy tenue
2	Sólo en la porción posterior del cuello menor a 10 cm
3	Afecta la porción lateral del cuello
4	Afecta la porción anterior del cuello
COLORACIÓN DE LA AXILA	
0	Ausente
1	Tenue
2	Sólo en el centro de la axila
3	Abarca toda la fosa axilar
4	Supera la fosa axilar

TEXTURA DEL CUELLO	
0	Lisa
1	Rugosidad leve
2	Elevado
3	Con crestas
OTROS SITIOS	Nudillos, codos rodillas, solo se marca presencia



Escala de Ferriman – Gallwey: valora la cantidad de vello en los pacientes femeninos, se emplea como una medida clínica del hirsutismo, con un valor máximo de 36 puntos.

El hiperandrogenismo se manifiesta por la presencia de acné severo, oligomenorrea o amenorrea secundaria, anovulación e hirsutismo, que es uno de los parámetros clínicos empleados para valorar el hiperandrogenismo. La escala de Ferriman–Gallwey permite cuantificar de forma objetiva este parámetro y valora la cantidad de vello en filtrum, mentón, pecho, abdomen, brazos, piernas y espalda; un valor mayor a 8 es sugestivo de exceso de andrógenos. El hiperandrogenismo puede ser confirmado mediante la medición de los andrógenos como: androstenediona, dehidroepiandrosterona (DHEA) o su forma sulfatada, testosterona total o testosterona libre. Aunado a todo lo anterior las pacientes con SOP tienden a cursar con elevación de los triglicéridos, disminución de HDL, aterosclerosis en coronarias, aorta y carótidas de forma más severa y a menor edad que la población general. La hiperinsulinemia puede deberse no sólo al incremento en la producción, sino a una disminución en su depuración. La depuración de insulina está mediada por la unión con el receptor; por lo que una disminución en el número de receptores o de su función podría conducir a hiperinsulinemia y ser parte del mecanismo patogénico. Es posible que el SOP tenga un componente hereditario importante y por ende este presente desde el nacimiento y se puedan detectar alteraciones en las vías previamente mencionadas antes de que se desarrolle la enfermedad. Algunos de los datos que apoya esta teoría, son que 54% de las mujeres que tienen un familiar de primer grado con SOP, presentan elevación en cifras de testosterona o LH y que los hombres, familiares en primer grado de una paciente con SOP,

presentan una frecuencia mayor de alopecia de tipo androgénica o son muy velludos, esto podría apoyar un patrón de herencia AD (Autosómico Dominante) limitado por el sexo para el SOP, donde los varones presentan otro tipo de repercusiones causadas por el hiperandrogenismo. Se ha observado que en la gran mayoría de las pacientes con SOP no hay mutaciones o alteraciones en la secuencia de gen del receptor de insulina, esto sugiere que modificaciones postraduccionales o alteraciones en la cascada de señalización podrían ser la causa de la alteración.(Nectaria Xita et al 2006)

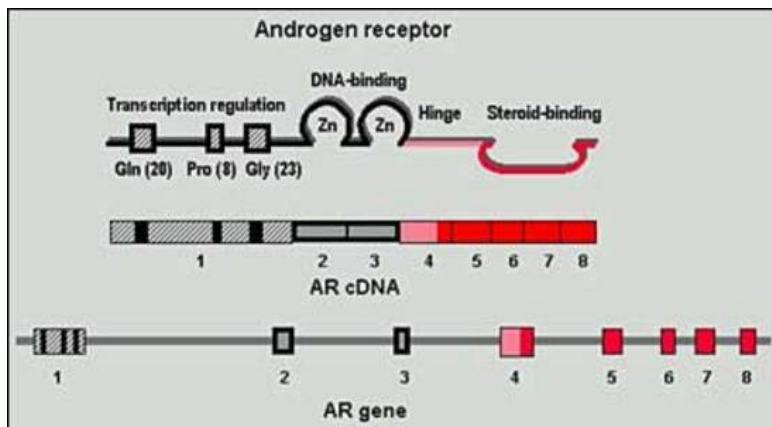
Estudios *in vitro* empleando adipocitos y fibroblastos de mujeres con SOP han mostrado alteraciones en la unión entre la insulina y su receptor, también se ha observado un incremento en la autofosforilación de residuos de serina del IR (Receptor de Insulina), que es un hallazgo característico del SOP. Otras patologías que presentan resistencia a la insulina (diabetes mellitus tipo 2 y síndrome de Cushing) no muestran alteración en la fosforilación de residuos de serina a nivel del receptor. Este patrón anormal de fosforilación se observó nuevamente en estudios de músculo estriado de mujeres con SOP y ha sido asociado con un efecto posreceptor implicado en la alteración de la transducción de señales. (Dunaif et al.,1995). Estudios más recientes sobre patrones de fosforilación del receptor de insulina en tejido ovárico, mostraron disminución de la fosforilación de los residuos de tirosina en una paciente con SOP en comparación a otra paciente normal. (Moran C. et al., 2001). A pesar de que este estudio solo empleó una paciente, estudios subsecuentes han confirmado la presencia de esta alteración en el patrón de fosforilación del IR,

incluso estudios realizados desde 1985 confirmaron una relación entre el hiperinsulinismo y la morfología ovárica (Dunaif A, et al 1985). El mecanismo fisiopatogénico de los patrones alterados de fosforilación aun no se ha explicado de manera adecuada, sin embargo, la evidencia sugiere que la fosforilación diferencial ocasiona desregulación posreceptor. La relación entre testosterona e IC (Intolerancia a carbohidratos) parece ser diferente entre hombres y mujeres, cuando disminuyen los andrógenos en las pacientes con SOP, se observa mejoría en el metabolismo de la glucosa. Sin embargo, los hombres obesos con IC que reciben andrógenos muestran de forma paradójica disminución de los niveles de glucemia. Waldstreicher et al., 1988, estudiaron a 12 mujeres con SOP y midieron LH y FSH en sangre periférica en pulsos de 10 minutos durante 12 a 24hr. Se incluyeron mediciones de estradiol, estrona, y testosterona durante la fase folicular temprana, media y tardía; compararon los resultados obtenidos contra controles pareados por edad, reportados en otros estudios y encontraron que los pulsos de LH en pacientes con SOP se encuentran incrementados en amplitud y frecuencia ocasionando niveles séricos mayores de LH en estas pacientes, mientras que los pulsos de secreción de FSH fueron normales. Este patrón es característico de un incremento en la secreción de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y se pensó que el patrón alterado podría indicar afección hipotalámica. No se encontró diferencia estadísticamente significativa en los niveles de estradiol durante la fase folicular temprana, sin embargo en la fase folicular tardía los niveles de estradiol fueron significativamente menores en las pacientes con SOP. Los niveles de estrona fueron

superiores en las pacientes con SOP durante la fase folicular temprana y media pero menores a los controles durante la fase tardía. Los niveles de testosterona permanecieron superiores en las pacientes con SOP durante todo el estudio.

Hiperandrogenismo

El hiperandrogenismo es una alteración bioquímica que consiste en la elevación de hormonas androgénicas y se manifiesta por la



presencia de hirsutismo, acné severo, oligomenorrea o amenorrea secundaria y anovulación. Puede ser confirmado mediante la medición de los andrógenos como: androstenediona, dehidroepiandrosterona (DHEA) o su forma sulfatada, testosterona total o testosterona libre. El receptor de andrógenos (AR) se encuentra en el citoplasma celular, tiene 3 dominios de regulación, 2 dedos de Zn para unirse al DNA y un sitio para fijar el esteroide. Cuando el AR une al andrógeno, dimeriza, se trasloca al núcleo y funciona como factor de transcripción (FT).

El AR, es miembro de la familia de factores de transcripción activados por ligando, el exón uno codifica el dominio de transactivación, el cual contiene 2 microsatélites, el CAG, que codifica para glutamina (Q), y ha sido el más estudiado por su asociación directa con el

funcionamiento del AR, de manera normal presenta entre 8 y 35 repetidos con una media de 21.

Cambios en el repetido CAG del exón uno del receptor de andrógenos, han sido identificados como causa de enfermedad. En la enfermedad de Kennedy, el incremento del microsatélite traducido genera disfunción proteica y falla del receptor de andrógenos, con atrofia testicular secundaria. Se ha observado que reducción en el número de repetidos CAG en el AR, genera una mayor avidez de este por los elementos de respuesta a andrógenos (ARE) en el DNA incrementando la transcripción. Esta variación en el número de repetidos se propuso como causa de POS, ya que algunos trabajos lo han relacionado con hiperandrogenismo funcional, sin embargo múltiples estudios no lograron probar esta asociación. Otra hipótesis que se ha propuesto para explicar el hiperandrogenismo en el PCOS fue la inactivación preferencial del cromosoma X con el microsatélite CAG de menor longitud; aunque esto se ha observado en algunos grupos de pacientes no ha sido en todos los grupos estudiados. (Nissar A et al., 2008).

Activación del Receptor de andrógenos mediada por SHBG

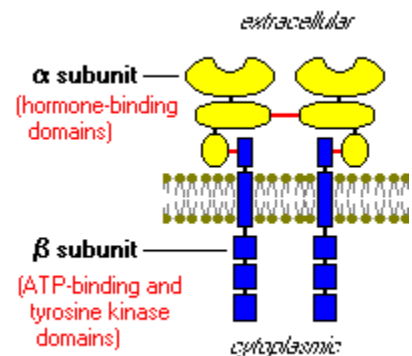
La vía de activación del RA es mucho más compleja, e intervienen otras proteínas. Los andrógenos, al igual que otras hormonas, son transportados en la sangre por proteínas fijadoras. La proteína transportadora de hormonas sexuales (SHBG) funciona como reservorio plasmático, cuando libera al andrógeno éste pasa al citoplasma y se une a su receptor. La SHBG se une a un receptor específico membranal (SHBGR) que activa proteínas G, estas a su

vez activan a la fosfolipasa C (PLC) que al producir diacil glicerol (DAG) estimula a la PKC que activa a la PKA, activando al receptor de andrógenos en ausencia del andrógeno (**PUGEAT M ET AL**). La SHBG que no se encuentra unida al andrógeno logra la estimulación del receptor. Sin embargo, aún no es claro si la activación mediada por andrógenos genera la misma respuesta que la estimulación mediada por la vía de SHBGR. La vía de PI3K, puede ser estimulada por el receptor de insulina de manera directa o por la vía de RAS. PI3K activa a AKT y está activa la vía del receptor independiente del andrógeno. En resumen, se puede activar por la unión al andrógeno, fosforilación mediada por PKA o AKT, por lo que AKT es una vía común entre el y el IR lo que explica la asociación entre resistencia a la insulina e hiperandrogenismo (Wu M et al., 2010) (**Pugeat et al**) El receptor de andrógenos se degrada por poliubiquitinación mediada por MDM2, esta proteína ha sido poco estudiada en el SOP, pero se sabe que la falta de degradación del RA puede estar asociada al hiperandrogenismo clínico. MDM2 ha sido muy estudiada por su interacción con P53.

Resistencia a la insulina

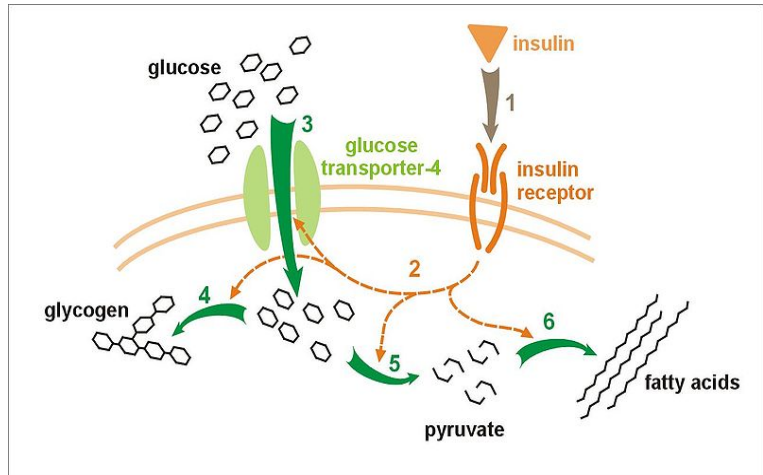
Estructura y mecanismos de acción del receptor de insulina

El receptor de insulina (IR) es un heterotetrámero formado por dos subunidades alfa unidas entre sí por un puente disulfuro, las cuales tienen como función unir a la insulina, y cada subunidad alfa une dos subunidades



beta a través de un puente disulfuro. El receptor se divide en dos dominios funcionales; un dominio transmembranal y un dominio con actividad de tirosincinasa. (Duvnjak M et al)

De forma normal el IR fosforila al IRS (por sus siglas en ingles Insulin Receptor Substrate) del cual se conocen dos tipos el IRS-1 y el IRS-2. El primero es fosforilado por el IR en residuos de



tirosina, mientras que el segundo es fosforilado en residuos de serina. Los IRS 1 y 2 fosforilan nuevamente al receptor y ocasionan su internalización, permitiendo la degradación de la insulina unida a este. Se ha sugerido que la fosforilación del receptor de TGF- β pudiera estar implicado en la fosforilación anómala de residuos de serina en el IRS1 que es dependiente del IR, (Kangduk et al., 2009) éste podría ser uno de los mecanismos que participan en la resistencia a la insulina mediado por el receptor de TGF- β . El IR tiene actividad cinasa, una vez activado se autofosforila, también fosforila múltiples moléculas adaptadoras o puente como la proteína con dominio homólogo al sarcoma de Rous (SHC) que une el IR en su forma fosforilada y con los dominios SH2 de la proteína 2 ligada al receptor del factor de crecimiento epidérmico (GRB2). Cuando presenta tirosinas fosforiladas, GRB2 cambia su conformación al unirse a SHC y sus dos dominios SH3 unen otras moléculas ricas en prolina como Son Of

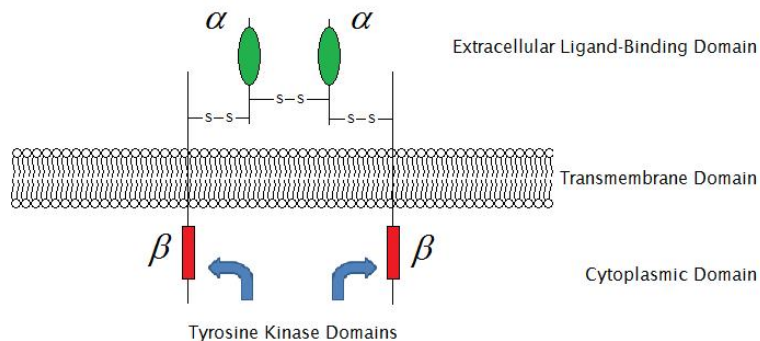
Sevenless (SOS) que es un intercambiador de guaninas, que permite la activación de la vía de RAS, al intercambiar una molécula de guanosin difosfato (GDP) en el receptor inactivo, por una molécula de guanosin trifosfato (GTP), que activa el receptor, y activa a su vez a mitogen activated protein kinase (MAPK), que activa a extracelular signal regulated kinase (ERK) que es un factor de transcripción involucrado en el crecimiento celular. (Lowenstein et al., 1992) (Yoko et al., 2008). Algunas células como los adipocitos y los rbdomiocitos requieren la presencia de un canal GLUT-4 para permitir la entrada de glucosa y su metabolismo subsecuente. Una de las funciones críticas en la activación del IR en tejido adiposo y muscular es la de traslocar la proteína GLUT-4 a la membrana, la ausencia de GLUT-4 en la membrana de estas células impide que capten glucosa y esto genera resistencia global a la insulina, los otros transportadores de glucosa como GLUT-1, GLUT-2 Y GLUT 3 no requieren insulina (Muretta JM. et al., 2007). La enzima fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) se activa al ser fosforilada por el IR y activa 4 vías distintas, la primera es una vía de contrarregulación en la cual activa IRS1 e IRS2 para favorecer la internalización del receptor. La segunda vía, activa RAC la cual genera el factor de elongación 2 (EEF2) que incrementa la transcripción. La tercera y cuarta vía son sinérgicas y tienen como fin traslocar a GLUT-4. PI3K activa a PIP2 y PIP3 que se unen a la vesícula que contiene a GLUT-4 e intervienen en su fusión a la membrana celular. PIP3 también activa a PKD la cual activa a PKB, mejor conocida como AKT, que es una vía maestra de regulación celular, AKT activa a PKC, la cual se une a la vesícula que transporta GLUT-4 y concluye su traslocación a la membrana.

AKT es un estimulante de la vía mTOR, involucrada en la síntesis de proteínas. AKT también actúa sobre BAD para bloquear apoptosis. Se ha demostrado que la disminución en la actividad de PI3K disminuye la estimulación sobre IRS-1 y por consiguiente hay una menor internalización del IR ocasionando hiperinsulinemia. La sobreactivación de AKT ocasiona un incremento en la síntesis de lípidos y glucógeno, esto fue demostrado en adipocitos y posiblemente ocurra de la misma forma en el músculo. En pacientes obesos con intolerancia a la glucosa se ha observado alteración en PKC, mecanismo por el cual se trasloca GLUT-4, sin embargo, la contrarregulación de IRS1 e IRS2 para internalizar el IR así como la vía de AKT mantiene su actividad normal en relación a controles obesos sin resistencia a la insulina. (Wu et al., 2010) (Kandguk et al., 2010).

Receptor de insulina y traslocación del canal GLUT-4

El receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1 R) presenta similitud estructural con el IR, cuando hay niveles altos de insulina, está es capaz de unirse a IGF-1R. Los pacientes con tumores productores de hormona de crecimiento presentan niveles elevados de IGF-1 y cursan con alteración en el metabolismo de los carbohidratos ya que por la similitud estructural entre ambos receptores, el IGF-1 también puede funcionar como ligando del IR, sin embargo no es una vía importante para generar resistencia a la insulina en las pacientes con SOP.

Receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1 R)



Las proteínas transportadoras de IGF-1 (IGFBP) funcionan como reservorio de esta hormona e impiden su unión al receptor, el incremento en los niveles de insulina ocasiona disminución en IGFBP tipo 1 y permite mayor biodisponibilidad del IGF-1. El receptor de insulina por sí mismo puede incrementar la esteroidogénesis, aun en estados en los que no cumple de manera adecuada su función en el metabolismo de los carbohidratos; este efecto ha sido observado principalmente en células intersticiales de la teca en el ovario.

Hiperplasia suprarrenal congénita

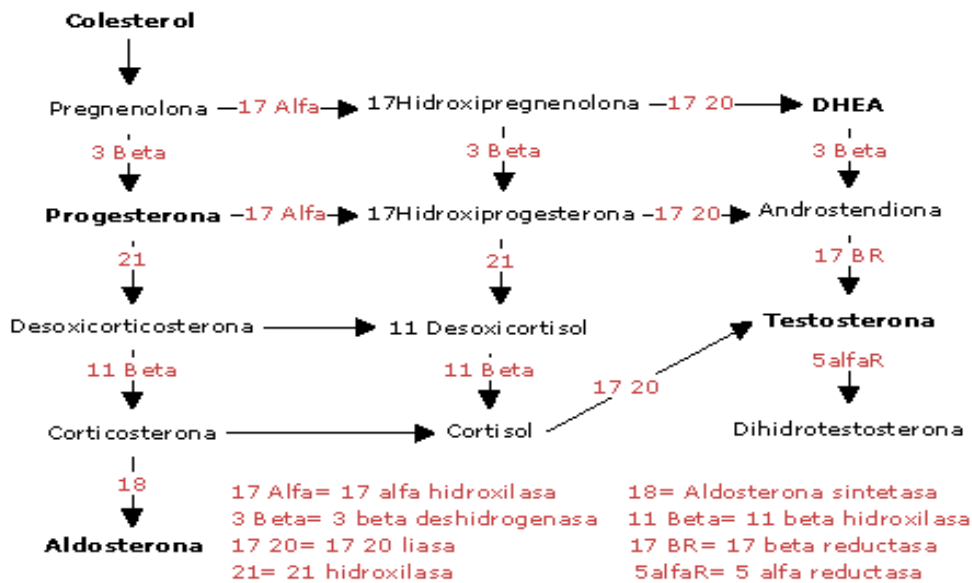
La hiperplasia suprarrenal congénita es un grupo heterogéneo de enfermedades con patrón de herencia autosómico recesivo, ocasionado por déficit parcial o total en alguna de las enzimas implicadas en la biosíntesis de esteroides suprarrenales.

La enzima que con mayor frecuencia presenta anomalías, hasta en el 95% de los casos, es la 21 alfa hidroxilasa. (CYP21). La CYP21 cataliza la conversión de progesterona en desoxicorticosterona y de 17

OH progesterona en desoxicortisol, su déficit ocasiona disminución de glucocorticoides y mineralocorticoides, la vía de retroalimentación encargada de la supresión de ACTH mediada por glucocorticoides y mineralocorticoides no se activa y continúa la producción de ACTH, mecanismo implicado en la hiperestimulación de la biosíntesis de esteroides. La hiperestimulación de las vías de biosíntesis de esteroides y el bloqueo en los pasos dependientes de CYP21, ocasionan incremento en los niveles de progesterona y 17 OH progesterona, que continúan su metabolismo hacia DHEA y androstenediona respectivamente, condicionando hiperandrogenismo. La forma clásica tiene a su vez dos presentaciones clínicas, la forma clásica perdedora de sal, ocasiona colapso vascular entre las 2 y las 10 semanas de vida extrauterina, acompañada de acidosis hiponatrémica así como virilización del producto femenino. La forma clásica virilizante simple, donde se mantiene una actividad enzimática mínima por incremento del sustrato 17 hidroxiprogesterona, es capaz de mantener niveles suficientes de mineralocorticoides y glucocorticoides, pero el incremento de sustrato para 21 alfa hidroxilasa, también es sustrato para otras enzimas como la 17, 20 liasa y esto ocasiona hiperandrogenismo.

En la variedad no clásica, se conserva cierta actividad enzimática que permite la producción adecuada de aldosterona y cortisol a expensas de elevar los sustratos para la CYP 21, lo que condiciona un exceso de hormonas sexuales, esto se manifiesta con hirsutismo en 60% de los casos, oligomenorrea (54%) y acné (33%); otras alteraciones relacionadas con el exceso de hormonas sexuales a edades

tempranas, son la aceleración en la velocidad de crecimiento, edad ósea adelantada e infertilidad, algunas de estas pacientes pueden cursar asintomáticas. En un estudio retrospectivo que analizó a 152 pacientes con hiperplasia suprarrenal congénita no clásica, encontraron una prevalencia de SOP del 47% (72 pacientes) de estas 56 presentaban ciclos ovulatorios irregulares y 16 presentaban anovulación. (Di Fede G et al., 2009). Se ha observado que las pacientes con HSC presentan mayor incidencia de síndrome metabólico en etapas pospuberales, (obesidad 60%, dislipidemias 70%, DM2 40%)(AAACE 2001) lo cual muestra varias similitudes con el síndrome de ovario poliquístico, más aun ambas patologías comparten la exposición temprana a andrógenos. El diagnóstico de déficit de CYP21 se realiza con secuenciación del gen, ya que se ha observado que la elevación de 17 OH progesterona, previa estimulación con ACTH es poco preciso. (Lourdes Ibáñez et al., 1995) (Bidet, M et al., 2009)(Fiet, J, G et al., 1988). La sensibilidad de la prueba de estimulación con ACTH para la detección de heterocigotos ha sido reportada alrededor de 16% lo que la hace inútil para este propósito. (Admoni, O, I et al., 2006; Bachega, TA et al., 2002)

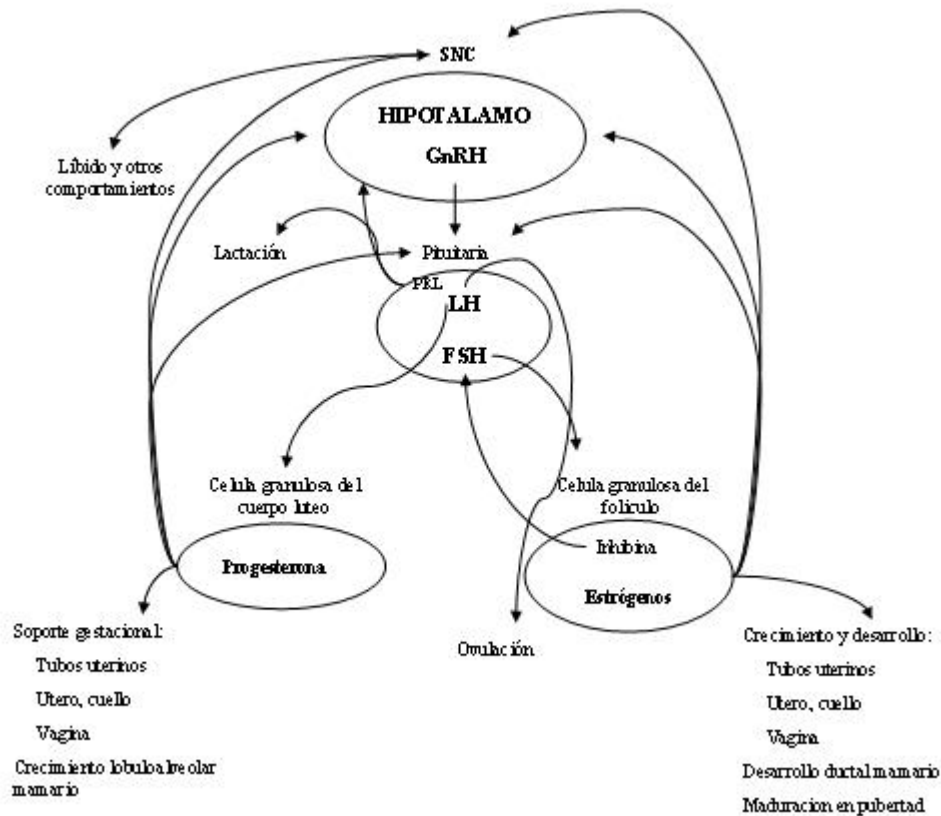


Reportes previos sugieren que el síndrome de ovarios poliquísticos (POS) tiene cambios en el funcionamiento celular normal mucho tiempo antes de la presencia de datos clínicos. Como lo hemos planteado previamente, se han encontrado alteraciones en la regulación de múltiples vías, como lo son el metabolismo de la glucosa, insulina, andrógenos, proteína de unión a hormonas sexuales (SHBG), entre otras. Las mujeres con POS cursan con elevación de LH, disminución de SHBG y consecuentemente con elevación de andrógenos libres, al parecer la programación del eje hipotálamo-hipófisis ocurre en etapas embrionarias tempranas y el exceso de andrógenos en esta etapa podría desensibilizar neuronas liberadoras de GnRH y ocasionar que durante la adolescencia se produzcan pulsos anómalos de liberación de GnRH lo que facilitaría la aparición de POS. Cuando los borregos son expuestos a andrógenos durante la gestación, se observan múltiples quistes ováricos y retraso en el crecimiento intrauterino; en mujeres expuestas *in útero* a andrógenos presentan 50% menos ciclos menstruales que aquellas que no fueron

expuestas. Estudios observacionales en mujeres con deficiencia de 21 hidroxilasa, mostraron que muchas de estas desarrollaron POS a pesar de haber recibido tratamiento posnatal temprano, lo que sugiere un papel del hiperandrogenismo *in útero* como parte de la patogenia en el POS. La SHBG funciona como reservorio de andrógenos, disminuye la fracción libre, la cual es capaz de unirse con el receptor de andrógenos, el déficit congénito de SHBG, ocasiona hiperandrogenismo fetal y los pacientes con esta alteración desarrollan POS en la vida adulta. Apoyando la observación de la implicación del hiperandrogenismo en la reprogramación fetal. Es importante mencionar que la aromatasa, enzima encargada de transformar andrógenos en estrógenos, se encuentra totalmente activa a las 9 semanas de gestación y es capaz de disminuir de manera importante la exposición fetal a andrógenos, por lo que representa un mecanismo de protección contra el hiperandrogenismo. La gran mayoría de las pacientes con POS cursan con hiperinsulinismo, el cual ha sido observado desde el periodo gestacional, la insulina es capaz de inhibir a la aromatasa en citotrofoblasto, este mecanismo podría explicar porque las mujeres con POS mantienen niveles elevados de andrógenos *in útero*. A la fecha no hay estudios que hayan encontrado cambios de tipo impronta asociados a exposición a andrógenos *in útero*. El sistema activina- folistatina- inhibina regula parte importante de la foliculogénesis por lo que su función deberá ser comprendida como parte de la patogenia en el POS.

La activina favorece el crecimiento de células tecales, incrementa la expresión del receptor de hormona folículo estimulante (R- FSH),

incrementa la liberación de FSH y disminuye la producción de andrógenos mediada por LH.



La folistatina es una proteína que fija a la activina e impide su acción. La inhibina Alfa, se produce durante la fase lútea, disminuye los niveles de FSH y forma parte del sistema de retroalimentación negativo, puede ser medida desde la gestación hasta los 4 meses de vida extrauterina y reaparece después de los 10 años. La inhibina beta, se libera durante la fase folicular y forma parte del sistema de retroalimentación negativa. Ambas inhibinas son heterodímeros y varían solamente en la subunidad beta. Las alteraciones endócrinas no son la única causa del POS. En estudios con microarreglos de DNA

se han identificado genes como posibles candidatos, La acetaldhido deshidrogenasa 6 y la retinol deshidrogenasa 2, son enzimas involucradas en la inducción de la transcripción de GATA6, el cual incrementa la expresión de 17 alfa hidroxilasa y favorece el hiperandrogenismo. (Nectaria Xita and Agathocles Tsatsoulis. 2006)

JUSTIFICACIÓN

La población hispana manifiesta una alta prevalencia de síndrome dismetabólico, sin embargo, no se han descrito de forma específica alteraciones moleculares o bioquímicas que puedan definir genéticamente a nuestra población. En la mayoría de las pacientes púberes y prepúberes con hiperandrogenismo resulta complicado establecer un diagnóstico etiológico definitivo, una vez descartadas causas evidentes como hipercortisolismo, tumores ováricos y suprarrenales, hiperprolactinemia y pubertad precoz.

La mayoría de las otras causas de hiperandrogenismo están en su mayoría relacionadas con resistencia a la insulina. Por lo tanto, es necesario realizar estudios que incluyan análisis multidisciplinarios de los posibles factores involucrados en procesos que participen en la activación del receptor de insulina y sus vías de señalización en niñas prepúberes y púberes. El conocer la fisiopatología influirá en forma significativa en la prevención del síndrome metabólico y sus complicaciones, que constituyen las principales causas de muerte en nuestro país.

OBJETIVOS

Objetivo General

El objetivo general del presente proyecto es estudiar el patrón de expresión del RA en niñas y adolescentes que cursan con estados hiperandrogénicos asociados al Síndrome de Resistencia a la Insulina y Síndrome de Ovarios Poliquísticos.

Objetivos Específicos

- 1.- Realizar un estudio antropométrico en pacientes con diferentes estados de hiperandrogenismo.
- 2.- Valorar la expresión del AR y su microsatélite CAG en los distintos grupos de pacientes.
- 3.- Evaluar el metabolismo de la glucosa en pacientes con diferentes estados de hiperandrogenismo.
- 4.- Analizar los patrones de expresión de IRS-1, IRS-2 y del transportador de glucosa GLUT-4 en células de cultivo de músculo esquelético.
- 5.- Evaluar la presencia de mutaciones en los genes de síntesis de esteroides suprarrenales CYP21 y 3BHSB en pacientes con SRIHA.
- 6.- Conocer las alteraciones fisiopatológicas involucradas en el síndrome de resistencia a la insulina e hiperandrogenismo desde las etapas tempranas de la vida.

TIPO DE ESTUDIO

Se trata de un estudio básico, descriptivo y transversal.

SUJETOS Y MÉTODOS

Población de estudio:

Se estudiaron 19 pacientes prepúberes y púberes del sexo femenino que manifestaron como patología principal y motivo de consulta, síndrome de hiperandrogenismo idiopático. Las pacientes fueron evaluadas en la Clínica de Maduración Sexual del Departamento de Endocrinología del Hospital Infantil de México, Federico Gómez.

Como control positivo para hiperandrogenismo incluimos un grupo de pacientes con diagnóstico de Hiperplasia Suprarrenal Congénita clásica por deficiencia de CYP21A. Los criterios de inclusión y exclusión son los siguientes:

Criterios de inclusión para pacientes prepúberes con hiperandrogenismo:

- Hirsutismo definido por una escala de Ferriman >8.
- Aparición de vello púbico antes de los 8 años de edad.
- Adrenarquia caracterizada por presencia de acné o actividad apócrina antes de los 8 años de edad.
- Niveles de andrógenos elevados para la edad (elevación de uno de los siguientes andrógenos: androstenediona, testosterona

libre, testosterona total, dehidroepiandrosterona o dehidroepiandrosterona sulfato).

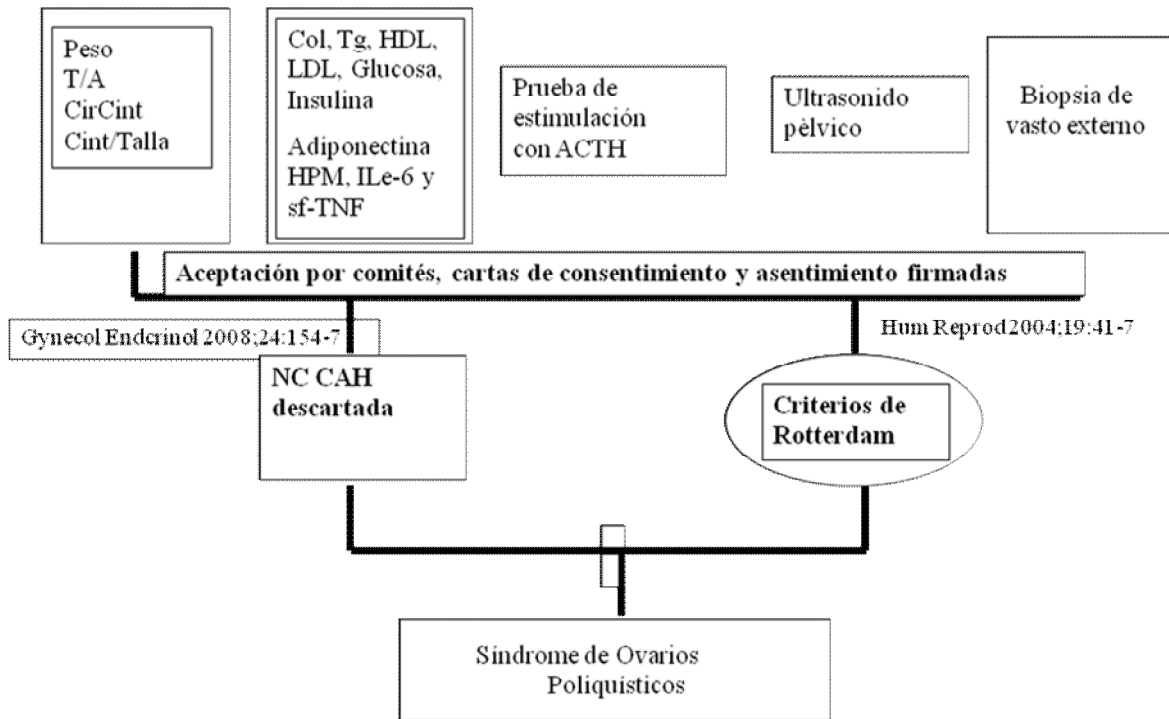
Criterios de inclusión para pacientes púberes con hiperandrogenismo:

- Hirsutismo definido por una escala de Ferriman >8.
- Pacientes en etapa postmenárgica que manifiesten irregularidades menstruales caracterizadas por oligomenorrea o amenorrea.
- Niveles de andrógenos elevados para la estadio puberal de Tanner (elevación de uno de los siguientes andrógenos: androstenediona, testosterona libre, testosterona total, dehidroepiandrosterona o dehidroepiandrosterona sulfato).

Criterios de exclusión para ambos grupos:

- Pubertad precoz verdadera.
- Hiperprolactinemia.
- Tumores secretores de andrógenos (ovario o suprarrenal)
- Síndrome o enfermedad de Cushing.
- Variedades clásicas de hiperplasia adrenal congénita diagnosticadas en el período neonatal y que cursen con ambigüedad genital.
- Disgenesias gonadales.
- Trastornos de la diferenciación sexual.

El siguiente diagrama muestra la técnica de abordaje que se realizó con cada paciente.



En todos los casos se realizó estudio antropométrico que incluyó: registro de peso, talla, índice de masa corporal, circunferencia de cintura y cadera. Se buscó de manera intencionada datos clínicos de resistencia a la insulina tales como acantosis nigricans en cuello, axilas e inguinal, así como obesidad central e hirsutismo (escala Ferriman mayor a 8). Se realizaron determinaciones en sangre en condiciones basales de Androstenediona, Dehidroepiandrosterona y Dehidroepiandrosterona sulfato, Testosterona total, Testosterona libre, colesterol, triglicéridos, colesterol HDL, colesterol LDL, ácido úrico, proteína fijadora de hormonas sexuales (SHBG), IGF1, IGF1-FP1, IGF1-FP2, IGF1-FP3, IGF1-FP4, IGF1-FP5, IGF1-FP6, IGF1-FP7, IGF1-FP8, IGF1-FP9, IGF1-FP10, IGF1-FP11, IGF1-FP12, IGF1-FP13, IGF1-FP14, IGF1-FP15, IGF1-FP16, IGF1-FP17, IGF1-FP18, IGF1-FP19, IGF1-FP20, IGF1-FP21, IGF1-FP22, IGF1-FP23, IGF1-FP24, IGF1-FP25, IGF1-FP26, IGF1-FP27, IGF1-FP28, IGF1-FP29, IGF1-FP30, IGF1-FP31, IGF1-FP32, IGF1-FP33, IGF1-FP34, IGF1-FP35, IGF1-FP36, IGF1-FP37, IGF1-FP38, IGF1-FP39, IGF1-FP40, IGF1-FP41, IGF1-FP42, IGF1-FP43, IGF1-FP44, IGF1-FP45, IGF1-FP46, IGF1-FP47, IGF1-FP48, IGF1-FP49, IGF1-FP50, IGF1-FP51, IGF1-FP52, IGF1-FP53, IGF1-FP54, IGF1-FP55, IGF1-FP56, IGF1-FP57, IGF1-FP58, IGF1-FP59, IGF1-FP60, IGF1-FP61, IGF1-FP62, IGF1-FP63, IGF1-FP64, IGF1-FP65, IGF1-FP66, IGF1-FP67, IGF1-FP68, IGF1-FP69, IGF1-FP70, IGF1-FP71, IGF1-FP72, IGF1-FP73, IGF1-FP74, IGF1-FP75, IGF1-FP76, IGF1-FP77, IGF1-FP78, IGF1-FP79, IGF1-FP80, IGF1-FP81, IGF1-FP82, IGF1-FP83, IGF1-FP84, IGF1-FP85, IGF1-FP86, IGF1-FP87, IGF1-FP88, IGF1-FP89, IGF1-FP90, IGF1-FP91, IGF1-FP92, IGF1-FP93, IGF1-FP94, IGF1-FP95, IGF1-FP96, IGF1-FP97, IGF1-FP98, IGF1-FP99, IGF1-FP100.

adiponectina y FNT- α . Se les realizó ultrasonido pélvico, prueba de estimulación con acetato de leuprolide, prueba de estimulación con ACTH, prueba de tolerancia oral a la glucosa, se realizó secuenciación de CYP21A y CYP 17 y 3β , se tomó biopsia muscular para determinar expresión del receptor de andrógenos.

Prueba de estimulación con acetato de Leuprolide:

Con la finalidad de evaluar la existencia de una hiperrespuesta de producción de andrógenos ováricos se realizó en todos los casos prueba de estimulación con el análogo de GnRH acetato de leuprolide (Ibáñez, 1993). Se obtuvieron muestras de sangre en condiciones basales a las 8:00hrs, en ayuno y en posición supina. Se administran 500 μ g por vía subcutánea y se tomaron muestras a las 6 y 24 hrs posteriores al estímulo para evaluar la respuesta de secreción hipofisaria y gonadal respectivamente. En la muestra basal se realizó determinación de 17 hidroxiprogesterona, LH, FSH y estradiol. A las 6hrs se determinó LH y FSH y a las 24hrs estradiol y 17 hidroxiprogesterona. En las pacientes que presentan ciclos menstruales se seleccionaron los días 3-8 del ciclo (fase folicular) para realizar la prueba. En los casos de amenorrea de más de 3 meses, ésta se realizó en cualquier día, así como en las niñas prepúberes que no hayan manifestado menarca. Estudios previos han mostrado que niveles $>160\text{ng/dL}$ posterior al estímulo con el análogo se encuentran en mujeres con hiperandrogenismo ovárico.

Así mismo un pico de secreción de LH $>10\text{mUI/ml}$, con una relación LH/FSH a las 6 hrs posteriores al estímulo >0.24 confirman el diagnóstico de Pubertad Precoz Verdadera.

Prueba de estimulación con ACTH:

Se realizó en todos los casos prueba de estimulación con ACTH (Cortrosyn, 250µg iv o im) con el fin de evaluar la respuesta de secreción adrenal y tratar de establecer desde el punto de vista bioquímico el diagnóstico de las variedades de hiperplasia suprarrenal de presentación tardía, particularmente deficiencia de P450C21 y de 3B-hidroxiesteroide-deshidrogenasa. En una muestra basal se determinó ACTH, cortisol, y 17 hidroxiprogesterona. 60 minutos posteriores al estímulo se determina 17 hidroxiprogesterona y cortisol. Una respuesta de 17 hidroxiprogesterona de >1500ng/dL en el posestímulo se confirma el diagnóstico de deficiencia de 21hidroxilasa. Niveles inferiores a estos se consideran en una zona gris que requiere confirmación molecular. No existen aún parámetros de referencia bioquímicos para realizar el diagnóstico de deficiencia de 3β-hidroxiesteroide-deshidrogenasa, por lo que todos los casos requieren confirmación molecular. Se realizó determinación basal y a los 60min posestímulo de 17 hidroxiprogesterona y 17 hidroxipregnenolona con la finalidad de detectar un bloqueo de esta última enzima. Se realizó posteriormente la correlación bioquímica y molecular, con la finalidad de establecer los diagnósticos de certeza de ambas variedades de hiperplasia adrenal congénita y las mutaciones detectadas. Posteriormente se realizó la correlación con las alteraciones en la funcionalidad el receptor de insulina.

Prueba de tolerancia oral a la glucosa y estímulo con Sustacal.

En todas las pacientes se realizó una prueba de tolerancia oral a la glucosa. Los tres días previos al estudio se indicó un consumo de carbohidratos de 300g al día y se solicitó un período de ayuno de 12hrs. Se tomó una muestra basal de sangre. Se administró posteriormente 1.75g/kg de peso de glucosa por vía oral disuelta en agua en un lapso de 3-5 minutos. Se determinó glucemia e insulinemia a los 0, 30 y 120 minutos. Se calcularon los índices bioquímicos de resistencia a la insulina actualmente validados para población pediátrica (Conwell, 2004):

HOMA insulina ayuno (μ U/mL) X glucemia
ayuno(mmol/L)/22.5

QUICKI $1/(\log \text{ insulina ayuno}[\mu\text{U/mL}] + \log \text{ glucemia ayuno}$
[mg/dL])

INDICE GLUCOSA/INSULINA glucemia ayuno/ insulina ayuno.

Se realizó también el cálculo del área bajo la curva de los diferentes puntos de determinación de glucosa e insulina. Una vez calculados todos los índices de resistencia a la insulina se realizó la comparación de las características fenotípicas y alteraciones en la funcionalidad del receptor de insulina, así como expresión de sustratos de insulina y transportadores de glucosa.

Estudio molecular de mutaciones de genes de esteroidogenesis suprarrenal

Se tomó una muestra de sangre después de 12 hrs de ayuno, 5ml en tubo Vacutainer con k3 EDTA. Se procesa y se almacena el DNA. El análisis de los genes CYP21A y 3BHSB asociado con algunos casos de hiperandrogenismo. se realizó mediante la técnica de PCR y secuenciación directa de la siguiente manera:

Análisis por PCR

Los genes a estudiar se amplificaron por medio de la técnica de PCR. Se amplificó el marco abierto de lectura incluyendo las uniones exón/intrón. Las secuencias de los oligonucleótidos fueron diseñados de acuerdo con reportes previos en la literatura y actualmente ya se encuentran estandarizadas las condiciones de amplificación. Los oligonucleotidos fueron adquiridos de una casa comercial (Gibco Brl Life Technologies) y llevados a una concentración final de 100 μ M. Las diferentes reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 25 μ l que incluye: 50 η g de DNA, 100 η g de cada oligonucleótido, 80 η M de dNTPs, 1 U de taq polimerasa y 1.5 mM MgCl². Las temperaturas que se utilizaron fueron 94 °C (5min), 35 ciclos de 94 °C (1min), 68 °C (1min), 72 °C (2 min) y 72 °C (10 min). Las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador (Gene Amp PCR System 9700 de Perkin Elmer).

Los productos amplificados de cada reacción se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, teñido con bromuro de etidio al 0.0002%. En todos los casos se incluyó un marcador de peso molecular, un control positivo, y un control negativo que consistió en una reacción sin DNA.

Purificación de los productos de PCR

La purificación de los productos de PCR a partir del gel de agarosa se realizaron utilizando el *Kit QIAEX gel Extraction* (Qiagen, Chatsworth, CA USA). Se cortó la banda del gel con el producto amplificado, se colocó en tubo de microcentrifuga de 1.5 ml, se pesó y se agregó *buffer* QX1 pH 7.5 y 4 μ l de la resina QX2, se agitó la mezcla, se colocó a 55 °C durante 3 minutos (en dos ocasiones consecutivas, agitando entre una y otra incubación). Una vez disuelta la agarosa está se eliminó mediante centrifugación durante 1 minuto a 9,221 g, se decantó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 500 μ l de *buffer* QX 1, se agitó vigorosamente y se centrifugó en las mismas condiciones antes mencionadas. Una vez que se decantó el sobrenadante el exceso de *buffer* se retiró con una pipeta hasta dejar únicamente el botón que contiene el DNA, el cual fue resuspendido en 500 μ l de *buffer* PE (que contiene principalmente alcohol). Se centrifugó nuevamente y se lavó con *buffer* PE; una vez que se decantó se colocó a 55 °C durante 10 minutos hasta que se secó la muestra, la cual se resuspendió en un volumen de 20 μ l con agua destilada y deionizada. Se incubó durante toda la noche a 4 °C, para

centrifugarse en las mismas condiciones, el sobrenadante fue recuperado y se utilizó como templado.

Otro de los puntos a estudiar fue la evaluación de los niveles de expresión de tres de las proteínas claves en la vía de señalización del receptor de insulina, el mismo receptor, Glut 4 y esto permite conocer si modificaciones del transcrito están involucradas con estados patológicos o bien si el caracterizar los patrones de expresión nos permite predecir el comportamiento con respecto a la resistencia a la insulina a mediano plazo de algunas de estas pacientes. Para ello, se realizó cuantificación real del número de copias del transcrito por medio de RT-PCR en tiempo real.

Extracción de RNA

Para la obtención de RNA total de tejido incluido en parafina se utilizó un Kit específico para este fin de Ambion (no. de catálogo 1902), en breve: se realizaron cortes de aproximadamente 20um, se colocó en tubos de 1.5ml, se desparafinó con xilol y se lavó con etanol. El tejido se digirió con proteinasa K. La extracción de RNA se realizó con una solución de fenol-cloroformo, luego se precipitó con acrilamida lineal e isopropanol, se lavó con etanol, finalmente se disolvió y se almacenó en una solución incluida en el kit para su conservación a -20°C.

Análisis de expresión génica

La determinación del número de transcritos de los genes a estudiar contenidas en el genoma de los casos incluidos en el estudio se realizó utilizando PCR en tiempo real. Se utilizó el método TaqMan

por lo que los primers y la sonda para el gen de interés se diseñarán según el programa Assay by Demand de Applied Biosystems, Foster City, California, USA. Como control interno de amplificación se incluyeron primers y sonda del gen RNasa P. Los componentes de la reacción de PCR no varían de los utilizados en la PCR convencional, la reacción tiene un volumen final de 10µl y fue por triplicado. Para ambos genes se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, y 40 ciclos de 95°C 15 seg y 60°C por 1 min en un termociclador de tiempo real modelo ABI Prism 7000.

LOS GRUPOS

Se formaron 4 grupos, el primero integrado por 9 pacientes con SOP y sin resistencia a la insulina, el segundo con 4 pacientes con SOP y con resistencia a la insulina, el tercero con 7 pacientes con HSC y el cuarto con 11 pacientes sanos.

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados por el método comparativo de ΔC_T ; los valores de C_T fueron estimados por el software ABI Prism 7000SDS. Los resultados obtenidos dentro de una misma corrida fueron sometidos a análisis de varianza. Todos los resultados fueron analizados empleando ANOVA, ANCOVA y análisis ortogonales.

ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD

En todos los casos los padres o responsables legales del menor, firmaron una carta de consentimiento informado, donde se les explica detalladamente en que consiste el estudio y las posibles complicaciones de los procedimientos. Este estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital General de México.

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y ANTROPOMÉTRICAS DE PACIENTES PÚBERES Y PREPÚBERES CON DIFERENTES ESTADOS HIPERANDROGÉNICOS COMPARADAS CONTRA CONTROLES

Se realizó estudio antropométrico a 20 pacientes hiperandrogénicas, 9 con SOP sin resistencia a la insulina, 4 con SOP y resistencia a la insulina, 7 con HSC y 11 controles sanos, los datos fueron analizados con la prueba de ANOVA. Se observó que la edad de las pacientes con SOP sin resistencia a la insulina es mayor que la de las pacientes con SOP con resistencia a la insulina (p.04), lo que sugiere que la resistencia a la insulina pueda ser un factor que condicione la aparición temprana del SOP. Las edades de los dos grupos controles con HSC y las pacientes sanas no mostró variaciones. El peso (p.008) de las pacientes con SOP y con resistencia a la insulina es significativamente mayor que en el resto de los grupos, dato que concuerda con una afección metabólica más severa en este grupo.

Otro dato con cambios significativos fue la tensión arterial sistólica (p.009) la cual fue mayor en las pacientes con SOP y resistencia a insulina comparada con los otros grupos de estudio y los controles (Figura 1) nuevamente se observa que la resistencia a la insulina es un factor que contribuye con mayor daño metabólico.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y ANTROPOMÉTRICAS CON SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA DE PACIENTES PÚBERES Y PREPÚBERES CON DIFERENTES ESTADOS HIPERANDROGÉNICOS COMPARADAS CONTRA CONTROLES

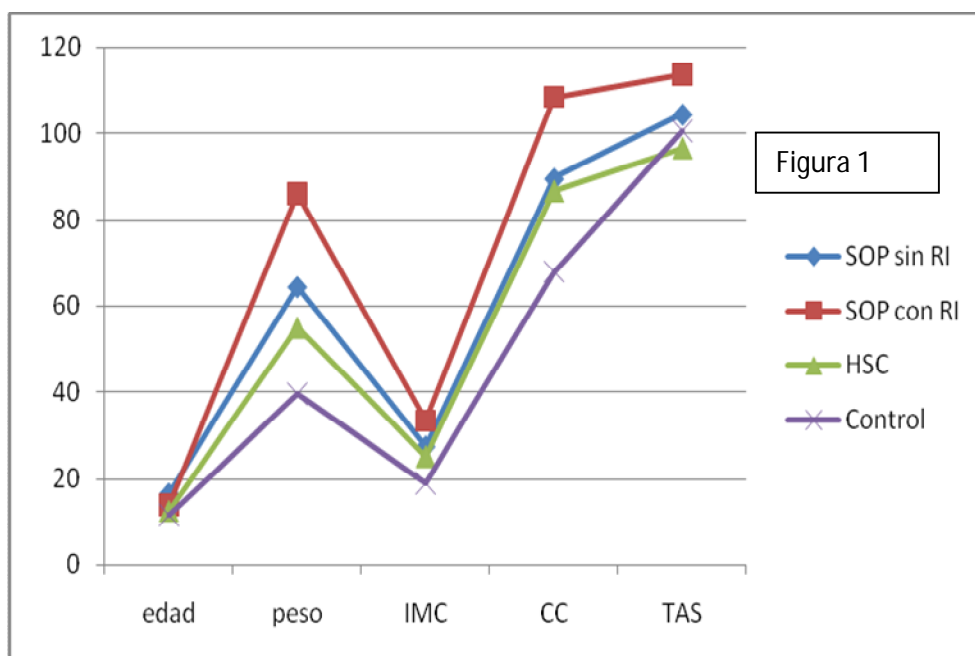


Figura 1: La siguiente gráfica muestra las variables más significativas en los 4 diferentes grupos. El peso en el grupo SOP con RI es considerablemente mayor que el resto de los grupos.

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS EN ADOLESCENTES CON HIPERANDROGENISMO

El hiperandrogenismo ha sido postulado como parte fundamental en el desarrollo del SOP y se cree que las pacientes con niveles elevados de andrógenos cursan con una desregulación metabólica que afecta la glicemia y las concentraciones de lípidos. Al comparar las concentraciones de glucosa, insulina, el índice HOMA, la relación glucosa/insulina, colesterol total, triglicéridos y LDL entre los distintos grupos con hiperandrogenismo entre ellos y contra el grupo no hiperandrogénico mediante la prueba tipo ANOVA con un pos HOC BONFERRONI no se observaron diferencias significativas, sin embargo se observó una diferencia en relación a los niveles de HDL .(Tabla 1)

Tabla 1	SOP sin RI	SOP con RI	HSC	CONTROL	p
Glucosa mg/dl	81	82	83	89	0.87
HOMA	1.8	4.82	2.03	1.14	0.16
Relación G/l	8.24	3.49	6.77	19.77	0.104
HDL mg/dl	55	47	34	36	0.046
LDL mg/dl	86	103.5	101	79.1	0.742

CONCENTRACIONES DE ANDRÓGENOS, SHBG Y CITOCINAS EN PACIENTES CON HIPERANDROGENISMO.

Se cuantificó androstenediona, DHEA-S, testosterona total SHBG, el índice de andrógenos libres, adiponectina y factor de necrosis tumoral alfa en todas las pacientes con hiperandrogenismo incluyendo las HSC. En relación a los valores de DHEA-S se observaron diferencias significativas entre las pacientes SOP con resistencia contra los casos de HSC lo que apoya el origen suprarrenal de los casos con hiperplasia suprarrenal congénita.

La disminución en la concentración de SHBG se ha propuesto como un indicador de daño metabólico, al comparar los resultados de las pacientes con SOP con y sin resistencia a la insulina no se encontraron diferencias significativas, sin embargo al comparar los valores de SHBG contra un grupo sano de edades semejantes, reportado por Cross et al, se encuentra una disminución importante de dicha proteína.

ANDRÓGENOS Y CITOCINAS EN DIFERENTES GRUPOS HIPERANDROGÉNICOS

Tabla 2	SOP SIN RI	SOP CON RI	HSC	p
Androstenediona mg/dl	3.27	3.25	63.96	0.437
DHEA-S mg/dl	205	115.5	351.5	0.034
Testosterona Total mg/dl	50.8	82.25	81.85	0.21
SHBG NMOL/L	34	15	36.45	0.22
IAL	6	23	11.2	0.67
Adiponectina	8.99	4.68	5.43	0.64
FNT α	2.5	2.89	2.42	0.087

Tabla 2: Muestra el perfil de andrógenos y citocinas en pacientes púberes y prepúberes con diferentes estados hiperandrogénicos y la diferencia estadística tras realizar un análisis tipo ANOVA.

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE LOS ANDRÓGENOS EN PACIENTES CON DIFERENTES ESTADOS DE HIPERANDROGENISMO.

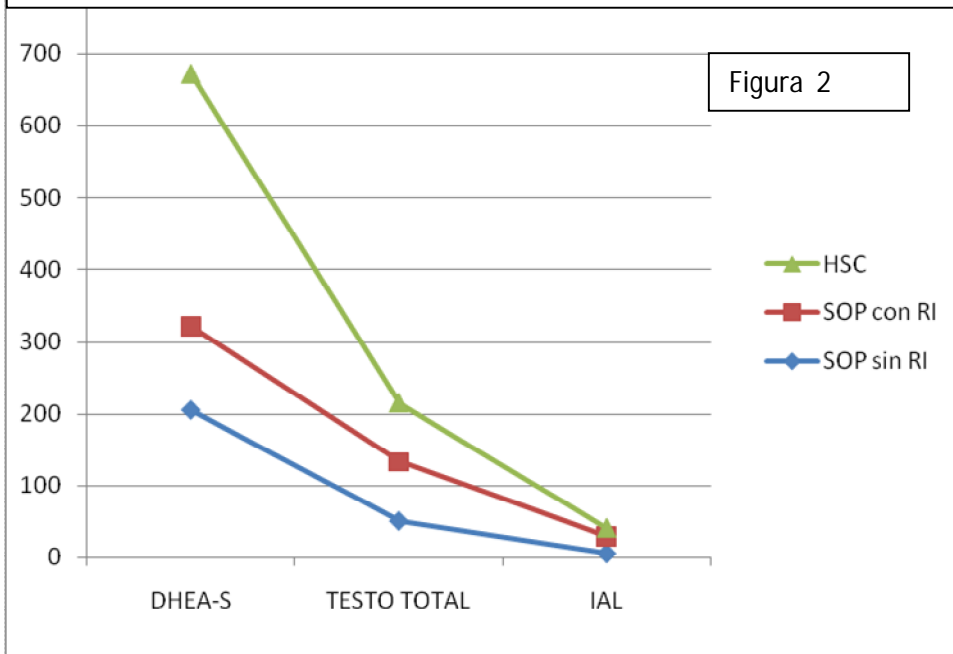


Figura 2. Donde se muestra el comportamiento de los andrógenos en los diferentes grupos.

ESTUDIO DEL REPETIDO DE POLIGLUTAMINA EN EL EXÓN 1 DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EN PACIENTES HIPERANDROGÉNICAS.

Con la finalidad de identificar diferencias entre el tamaño del repetido CAG en el exón 1 del receptor de andrógenos y que esta diferencia tuviera un efecto sobre la actividad transcripcional del gen, se midió el repetido CAG del AR de ambos cromosomas X y se comparó entre los diferentes grupos. En todos los grupos se observó un alelo

de menor tamaño, sin embargo no se identificaron diferencias significativas entre los diferentes grupos de pacientes hiperandrogénicas incluyendo a las pacientes con HSC (Tabla 3). Por lo que en este grupo de pacientes la longitud del tracto de poliglutaminas del exón 1 del RA no pareciera tener ningún efecto sobre el estado hiperandrónico, como se ha propuesto en publicaciones previas.

LONGITUD DEL MICROSATÉLITE CAG EN AMBOS ALELOS DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS.

Número de pacientes	Grupo	Promedio de repetidos CAG en exón 1 de AR	
		ALELO A	ALELO B
8	Hiperandrogénicos sin ovario poliquístico	21	25
13	Hiperandrogénicos con ovario poliquístico	23	25
5	HSC	22	27

Tabla 3. Se observa el promedio de la longitud del CAG en el alelo de menor y mayor longitud.

PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EN DNA_c DE MÚSCULO ESQUELÉTICO.

Con la finalidad de explorar los patrones de expresión del receptor de andrógenos como mecanismo molecular en el hiperandrogenismo, se realizó estudio de expresión del receptor de andrógenos en DNA_c de vasto externo en los 4 grupos mediante RT-PCR en tiempo real semicuantitativo. Las diferencias de los datos obtenidos se analizaron mediante análisis estadísticos ortogonales y análisis tipo ANCOVA. Los resultados mostraron una menor expresión del receptor de andrógenos en el grupo de pacientes con SOP con y sin resistencia a la insulina ($p=0.016$). Esta disminución es significativamente menor en las pacientes con SOP y resistencia a la insulina comparada con el grupo de pacientes con SOP y sin resistencia a la insulina. (Figura 3).

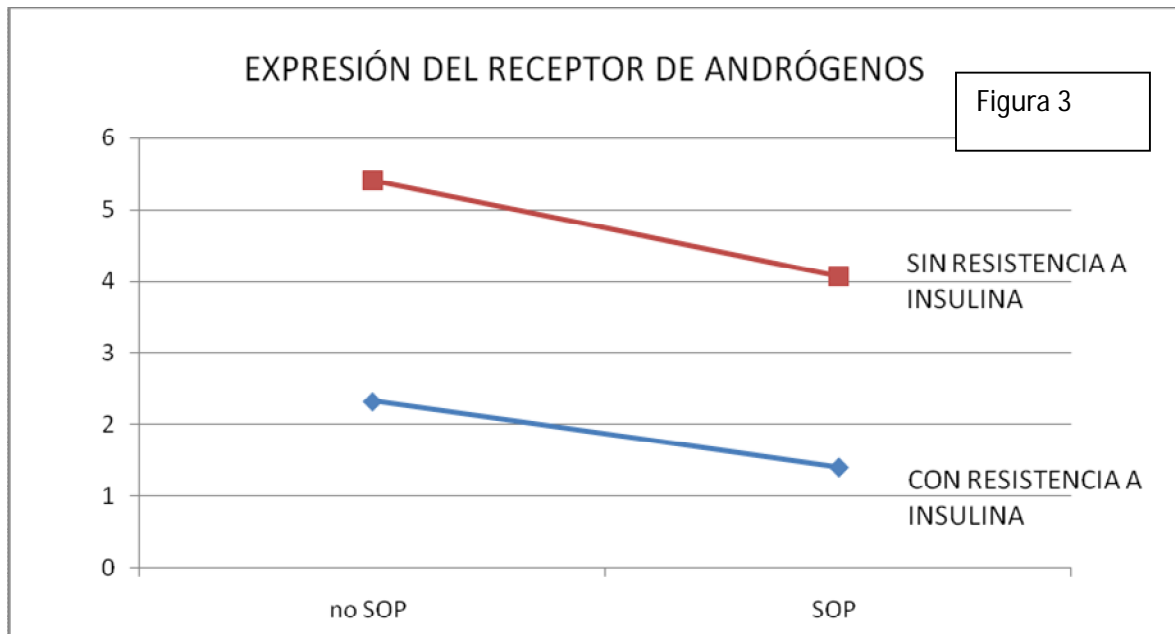


Figura 3: Muestra que el grupo de pacientes con resistencia a la insulina presenta una menor expresión de AR con relación a las pacientes sin resistencia a la insulina, independientemente del desarrollo de ovarios poliquísticos.

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS QUE PARTICIPAN EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA EN PACIENTES HIPERANDROGÉNICAS

Realizamos una comparación de la expresión génica de diferentes moléculas implicadas en la patogénesis del hiperandrogenismo y el síndrome metabólico como: AKT, Adiponectina (ADQ), GRB, GLUT4, IL-6, FNT α , IRS1 Y 2.

Tras realizar un análisis ANOVA, ANCOVA y ortogonales, se encontró que las pacientes con SOP presentan una menor expresión de GLUT 4 que las pacientes que no presentan SOP pero cursan

con un estado hiperandrogénico secundario a HSC ($p=0.055$). Al comparar a las pacientes con SOP con y sin resistencia a la insulina se observa una tendencia del grupo con resistencia a la insulina a presentar menor expresión de GLUT 4, sin embargo debido al tamaño de la muestra este dato no alcanzó un significado estadístico. (Gráfico 4)

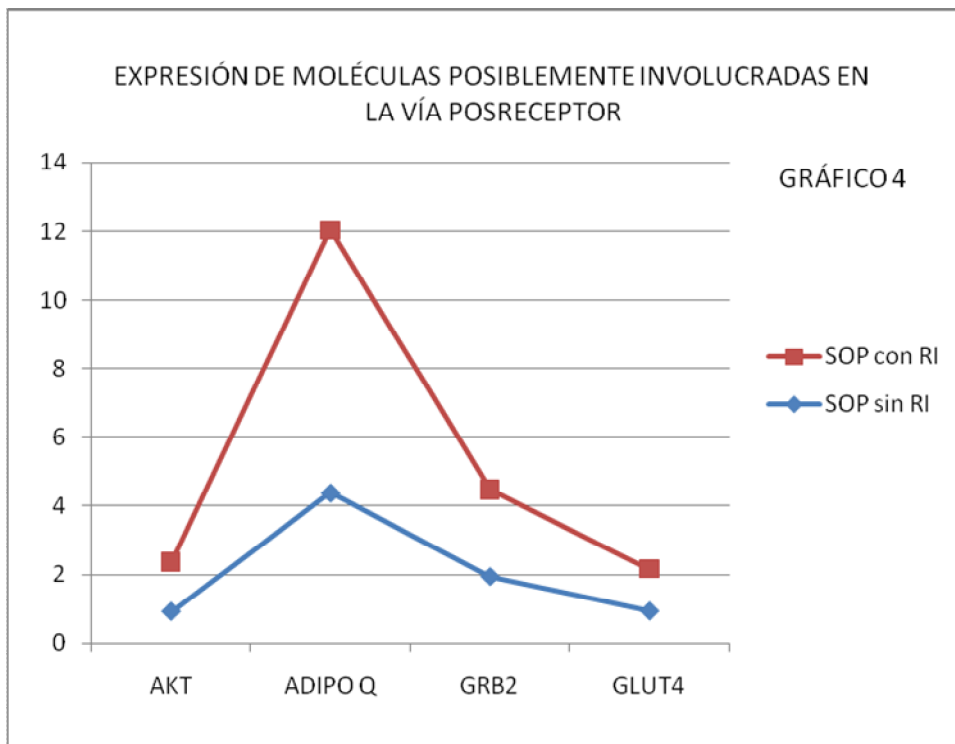


Gráfico 4. Muestra la expresión de diversas moléculas implicadas en el hiperandrogenismo en las pacientes con SOP con y sin resistencia a la insulina.

DISCUSIÓN

Actualmente en México problemas como la obesidad, resistencia a la insulina y síndrome metabólico constituyen uno de los principales problemas de salud en edad pediátrica. En la mayoría de las pacientes púberes y prepúberes con hiperandrogenismo resulta complicado establecer un diagnóstico etiológico definitivo, de causas evidentes como hipercortisolismo, tumores ováricos y suprarrenales, hiperprolactinemia y pubertad precoz. En la mayoría de los casos de pacientes prepúberes y púberes con hiperandrogenismo (HA) sin causa aparente, se asocian a resistencia a la insulina (RI), Diabetes Mellitus tipo 2 (DM 2) y SOP. La pubarca y/o adrenarquia prematura, muestran hiperinsulinemia en etapas tempranas de la vida e incluso con evidencia de componentes del síndrome metabólico. La prevalencia de Diabetes Mellitus tipo 2 en pacientes Afro-Americanas e Hispano-Caribeñas con pubarca prematura es de 70% (Kungduk et al., 2010). Es factible que estas pacientes desarrollen desde etapas tempranas SOP aunado a signos de síndrome metabólico. El mecanismo por el cual se dan estos eventos aún se encuentra en estudio, sin embargo, por las características de la población mexicana, este grupo étnico constituye un modelo interesante para poder definir algunas de las características clínicas y moleculares de estos padecimientos. Por lo que en el presente trabajo de tesis se analizó un grupo de 19 pacientes con criterios clínicos y bioquímicos de hiperandrogenismo idiopático, incluyendo pacientes con diagnóstico de SOP, con y sin resistencia a la insulina. También se incluyeron pacientes con HSC y pacientes sanos, se analizaron los

patrones de expresión de diferentes moléculas implicadas en la vía del AR y de la vía de la insulina en tejido de vasto externo, además se analizaron otras moléculas implicadas en el desarrollo del síndrome metabólico.

ESTUDIO ANTROPOMÉTRICO

Los estudios en edad pediátrica son limitados y se han enfocados principalmente a mujeres adultas. Las características que se observan en nuestra población en donde la obesidad y todas las consecuencias metabólicas se ven a edades tempranas.

Estudios previos en la literatura realizados en mujeres adultas con ovarios poliquísticos han mostrado que la resistencia a la insulina condiciona una mayor progresión en el daño metabólico (Duvnjak et al., 2009). En nuestro grupo de pacientes esta observación apoya datos previos, sin embargo, no hay muchos estudios que se enfoquen en pacientes pediátricos. Los resultados obtenidos muestran que independientemente de la edad, la resistencia a la insulina condiciona mayor daño metabólico que se observa con la aparición de elevación de la presión sistólica y ovarios poliquísticos. Con relación al peso, se encontró que este parámetro es significativamente mayor en las pacientes con SOP con resistencia a la insulina, lo que muestra nuevamente la relación descrita en múltiples artículos entre el SOP, la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico. (Groth SW et al, 2010)(Salles BF et al, 2010)(Duvnjak et al, 2009).

Los estudios realizados en este grupo de pacientes permiten conocer cómo se desarrolla el daño metabólico en edades tempranas y cómo participa en este proceso el HA. Los resultados con respecto a la edad de las pacientes, mostraron que los casos con SOP y resistencia a la insulina tuvieron una edad menor que en las pacientes con SOP sin resistencia a la insulina, lo que nuevamente apoya lo observado por otros grupos, que la resistencia a la insulina parece ser una variable independiente y que su aparición temprana inicia el daño metabólico (Duvnjak et al., 2009).

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE ADOLESCENTES CON DIFERENTES ESTADOS HIPERANDROGÉNICOS COMPARADAS CONTRA CONTROLES

El índice de HOMA se utilizó para dividir a los grupos de estudio, en relación a los niveles de glucosa, insulina, la relación glucosa/insulina y no se encontraron diferencias entre los grupos. El índice de HOMA mostró valores mayores en el grupo con SOP con resistencia a la insulina, sin embargo el análisis tipo ANOVA no encontró una diferencia significativa, pero sí una tendencia clara a ser mayor en este grupo. Nuestro tamaño de muestra no es lo suficientemente grande para mostrar esta diferencia pero numerosos reportes en la literatura muestran esta asociación, por lo que esta relación podría considerarse válida. Lo que establecería que el daño metabólico estaría en función a una desregulación entre en la relación glucosa/

insulina condicionando el desarrollo de resistencia a la insulina (Duvnjak et al 2009; Kangduk Choi et al, 2010).

El metabolismo de los lípidos en las pacientes con SOP refleja una afección metabólica (Ethel Codner et al, 2007). En nuestro estudio no encontramos diferencias importantes entre los niveles de colesterol total, triglicéridos ni LDL. Se identificaron concentraciones de HDL mayores en las pacientes con SOP sin resistencia a la insulina en relación al grupo con HSC y al grupo control. Este hallazgo no ha sido reportado en ningún otro estudio y va en contra de lo que se ha propuesto como génesis del síndrome metabólico. Esto podría explicarse de varias maneras, una de las cuales sería que existen mecanismos de protección al daño metabólico en edad pediátrica y que este es el resultado de que aún no existe resistencia a la insulina y una vez que aparece la resistencia a la insulina se inicia el daño metabólico progresivamente sin alterar este parámetro de manera inicial. Además se debe considerar que los niveles de HDL son influenciados por la genética del individuo, su actividad física y su consumo de colesterol.

PERFIL DE ANDRÓGENOS Y CITOCINAS EN PACIENTES CON DIFERENTES ESTADOS DE HIPERANDROGENISMO

El SOP está asociado a múltiples alteraciones del metabolismo como son la resistencia a la insulina, obesidad y dislipidemias (Dunaif et al, 1993). El hiperandrogenismo es una de las alteraciones implicada en el SOP y ha sido relacionado con la génesis de la enfermedad.

La asociación entre SOP, hiperandrogenismo y síndrome metabólico, sugiere que existe daño en algunas de las proteínas involucradas en la cascada de señalización de la vía de los andrógenos o bien en la vía de señalización de la insulina. Al comparar las concentraciones de los diferentes andrógenos, no encontramos diferencias entre los grupos.

Llama la atención que las pacientes con HSC que han estado sometidas a niveles elevados de andrógenos durante toda su vida, e incluso en útero, no presenten una mayor incidencia de síndrome metabólico ni SOP que la población general, por lo que la sola elevación de los andrógenos no explica la génesis del SOP (Speiser PW et al, 2003).

HIPERESTIMULACIÓN POR LA VÍA ALTERNA, MEDIADA POR SHBG

La proteína transportadora de hormonas sexuales (SHBG) tiene su propio receptor de membrana (interacción proteína- proteína) y activa proteínas G que funcionan como segundos mensajeros que activan al AR (Graciela Cross et al, 2007) (Avvakumov et al, 2010) Esta vía es independiente de la estimulación por andrógenos y podría explicar la causa del hiperandrogenismo en estos grupos de pacientes. SHBG también es un reservorio de andrógenos que al disminuir permite una elevación del IAL.

Se ha reportado que el hiperandrogenismo en las pacientes con SOP pudiera estar mediado por disminución en las concentraciones de SHBG como lo reportó Natia Kajaia en 2007. Se realizaron

mediciones de esta proteína, sin encontrar diferencias entre los 3 grupos hiperandrogénicos, sin embargo al compararla con un grupo de pacientes sanos de edades similares reportado por Cross et al, encontramos un descenso significativo en el grupo de pacientes con SOP y resistencia a la insulina. Lo cual apoya lo reportado por otros autores donde la disminución de SHBG sería un indicador bioquímico de daño metabólico (Katia Kajaia et al, 2007;Pugeat M et al, 2010).

VARIACIONES EN EL MICROSATÉLITE CAG DEL EXÓN 1 DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

El AR tiene 2 microsatélites en el exón 1, el CAG ha sido estudiado por su efecto sobre la expresión del AR (Jozków P et al, 2009). Van Kieuwerburgh et al. en el 2008, estudiaron la longitud del microsatélite CAG en 97 pacientes con SOP y sugirieron que una longitud menor a 18 repetidos en el microsatélite CAG podría ser la causa del hiperandrogenismo en las pacientes con SOP. Jaaskelainen et al. en el mismo año, determinaron que si bien el CAG podía estar relacionado con el hiperandrogenismo, no era un factor importante en el desarrollo del síndrome metabólico en las pacientes con SOP. En este estudio no se encontró correlación entre la longitud del microsatélite CAG y el hiperandrogenismo o el síndrome metabólico, como se reporta en el estudio de Nissar A. 2008. Al observar en todos los casos un repetido de menor longitud consideramos que podría existir una inactivación selectiva del X del alelo de mayor tamaño. Las pruebas de inactivación del X, mostraron

que la inactivación aleatoria se mantiene en nuestro grupo de estudio.

PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EN DNAC DE MÚSCULO ESQUELÉTICO

El receptor de andrógenos presenta una localización citoplasmática, al unir su ligando dimeriza y se trasloca al núcleo, activando la transcripción (Nissar et al, 2008). La causa del hiperandrogenismo en las pacientes con SOP no es del todo clara (Carlos Morales, 2008) y se han sugerido diferentes teorías para tratar de explicar su origen y relación con el SOP. Una de las posibles causas del hiperandrogenismo es la sobreexpresión del receptor de andrógenos, mecanismo de observado en diferentes receptores mediadores de crecimiento, un ejemplo es ERB-B2 en cáncer de mama (Zhang Z et al 2010). Los patrones de expresión del AR en pacientes hiperandrogénicas pediátricas no han sido estudiados por lo que el objetivo de este estudio fue conocer este parámetro y ver si existía alguna relación en nuestros grupos de estudio. La cuantificación de la expresión del AR en los diferentes grupos, mostró una menor expresión del receptor de andrógenos en el grupo de pacientes con SOP con y sin resistencia a la insulina ($p=0.016$). Esta disminución es significativamente menor en las pacientes con SOP y resistencia a la insulina comparada con el grupo de pacientes con SOP y sin resistencia a la insulina.

Se sabe que el AR tiene un mecanismo de retroalimentación positivo inducido por andrógenos (Williams textbook of endocrinology 11 ed) el cual ha sido estudiado en la enfermedad de Kennedy. Es posible que durante el proceso de daño metabólico, la célula disminuya la producción del AR como mecanismo de regulación en contra del hiperandrogenismo, ya que encontramos una relación directa entre el daño metabólico y la disminución de la expresión del AR. Este mecanismo de regulación a la baja ha sido observado en otros modelos de resistencia celular como en el caso de FAS, el cual es un receptor de membrana capaz de desencadenar apoptosis al unir su ligando, y es empleado por el sistema inmune para eliminar células infectadas por virus o células neoplásicas, estas últimas pueden generar desensibilización del receptor y evitar la apoptosis, causando progresión tumoral. (Wu W, Wang HD et al, 2010)

Otra de las posibles explicaciones para este resultado es que el hiperandrogenismo sea mediado por cambios en la secuencia del AR, cambios en sus vías o incluso por vías de señalización independientes del AR.

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS QUE PARTICIPAN EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA EN PACIENTES HIPERANDROGÉNICAS

El transportador de glucosa tipo 4 (GLUT4) es un canal específico para glucosa dependiente de la acción de la insulina en músculo y tejido adiposo (Kangduk et al, 2010), al comparar los patrones de expresión de este canal de membrana entre los diferentes grupos,

encontramos una menor expresión en el grupo de pacientes con SOP que en pacientes las pacientes con hiperandrogenismo sin SOP, así como una tendencia importante en las pacientes con resistencia a la insulina a presentar menor expresión del canal.

La disminución de expresión de GLUT-4 en las pacientes con resistencia a la insulina, explica como al disminuir el canal también disminuye la captación de glucosa periférica y condiciona resistencia a la insulina.

El que las pacientes con hiperandrogenismo y SOP presentaran concentraciones menores de GLUT, se relaciona con la fuerte asociación que existe entre esta patología y el síndrome metabólico. Dicha alteración hace pensar que tanto el hiperandrogenismo como el SOP comparten moléculas de señalización y posiblemente vías de regulación génica que expliquen porque la asociación entre hiperandrogenismo, resistencia a la insulina y síndrome metabólico.

AKT es una molécula maestra en regulación de la actividad celular y está implicada de forma importante en el crecimiento (Kangduk et al, 2010; Wu et al, 2010). Durante el estudio no se encontraron diferencias de expresión, sin embargo se sabe que esta molécula regula su actividad no solo por sus niveles de expresión, sino por mecanismos postraduccionales de fosforilación diferencial. La que podrían estar implicada en la etiología del SOP y el hiperandrogenismo al desregular los genes que se expresan de manera dependiente en sus diferentes vías. En relación a otras moléculas como IRS1 y 2 que participan en la señalización del

receptor a insulina no se encontraron diferencias en sus patrones de expresión.

Los pacientes obesos han sido postulados como pacientes con inflamación crónica y daño endotelial, lo que dio la pauta al estudio de diversas citocinas como adiponectina, FNT- α e IL-6 (Liang FJ et al, 2009). No encontrar diferencias entre los distintos grupos, hace suponer que estas moléculas no son un factor relevante en la génesis de la enfermedad durante la edad pediátrica.

Se puede concluir que el daño metabólico observado en pacientes pediátricas con hiperandrogenismo idiopático y SOP, tiene una base genética en donde modificaciones en la expresión del AR, así como la desregulación en la vía posreceptor están implicados en el desarrollo de resistencia a la insulina y progresión al síndrome metabólico.

BIBLIOGRAFÍA

Admoni, O, Israel, S, Lavi, I, et al. Hyperandrogenism in carriers of CYP21 mutations: the role of genotype. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 64:645.

American Association of Clinical Endocrinologists (AACE) Guideline for diagnosis and treatment of hyperandrogenic disorders: *Endocr Pract* 2001;7:120-34

Arslanian S and Suprasongsin C (1996) Differences in the in vivo insulin secretion and sensitivity of healthy black versus white adolescents. *J Pediatr* 129:440-3.

Avvakumov GV, Cherkasov A, Muller YA, Hammond GL. *Mol Cell Endocrinol*. 2010 Mar 5;316(1):13-23. Epub 2009 Sep 11. "Structural analyses of sex hormone-binding globulin reveal novel ligands and function."

Bachega, TA, Brenha, EM, Billerbeck, AE, et al. Variable ACTH-stimulated 17-hydroxyprogesterone values in 21-hydroxylase deficiency carriers are not related to the different CYP21 gene mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:786.

Baptiste CG, Battista MC, Trottier A, Baillargeon JP, "Insulin and hyperandrogenism in women with polycystic ovary syndrome" *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009.

Bidet, M, Bellanné-Chantelot, C, Galand-Portier, MB, et al. Clinical and molecular characterization of a cohort of 161 unrelated women with Nonclassical Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency and 330 family members. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94:1570.

Blau HM and Webster C (1981) Isolation and characterization of human muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**:5623-7.

Carlos Moran “Síndrome de ovario poliquístico: hiperandrogenismo por disfunción gonadotrópica y resistencia a la insulina” *Rev mexicana de med de la reproducción* 2008;1(2):79.

Charmandari E, Weise M, Bornstein SR, Eisenhofer G, Keil MF, Chrousos GP and Merke DP (2002) Children with classic congenital adrenal hyperplasia have elevated serum leptin concentrations and insulin resistance: potential clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab* **87**:2114-20.

Clayton PE (2002) Consensus statement on 21-hydroxylase deficiency from the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and the European Society for Paediatric Endocrinology. *J Clin Endocrinol Metab* **87**:4048-53.

Conwell LS, Trost SG, Brown WJ and Batch JA (2004) Indexes of insulin resistance and secretion in obese children and adolescents: a validation study. *Diabetes Care* **27**:314-9.

Cross Graciela, Danilowics K, Kral M, Caufriez A, Copinschi G, Bruno O.D, "Sex hormone binding decrease as potential pathogenic factor for hirsutism in adolescent girls" 2007.

Cutfield WS, Bergman RN, Menon RK and Sperling MA (1990) The modified minimal model: application to measurement of insulin sensitivity in children. *J Clin Endocrinol Metab* **70**:1644-50.

Di Fede G, Mansueto P, Pepe I, Rini GB, Carmina E. "High prevalence of polycystic ovary syndrome in women with mild hirsutism and no other significant clinical symptoms."

Dunaif A (1999) Insulin action in the polycystic ovary syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* **28**:341-59.

Dunaif A, Futterweit W, Segal KR, Dobrjansky A 1989 Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in the polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 38:1165–1174

Dunaif A, Green G, Phelps RG, Lebwohl M, Futterweit W and Lewy L (1991) Acanthosis Nigricans, insulin action, and hyperandrogenism: clinical, histological, and biochemical findings. *J Clin Endocrinol Metab* **73**:590-5.

Dunaif A, Hoffman AR, Scully RE, Flier JS, Longcope C, Levy LJ, Crowley Jr WF The clinical, biochemical and ovarian morphologic features in women with acanthosis nigricans and masculinization. *Obstet Gynecol* 1985, 66:545–552

Dunaif A, Sorbara L, Delson R and Green G (1993) Ethnicity and polycystic ovary syndrome are associated with independent and

additive decreases in insulin action in Caribbean-Hispanic women. *Diabetes* **42**:1462-8.

Duvnjak L, Duvnjak M, Vuk Vrhovac J *Physiol Pharmacol*. 2009 Dec;60 Suppl 7:19-24. "The metabolic syndrome - an ongoing story."

Ehrmann DA, Sturis J, Byrne MM, Karrison T, Rosenfield RL and Polonsky KS (1995) Insulin secretory defects in polycystic ovary syndrome. Relationship to insulin sensitivity and family history of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* **96**:520-7. *Fertil Steril*. 2009 Mar 30.

Ethel Codner, German Iñiguez, Claudio Villarroel et al, "Hormonal profile in women with polycystic ovarian syndrome with or without type 1 diabetes mellitus" *The Journal of Endocrinology and metabolism* 92(12):4742. 2007

Fiet, J, Gueux, B, Gourmelen, M, et al. Comparison of basal and adrenocorticotropin-stimulated plasma 21-deoxycortisol and 17-hydroxyprogesterone values as biological markers of late-onset adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66:659.

Groth SW. *Biol Res Nurs*. 2010 May 24. "Adiponectin and Polycystic Ovary Syndrome."

Herman-Giddens ME, Slora EJ, Wasserman RC, Bourdony CJ, Bhopkar MV, Koch GG and Hasemeier CM (1997) Secondary sexual characteristics and menses in young girls seen in office practice: a study from the Pediatric Research in Office Settings network. *Pediatrics* **99**:505-12.

Ibanez L, Dimartino-Nardi J, Potau N and Saenger P (2000) Premature adrenarche--normal variant or forerunner of adult disease? *Endocr Rev* **21**:671-96.

Ibanez L, Ferrer A, Ong K, Amin R, Dunger D and de Zegher F (2004) Insulin sensitization early after menarche prevents progression from precocious pubarche to polycystic ovary syndrome. *J Pediatr* **144**:23-9.

Ibanez L, Potau N, Chacon P, Pascual C and Carrascosa A (1998) Hyperinsulinaemia, dyslipaemia and cardiovascular risk in girls with a history of premature pubarche. *Diabetologia* **41**:1057-63.

Ibanez L, Potau N, Viridis R, Zampolli M, Terzi C, Gussinye M, Carrascosa A and Vicens-Calvet E (1993) Postpubertal outcome in girls diagnosed of premature pubarche during childhood: increased frequency of functional ovarian hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* **76**:1599-603.

Ibanez L, Potau N, Zampolli M, Prat N, Gussinye M, Saenger P, Vicens-Calvet E and Carrascosa A (1994) Source localization of androgen excess in adolescent girls. *J Clin Endocrinol Metab* **79**:1778-84.

Ibanez L, Potau N, Zampolli M, Prat N, Viridis R, Vicens-Calvet E and Carrascosa A (1996) Hyperinsulinemia in postpubertal girls with a history of premature pubarche and functional ovarian hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* **81**:1237-43.

James PB, Daniel EH, Helen PH, Michael PS." A Quantitative Scale of Acanthosis Nigricans" *Diabetes Care* October 1999 vol. 22 no. 10 1655-1659.

Jiang X, Srinivasan SR, Radhakrishnamurthy B, Dalferes ER and Berenson GS (1996) Racial (black-white) differences in insulin secretion and clearance in adolescents: the Bogalusa heart study. *Pediatrics* **97**:357-60.

Kangduk Choi and Young-Bum Kim "molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes" review. *The Korean Journal of Internal Medicine* vol 25. N2. June 2010.

Kim SW, Cho YM, Park DJ, Shin CS, Park KS, Kim SY, Cho BY, Lee HK." Diagnostic Value of 1microgram Rapid ACTH Stimulation Test According to the Timing of Sampling of Serum Cortisol in Patients with Suspected Central Adrenal Insufficiency. "*J Korean Soc Endocrinol.* 2004 Feb;19(1):33-41. Korean

Korean J Intern Med. 2010 Jun;25(2):119-29. Epub 2010 Jun 1. "Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes." Choi K, Kim YB.

Lewy VD, Danadian K, Witchel SF and Arslanian S (2001) Early metabolic abnormalities in adolescent girls with polycystic ovarian syndrome. *J Pediatr* **138**:38-44.

Liang FJ, Wu XK, Qu JW ,Ke L, Sun J, Wang Y, "Response of IGF and IL-6 to ovarian stimulation in PCOS and normal women" *Syst Biol Reprod Med* 2009 n55 (5-6):227-35.

Lourdes Ibáñez^a, Maria Rosa Bonnin^c, Maria Zampolli^a, Neus Prat^b, Pedro Javier Alia^c, Miguel Angel Navarro.” Usefulness of an ACTH Test in the Diagnosis of Nonclassical 21-Hydroxylase Deficiency among Children Presenting with Premature Pubarche” *Horm Res* 1995;44:51-56

Lovero G, Vicino M, Lorusso F et al “Polycystic ovary syndrome: relationship between insuline sensitivity, sex hormone levels and ovarian stromal blood flow” *Gynecol Endocrinol* 2001,n15(2):142.

Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG, Li W, Margolis B, Lammers R, Ullrich A, Skolnik EY, Bar-Sagi D, Schlessinger J (August 1992). "The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling". *Cell* **70** (3): 431– 42

Mathew RP, Najjar JL, Lorenz RA, Mayes DE and Russell WE (2002) Premature pubarche in girls is associated with functional adrenal but not ovarian hyperandrogenism. *J Pediatr* **141**:91-8.

Miller WL (1988) Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev* **9**:295-318.

Miller WL (1997) Pathophysiology, genetics, and treatment of hyperandrogenism. *Pediatr Clin North Am* **44**:375-95.

Morris AH, Reiter EO, Geffner ME, Lippe BM, Itami RM and Mayes DM (1989) Absence of nonclassical congenital adrenal hyperplasia in patients with precocious adrenarche. *J Clin Endocrinol Metab* **69**:709-15.

Muretta JM, Romenskaia I, Mastick CC. "Insulin releases glut4 from static storage compartments into cycling endosomes and increases the rate constant for glut4 exocytosis". *J Biol Chem* 2007

Natia Kajaia, Helge Binder, Ralf Dittrich et al " Low sex hormone binding globulin as a predictive marker for insuline resistance in women with hyperandrogenic syndrome" *European Journal of Endocrinology* 2007,157:499.

Nestler JE and Jakubowicz DJ (1996) Decreases in ovarian cytochrome P450c17 alpha activity and serum free testosterone after reduction of insulin secretion in polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* **335**:617-23.

Nestler JE, Jakubowicz DJ, de Vargas AF, Brik C, Quintero N and Medina F (1998) Insulin stimulates testosterone biosynthesis by human thecal cells from women with polycystic ovary syndrome by activating its own receptor and using inositolglycan mediators as the signal transduction system. *J Clin Endocrinol Metab* **83**:2001-5.

Nissar A. Shah, Heath J. Antoine, Marita Pall, Kent D et al "Association of androgen receptor CAG repeat polymorphism and polycystic ovarr syndrome" *L Clin Endocrinol Metab.* 2008, 93(5):1939-1945.

Oppenheimer E, Linder B and DiMartino-Nardi J (1995) Decreased insulin sensitivity in prepubertal girls with premature adrenarche and acanthosis nigricans. *J Clin Endocrinol Metab* **80**:614-8.

Petersen SL, Peyton M, Minna JD, Wang X. "Overcoming cancer cell resistance to Smac mimetic induced apoptosis by modulating cIAP-2

expression.” Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Jun 29;107(26):11936-41. Epub 2010 Jun 14.

Potau N, Ibanez L, Rique S, Sanchez-Ufarte C and de Zegher F (1999) Pronounced adrenarche and precocious pubarche in boys. *Horm Res* **51**:238-41.

Pugeat M, Nader N, Hogeveen K, Raverot G, Déchaud H, Grenot C. “Sex hormone-binding globulin gene expression in the liver: drugs and the metabolic syndrome” Mol Cell Endocrinol. 2010 Mar 5;316(1):53-9. Epub 2009 Sep 26.

Salles BF, Simão R, Fleck SJ, Dias I, Kraemer-Aguiar LG, Bouskela E. Int J Sports Med. 2010 Jul;31(7):441-50. Epub 2010 Apr 29. “Effects of resistance training on cytokines.”

Speiser PW and New MI (1987) Genotype and hormonal phenotype in nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* **64**:86-91.

Speiser PW and White PC (2003) Congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* **349**:776-88.

Suhail A.R. Doi, “neuroendocrine dysfunction in PCOS: a critique of recent reviews” Clinical medicine and research vol 6, n2: 47, 2008.

Taylor AE (2000) The gonadotropic axis in hyperandrogenic adolescents. *J Pediatr Endocrinol Metab* **13 Suppl 5**:1281-4.

Travers SH, Jeffers BW, Bloch CA, Hill JO and Eckel RH (1995) Gender and Tanner stage differences in body composition and insulin sensitivity in early pubertal children. *J Clin Endocrinol Metab* **80**:172-8.

Tucci S, Futterweit W, Concepcion ES, Greenberg DA, Villanueva R, Davies TF and Tomer Y (2001) Evidence for association of polycystic ovary syndrome in caucasian women with a marker at the insulin receptor gene locus. *J Clin Endocrinol Metab* **86**:446-9.

Vuguin P, Linder B, Rosenfeld RG, Saenger P and DiMartino-Nardi J (1999) The roles of insulin sensitivity, insulin-like growth factor I (IGF-I), and IGF-binding protein-1 and -3 in the hyperandrogenism of African-American and Caribbean Hispanic girls with premature adrenarche. *J Clin Endocrinol Metab* **84**:2037-42.

Waldstreicher J, Santoro NF, Hall JE, Filicori M, Crowley Jr WF Hyperfunction of the hypothalamic-pituitary axis in women with polycystic ovarian disease: indirect evidence for partial gonadotroph desensitization. *J Clin Endocrinol Metab* 1988, 66:165–172

Weber RFA, Pache TD, Jacobs ML, Docter R, Loriaux DL, Fauser BCJM, Birkenhager JC 1993 The relation between clinical manifestations of polycystic ovary syndrome and beta-cell function. *Clin Endocrinol (Oxf)* 38:295–300

Witchel SF (2002) Hyperandrogenism in adolescents. *Adolesc Med* **13**:89-99, vi-vii.

Wu M, Wang B, Fei J, Santanam N, Blough ER. Front Biosci (Schol Ed). 2010 Jun 1;2:1169-88. "Important roles of Akt/PKB signaling in the aging process."

Wu W, Wang HD, Guo W, Yang K, Zhao YP, Jiang YG, He P. "Up-regulation of Fas reverses cisplatin resistance of human small cell lung cancer cells." J Exp Clin Cancer Res. 2010 May 14;29:49.

Xita N, Tsatsoulis A, "Review: fetal programming of polycystic ovary syndrome by androgen excess: evidence from experimental, clinical and genetic association studies" J Clin Endocrinol Metab 2006 n91(5):1660-6

Zacur HA (2001) Polycystic ovary syndrome, hyperandrogenism, and insulin resistance. *Obstet Gynecol Clin North Am* **28**:21-33.

Zhang Z, Oyesanya RA, Campbell DJ, Almenara JA, Dewitt JL, Sirica AE. "Preclinical assessment of simultaneous targeting of epidermal growth factor receptor (ErbB1) and ErbB2 as a strategy for cholangiocarcinoma therapy." Hepatology. 2010 May 20.

GLOSARIO

Alelo: Forma alterna de un gen.

AR: Receptor de andrógenos.

Exón: Fracción del RNA nuclear heterogéneo que forma el RNAm.

Gen: Secuencia de nucleótidos necesaria para general al menos un producto funcional.

HSC: Hiperplasia suprarrenal congénita.

Índice CC: índice cintura- cadera.

Intrón: Fracción del RNA nuclear heterogéneo que no forma parte del transcrito maduro.

IR: Receptor de insulina.

Loci: Plural de locus.

Locus: Lugar que ocupa un gen en un cromosoma.

Macrosatélite: Repetidos de 61 a 171 pares de bases que forman centrómeros o tallos de cromosomas acrocéntricos.

Microsatélite: Repetidos de 2 a 4 pares de bases, pueden estar localizados en intrones, exones o regiones regulatorias, algunos forman sitios frágiles no comunes.

Minisatélite: Repetidos de 6 a 60 pares de bases que forman VNTR, telómeros entre otras estructuras genómicas.

ORF: Región de un RNAm la cual contiene los codones que se emplean para el ensamblaje de una proteína.

PCR-Q: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

Receptor: Molécula capaz de fijar un ligando.

RNAm: RNA mensajero, aquel que codifica para proteínas.

SHBG: Sex hormone binding protein, globulina transportadora de hormonas sexuales.

Sitio Frágil no común: Zonas con microsatélites amplificados usualmente inducibles con metotrexate o distamicina A, presentes en menos del 5% de la población, implicados en rupturas y re-arreglos cromosómicos.

SOP: Síndrome de ovarios poliquísticos.

TAD: Tensión arterial diastólica.

TAS: Tensión arterial sistólica.