



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Efecto del tratamiento con metformina sobre la metilación del DNA en genes relacionados con la señalización de la insulina en el endometrio de mujeres con síndrome de ovario poliquístico.

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

Martin Mizael Cruz Aranda

DIRECTOR DE TESIS

Dr. en C. EDGAR RICARDO VÁZQUEZ MARTÍNEZ



Ciudad Universitaria, CDMX

2019



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

VOCAL: Profesor: ALBERTO ORTEGA VÁZQUEZ

SECRETARIO: Profesor: EDGAR RICARDO VÁZQUEZ MARTÍNEZ

1er. SUPLENTE: Profesor: LIZBETH ESMERALDA GARCÍA VELÁZQUEZ

2° SUPLENTE: Profesor: NOEMÍ CÁRDENAS RODRÍGUEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN REPRODUCCIÓN HUMANA. INSTITUTO NACIONAL DE PÉRINATOLOGIA -FACULTAD DE QUÍMICA. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA:

DR. EDGAR RICARDO VÁZQUEZ MARTÍNEZ

SUSTENTANTE (S):

Martin Mizael Cruz Aranda

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco ampliamente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), al fondo sectorial de investigación en salud y seguridad social (FOSISS) del CONACYT, por el financiamiento del proyecto con clave 272682, número de registro 3000-20209-04-16 (INPer) y titulado “Efecto de la intervención metabólica con metformina sobre la programación epigenética del endometrio de mujeres con síndrome de ovario poliquístico”.

Al Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” por permitirme realizar el presente trabajo dentro de sus instalaciones.

Índice

Índice de figuras y tablas	3
Abreviaturas	5
1.RESUMEN	7
2. Introducción	8
2.1 Síndrome de ovario poliquístico.	8
2.1.1 Definición, diagnóstico y características clínicas.....	8
2.1.2 Endometrio, estructura y función.	14
2.1.3 Características del endometrio y el ciclo ovárico-endometrial.	15
2.1.4 Ciclo endometrial.....	16
2.1.5 Relación endometrio-SOP.	17
2.2 Insulina.	18
2.2.1 Vía de señalización de insulina.	19
2.2.2 Resistencia a la insulina en mujeres con SOP.	21
2.2.3 Alteraciones en la activación de la vía de la insulina en pacientes con SOP.	23
2.3 Tratamiento para SOP.	25
2.3.1 Metformina.....	26
2.3.2 Farmacocinética de la metformina.....	26
2.3.3 Mecanismo de acción de la metformina.....	27
2.3.3.1 Transporte celular de la metformina.....	27
2.3.4 Actividad de metformina en endometrio.	28
2.3.5 Actividad de metformina a nivel epigenético.	28
2.4 Epigenética.	29
2.4.1 Concepto y definición de epigenética.....	29
2.4.2 Epigenética aspectos actuales.	30
2.4.3 Mecanismos epigenéticos de regulación de la expresión génica.....	30
2.4.3.1 Metilación del DNA.....	32
2.4.3.1.1 Mecanismo de metilación del DNA.	33
2.4.3.1.2 Metilación de <i>nov</i> o.....	33
2.4.3.1.3 Metilación de mantenimiento.	34
2.4.3.1.4 Desmetilación.	34
3. Antecedentes	36

4. Justificación	38
5. Preguntas de investigación	39
6. Hipótesis	39
7. Objetivos	39
7.1 Objetivo general.	39
7.2 Objetivos particulares:.....	39
8. Metodología	40
8.1 Selección de pacientes.	40
8.2 Toma de muestras.....	42
8.3 Tratamiento con metformina.	43
8.4 Procesamiento de las muestras.	43
8.5 Selección de genes y diseño de oligos.	43
8.6 Análisis mediante MeDIP-qPCR.....	44
8.7 Ensayo RT-qPCR.	46
8.8 Análisis estadístico.	46
9. Resultados	47
9.1 Caracterización de la población de estudio.....	47
9.2 Cambios físicos y sintomatológicos de las pacientes posterior al tratamiento con metformina.....	48
9.3 Integridad de DNA genómico, DNA sonicado y RNA.....	49
9.4 Resultados de metilación de los genes de estudio.	52
9.5 Resultados de expresión relativa de los genes de estudio.....	54
10. Análisis de resultados	56
11. Conclusiones	68
12. REFERENCIAS	69
ANEXO A	81
ANEXO B	82
ANEXO C	85

Índice de figuras y tablas

Índice de figuras

FIGURA 1. CLASIFICACIÓN DEL HIRSUTISMO.	10
FIGURA 2. FENOTIPOS DEL SOP.	11
FIGURA 3. ESTRUCTURA DEL ENDOMETRIO.	14
FIGURA 4. SECRECIÓN HORMONAL DURANTE CICLO MENSTRUAL.	15
FIGURA 5. CICLO OVÁRICO-ENDOMETRIAL.	18
FIGURA 6. UBICACIÓN DE CÉLULAS BETA.	19
FIGURA 7. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE INSULINA.	20
FIGURA 8. RELACIÓN DE HIPERINSULINEMIA CON HIPERANDROGENISMO.	22
FIGURA 9. EFECTOS POR LA FOSFORILACIÓN DE IR E IRS-1.	24
FIGURA 10. ESTRUCTURA DE METFORMINA.	26
FIGURA 11. MECANISMO DE INDUCCIÓN DE LA METILACIÓN DEL DNA POR EFECTO DE METFORMINA.	29
FIGURA 12. METILACIÓN DE CITOSINAS.	33
FIGURA 13. PROCESO DE DESMETILACIÓN ACTIVA.	35
FIGURA 14. CAMBIOS FISIOLÓGICOS GENERADOS POR EL TRATAMIENTO CON METFORMINA	49
FIGURA 15. INTEGRIDAD DEL DNA ANTES Y DESPUÉS DE LA SONICACIÓN.	50
FIGURA 16. INTEGRIDAD DEL RNA ANALIZADA MEDIANTE EL EQUIPO BIOANALIZADOR.	51
FIGURA 17. ENRIQUECIMIENTO RELATIVO DE METILACIÓN EN LOS GENES H19 Y LINE-1 EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO.	52
FIGURA 18. VISUALIZACIÓN DE LOS AMPLICONES OBTENIDOS DE LA MEDIP-QPCR EN GEL DE AGAROSA AL 2%.	53
FIGURA 19. NIVELES RELATIVOS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES DE ESTUDIO.	55
FIGURA 20. DISEÑO DE OLIGOS PARA GAB1.	82
FIGURA 21. DISEÑO DE OLIGOS PARA IRS-1.	82
FIGURA 22. DISEÑO DE OLIGOS PARA SLC2A4.	82
FIGURA 23. PESOS MOLECULARES DE LOS AMPLICONES OBTENIDOS MEDIANTE EL ENSAYO MEDIP-PCR.	83
FIGURA 24. PESOS MOLECULARES DE LOS AMPLICONES OBTENIDOS MEDIANTE EL ENSAYO RT-PCR.	83

Índice de tablas

TABLA 1. CRITERIOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE SOP.....	9
TABLA 2. PRUEBAS A REALIZAR PARA EL DIAGNÓSTICO CONFIRMATORIO DE SOP.....	13
TABLA 3. TRATAMIENTOS PARA SOP.....	25
TABLA 4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN PARA PACIENTES DEL GRUPO CASO.....	41
TABLA 5. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN PARA PACIENTES DEL GRUPO CONTROL..	41
TABLA 6. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y ANTROPOMÉTRICAS DE CONTROLES Y PACIENTES.	47
TABLA 7. CARACTERÍSTICAS DE LOS OLIGOS DISEÑADOS.....	84

Abreviaturas

5caC	5-carboxicitosina
5fC	5-formilcitosina
5hmC	5- hidroximetilcitosina
5mC	5- metilcitosina
AdoMet	S- Adenosil metionina
AES	Sociedad de exceso de andrógenos y síndrome de ovario poliquístico (del inglés, <i>Androgen Excess and PCOS society</i>).
AKT	Proteína cinasa B
AMH	Hormona antimulleriana (del inglés, <i>Anti-Mullerian Hormone</i>).
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP (Adenosín monofosfato)
ATP	Adenosín trifosfato
CpG	Dinucleótido citosina- guanina
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DNA	Ácido 2´- desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FSH	Hormona foliculoestimulante (del inglés, <i>Follicle Stimulating Hormone</i>)
GAB1	Proteína de unión 1 asociada a GRB2
GRB2	Proteína unida al receptor de crecimiento 2
IRS-1	Sustrato del receptor de insulina tipo 1
IP3K	Inositol-trifosfato 3-cinasa
IR	Receptor de insulina
LDL	Lipoproteína de baja densidad (del inglés <i>Low density lipoproteins</i>).
LH	Hormona luteinizante (del inglés, <i>Leutinizant Hormone</i>).
MAPKK	Cinasa activadora de las proteínas cinasas activadas por mitógeno
MeDIP	Inmunoprecipitación de DNA metilado (del inglés, <i>Methylated DNA immunoprecipitation</i>).
NIH	Institutos Nacionales de Salud (del inglés, <i>National Intitutes of Health</i>)
OCT	Transportador de cationes orgánicos (del inglés <i>Organic cation transporter</i>)

PcG	Complejo represor polycomb
PKC	Proteína cinasa C
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (del inglés, <i>Quantitative polymerase reaction chain</i>).
RAF	Proto-oncogén serina / treonina proteína cinasa
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Retrotranscripción
SAHH	S-adenosil homocisteinhidrolasa
SDS	Dodecilsulfato de sodio / Laurilsulfato de sodio
Ser	Serina
SHBG	Globulina de unión a hormonas sexuales (del inglés, <i>Sex Hormone Binding Globulin</i>).
SLC	Acarreador de soluto (del inglés, <i>Solute carrier</i>).
SOP	Síndrome de ovario poliquístico
SWI/SNF	<i>Switch/sucrose non fermenting</i> (complejo remodelador del nucleosoma tipo SWI/SNF)
TDG	Timina DNA glicosilasa específica del desajuste de G/T (del inglés, <i>Thymine DNA glycosylase</i>).
TE	Tris-EDTA
TET	Diez-once translocaciones metilcitosina dioxigenasa (del inglés, <i>Teen-Eleven Translocation</i>).
TrxG	Trithorax
Tyr	Tirosina

1. RESUMEN

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es el trastorno endocrinológico más frecuente en mujeres de edad reproductiva, su fenotipo se caracteriza principalmente por hiperandrogenismo, anovulación crónica y presencia de ovarios poliquísticos, además de ser la causa más frecuente de infertilidad anovulatoria. Se ha reportado que aproximadamente el 70% de mujeres con SOP presentan hiperinsulinemia, la cual está asociada a un mayor riesgo de desarrollar diabetes, hipertensión, dislipidemia y síndrome metabólico. El tratamiento con metformina es la principal estrategia para reducir los efectos metabólicos asociados al SOP. Se ha descrito que la intervención metabólica con metformina incrementa el índice de embarazos y la proporción de nacidos vivos en mujeres infértiles con diagnóstico de SOP, además de disminuir las complicaciones asociadas a la fertilización *in vitro*. Sin embargo, se desconocen los mecanismos a través de los cuales la intervención metabólica con metformina favorece el embarazo en pacientes con SOP. Se ha encontrado que la metformina induce cambios a nivel de metilación del DNA y de la vía de señalización de la insulina en células de cáncer de endometrio. Por otro lado, se ha demostrado que existe una programación epigenética diferencial (a nivel de metilación de DNA) entre mujeres sanas y mujeres con SOP en tejidos específicos y relacionados con la enfermedad, tales como el tejido adiposo y en ovario. Sin embargo, no se ha establecido si existe una programación diferencial en el endometrio de mujeres sanas y mujeres con SOP mediante marcadores epigenéticos, así como se desconoce si la intervención metabólica con metformina pudiera modificar dicha programación. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es determinar el efecto de la intervención metabólica con metformina sobre los niveles de metilación del DNA en genes relacionados con la señalización de la insulina en el endometrio de mujeres con SOP.

Se determinaron los niveles de metilación en las regiones promotoras de los genes *GAB1*, *IRS-1* y *SLC2A4* a nivel de endometrio. El tratamiento durante tres meses con metformina no generó cambios significativos en los niveles de metilación de los genes de estudio, sin embargo, dicho tratamiento favoreció los niveles de expresión relativos de los tres genes, siendo comparables con respecto a mujeres sanas, además de generar efectos benéficos a nivel clínico y bioquímico.

2. Introducción

2.1 Síndrome de ovario poliquístico.

2.1.1 Definición, diagnóstico y características clínicas.

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es un trastorno de carácter endocrinológico, que se caracteriza por generar una deficiencia en la función ovárica de mujeres en edad reproductiva, siendo aceptado también como una patología que abarca de la pubertad hasta la posmenopausia. En México se estima con una prevalencia del 6% en mujeres en edad reproductiva (Francisco & Gonz, 2013; Moran et al., 2010), y a nivel mundial se estima de entre el 5 al 20% (Azziz et al., 2016), con un aproximado de entre el 72-95% con riesgo de desarrollar infertilidad anovulatoria (Moran et al., 2010).

Considerando que el SOP es una entidad patológica compleja, se han establecido criterios para la evaluación y diagnóstico del SOP. Los criterios principales son los del *National Institute of health* (NIH), los adoptados por la *Androgen Excess and PCOS society* (AES) y los más aceptados criterios de Rotterdam (Tabla 1) (Wang & Mol, 2017).

Es importante mencionar que en la práctica clínica es necesario excluir otras patologías las cuales comparten signos y síntomas, y que a su vez pueden dar un diagnóstico erróneo de SOP (Tabla 1).

Tabla 1. Criterios para el diagnóstico de SOP de acuerdo a las diferentes clasificaciones publicadas (modificado de Merino et al., 2015).

DEFINICIÓN	CRITERIOS DIAGNÓSTICOS	FENOTIPOS POSIBLES	CRITERIOS EXCLUSIÓN	DE HIPERANDROGENISMO CLÍNICO	HIPERANDROGENISMO BIOQUÍMICO	MORFOLOGÍA DE OVARIO POLIQUÍSTICO
NIH	Requiere la presencia simultánea de: 1) Hiperandrogenismo clínico y bioquímico 2) Trastorno menstrual	1) Hiperandrogenismo clínico y/o bioquímico más trastorno menstrual	Hiperplasia suprarrenal congénita, tumores secretores de andrógenos, síndrome de Cushing e hiperprolactinemia	Hirsutismo, alopecia, acné	1) Testosterona total 2) Testosterona libre 3) Androstenediona 4) DHEAS	No incluida
<i>Rotterdam</i>	Requiere la presencia de al menos dos de los siguientes criterios: 1) Hiperandrogenismo clínico y bioquímico 2) Anovulación 3) Morfología de ovario poliquístico (MOP)	1) Hiperandrogenismo clínico y/o bioquímico más anovulación 2) Hiperandrogenismo clínico y/o bioquímico más anovulación más MOP 3) Hiperandrogenismo clínico y/o bioquímico más MOP 4) Anovulación más MOP	Hiperplasia suprarrenal congénita, tumores secretores de andrógenos, síndrome de Cushing	Hirsutismo, acné y alopecia androgénica	1) Índice de andrógenos libres 2) Testosterona total 3) DHEAS	Por lo menos un ovario que tenga: 1) 12 o más folículos (2-9 mm de diámetro) o 2) Volumen mayor de 10 mL
AES	Requiere la presencia de hiperandrogenismo clínico o bioquímico y alguno de los siguientes criterios: 1) Oligo-anovulación o 2) MOP	1) Hiperandrogenismo clínico y/o bioquímico más oligo-anovulación 2) Hiperandrogenismo clínico y/o bioquímico más oligo-anovulación más MOP 3) Hiperandrogenismo clínico y/o bioquímico más MOP	Hiperplasia suprarrenal congénita, neoplasias secretores de andrógenos, uso o abuso de drogas androgénicas/ anabólicas, síndrome de resistencia insulínica severa, disfunción tiroidea, síndrome de Cushing e hiperprolactinemia	Hirsutismo	1) Índice de andrógenos libres o testosterona libre 2) Testosterona total 3) DHEAS 4) Androstenediona	Por lo menos que un ovario que tenga: 1) 12 o más folículos (2-9 mm de diámetro) o 2) Volumen mayor de 10 mL

Tal y como se presenta en la Tabla 1, existen fenotipos variables para SOP, teniendo en común al hiperandrogenismo, el cual puede ser evaluado de dos maneras:

- Determinación bioquímica (mediante análisis sérico): en dicha evaluación se determinan las concentraciones hormonales involucradas en el ciclo ovulatorio, así como andrógenos, principalmente, androstenediona, dehidroepiandrosterona (DHEA) y testosterona (libre y/o total).
- Hiperandrogenismo clínico: en esta determinación se evalúa la presencia y el grado de hirsutismo (presencia de vello en zonas asociadas al género masculino) mediante el uso de una escala visual (Fig. 1).

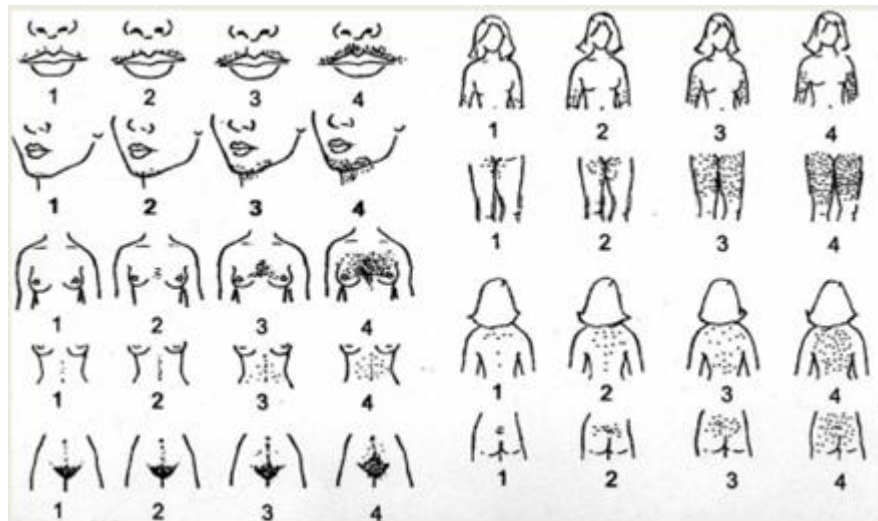


Figura 1. Clasificación del hirsutismo. Se muestran los grados de hirsutismo siendo grado 1 (mínimo) a grado 4 (virilización). Para determinar si se trata realmente de hirsutismo androgénico se realiza una suma de todas las áreas: un índice mayor o igual a ocho es un diagnóstico de hirsutismo (modificado de Valencia, 2006).

La presencia de hirsutismo es indicativo de niveles elevados de testosterona, generando así un fenotipo masculino. Es importante mencionar que no todas las mujeres con SOP presentan hirsutismo, ni que el hirsutismo es indicativo de SOP, por lo que no es un signo crucial para el diagnóstico; además de que se ha encontrado que la prevalencia de hirsutismo en mujeres con SOP es del 60 % (Carmina et al., 2010). Por otra parte, al ser un signo de tipo estético, muchas de las ocasiones este hallazgo es modificado por las pacientes (depilación)(Valencia, 2006).

Los criterios siguientes, morfología del ovario y trastornos menstruales, evalúan la función ovárica mediante el progreso del ciclo ovulatorio y la maduración del mismo. Actualmente existen diferentes fenotipos de SOP dependientes de los signos que se presenten dentro de las clasificaciones aceptadas (Fig. 2).

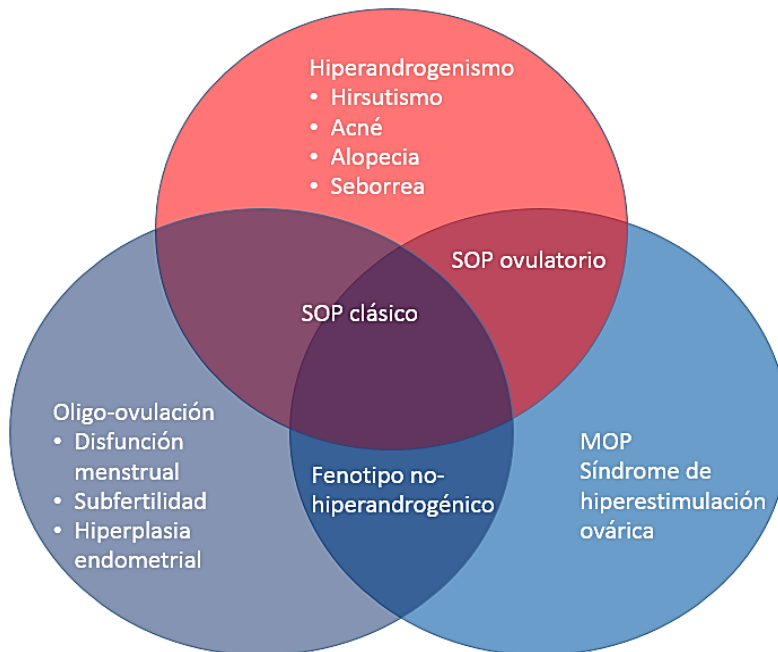


Figura 2. Fenotipos del SOP. Se observan los tres fenotipos principales del SOP de acuerdo con las manifestaciones clínicas que se presentan. Otros autores consideran necesario la presencia de un hallazgo en la funcionalidad ovárica para determinar otros subfenotipos (modificado de Escobar-Morreale, 2018). MOP, morfología de ovario poliquístico; SOP, síndrome de ovarios poliquísticos.

Un aspecto importante de la disfunción ovárica observada en pacientes con SOP radica en que dicha disfunción incrementa la probabilidad de presentar patologías ginecológicas (como infertilidad) y en casos más complejos se considera un factor de riesgo para desarrollar cáncer endometrial, principalmente por alteración del ciclo endometrial (Ding et al., 2018; Indhavivadhana et al., 2018). Por otra parte, la disfunción ovárica no es el único signo de relevancia dentro del cuadro patológico del SOP, es importante destacar la presencia de una disfunción metabólica, esto atribuido principalmente por una resistencia a la insulina que a su vez genera una hiperinsulinemia compensatoria; dada esta condición, el SOP es un factor de riesgo para diabetes mellitus II (DM II) y por consecuente para padecer síndrome metabólico (Escobar-Morreale, 2018).

De acuerdo al consenso de Rotterdam de 2003, cada punto a evaluar puede tener otra posible causa independiente del SOP y dado que existen otras enfermedades que comparten y/o coexisten con esta patología, el diagnóstico definitivo de SOP se debe realizar al excluir otras enfermedades, por lo que es importante realizar los siguientes

estudios para confirmar o descartar otra patología (Aulinas et al, 2014; Merino et al., 2015) (Tabla 2):

1. Estudio ultrasonográfico para determinar la presencia o ausencia de quistes en los ovarios.
2. Determinaciones séricas de marcadores asociados a la disfunción del eje hipotálamo-hipófisis para descartar otra patología que afecte los niveles séricos hormonales.
3. Prueba de resistencia a la insulina y curva de tolerancia a la glucosa para descartar DM II.
4. Diagnóstico diferencial de hiperplasia suprarrenal de aparición tardía, el cual excluye la presencia de síndrome de Cushing que puede alterar el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenales generando hipercortisolismo.
5. Diagnóstico diferencial de cáncer de ovario para descartar que la disfunción ovárica se deba a esta patología.

Una vez que se han descartado otras patologías durante el diagnóstico diferencial de la enfermedad, se da paso a caracterizar el fenotipo del SOP. En particular, es de interés la hipersecreción androgénica por parte del ovario que se manifiesta clínicamente como acné o hirsutismo, que a su vez junto con la disfunción ovárica (además de la presencia de quistes) que se manifiesta como trastornos anovulatorios, dan paso al diagnóstico definitivo de SOP (Azziz et al., 2016).

Entre los niveles hormonales que se encuentran alterados en pacientes con SOP se destacan aquellos que están implicados directamente con la funcionalidad del ovario, tal es el ejemplo de la hormona foliculoestimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), progesterona y testosterona. Esta última hormona es de gran importancia ya que, al ser una hormona sexual masculina sus concentraciones en la mujer deben ser bajas (entre 1- 19 pg/mL). El aumento de las concentraciones de testosterona en estas pacientes denota un aumento en la actividad ovárica (el mecanismo asociado está descrito con más detalle en el apartado 2.2.2), así como también, una posible disminución en la actividad de aromatasa o bien una disminución en la cantidad sérica de la globulina de unión a

hormonas sexuales (SHBG). Los niveles disminuidos de SHBG se reflejan en los resultados del perfil hormonal y es consistente con los niveles elevados de androstenediona, dehidroepiandrosterona (DHEA) y testosterona característicos de las mujeres con SOP. Tal y como se observa en la Tabla 2, los valores de referencia de andrógenos en la mujer son bajos, sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, dichos valores son alterados por la actividad ovárica en pacientes con SOP (Baptiste et al., 2010).

Tabla 2. Pruebas a realizar para el diagnóstico confirmatorio de SOP.

Prueba o estudio	Valores de referencia*	Interpretación
Perfil hormonal	<ul style="list-style-type: none"> • DHEA: 130-980 ng/dL (4.5 – 34 nmol/L) • Hormona folículo estimulante (FSH): Fase folicular 3.0 – 20 mU/mL Fase ovulatoria 9.0 – 26.0 mU/mL Fase lútea 1.0 – 12.0 mU/mL • Hormona Leutinizante (LH): Fase folicular 2.0 – 15 mU/mL Fase ovulatoria 22.0 – 105.0 mU/mL Fase lútea 0.6 – 19.0 mU/mL • Relación LH/FSH: mayor a 2 • Estradiol: Fase folicular 20.0 – 145 pg/mL Fase ovulatoria 112 – 443 pg/mL Fase lútea 20 – 241 pg/mL • Estrona: Fase folicular 50 pg /mL Fase lútea 200 pg/mL • Globulina de unión a hormonas sexuales (SHBG) 30 – 135 nmol/L • Insulina: 2 – 20 U/mL • Progesterona: Fase folicular 0.1 ng/mL • Prolactina: 1.9 – 25.0 ng/mL • Testosterona: Total 20 – 80 ng/dL Libre 1 – 19 pg/mL • Hormona estimulante de tiroides (TSH) 0.34 – 4.25 µU/mL 	<p>En mujeres con SOP generalmente todos estos valores se encuentran alterados, principalmente se observa: Un aumento gradual en LH y una disminución relativa de FSH, por lo que la relación LH/FSH aumenta en proporción mayor a dos. Se presenta una disminución de SHBG, lo que genera un aumento en las concentraciones séricas de hormonas libres, principalmente de testosterona, a lo que se le atribuye el hiperandrogenismo (Azziz et al., 2016).</p> <p>Un aumento gradual en la concentración de insulina debido a la resistencia a la insulina sistémica no siempre es un hallazgo presente en mujeres con SOP (de entre el 70-90 %). (Azziz et al., 2016; Escobar-Morreale, 2018)</p>
Disfunción del ovario	Dicha evaluación no es una prueba clínica, sin embargo, este parámetro es determinado mediante la entrevista con la mujer, siendo un valor de referencia de 12 a 13 ciclos menstruales por año.	Se evalúa la funcionalidad del ovario de manera indirecta considerando la “eliminación” de un óvulo que culmina con el sangrado, al no haber sangrado es indicativo de que el ovario no presenta su ciclo correspondiente.
Morfología del ovario	Durante dicho estudio se realiza el ultrasonido intravaginal, la cual no debe presentar formaciones anormales o quistes.	Este estudio junto con el anterior determina la presencia de SOP.

*Valores de referencia obtenidos de <https://www.reproduccionasistida.org>. Se muestran los niveles hormonales a lo largo del ciclo menstrual.

2.1.2 Endometrio, estructura y función.

El endometrio es la capa mucosa que recubre la cavidad uterina en mujeres no embarazadas. Dicha mucosa presenta un grosor variable de 0.5 mm a 5 mm, el cual está en función de la fase del ciclo ovárico-endometrial. El endometrio sano se divide principalmente en dos capas (funcional y basal) Fig. 3 (Barber et al., 2015; Ricardo et al., 2004):

1. Capa basal: Compuesta principalmente por vasos sanguíneos.
2. Capa funcional: Constituida principalmente por células epiteliales, células glandulares y células estromales (tejido mesenquimal).

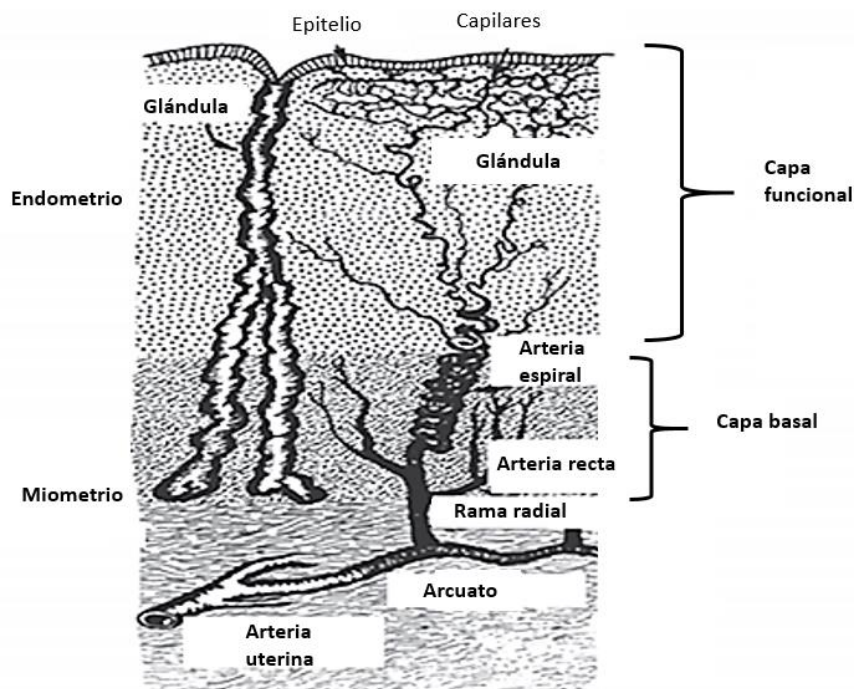


Figura 3. Estructura del endometrio. En el esquema se observan las dos principales capas del endometrio, siendo la parte basal aquella que permanece a través de todo el ciclo menstrual y es la capa encargada de efectuar la angiogénesis (Modificado de Simón, 2009).

Como se observa (Fig.3), la capa funcional es la más externa, la cual es fragmentada (aproximadamente dos terceras partes de la capa) y eliminada durante el final de la fase secretora para una posterior regeneración por efecto estrogénico en la nueva fase proliferativa (Ricardo et al., 2004). Durante el transcurso de la fase secretora temprana disminuye la proliferación de las células estromales por disminución de los niveles de

estrógenos y por aumento de progesterona, permitiendo la decidualización del endometrio y favorecer la implantación del embrión por su interacción con células deciduales.

2.1.3 Características del endometrio y el ciclo ovárico-endometrial.

Se ha demostrado que existe un dinamismo entre el ovario y el endometrio (Ullah et al., 2017). De manera general, el ovario secreta niveles fluctuantes de andrógenos y estrógenos, siendo los más representativos, el estradiol y la progesterona, los cuales inducen la proliferación y la decidualización del endometrio, respectivamente (Fig. 4).

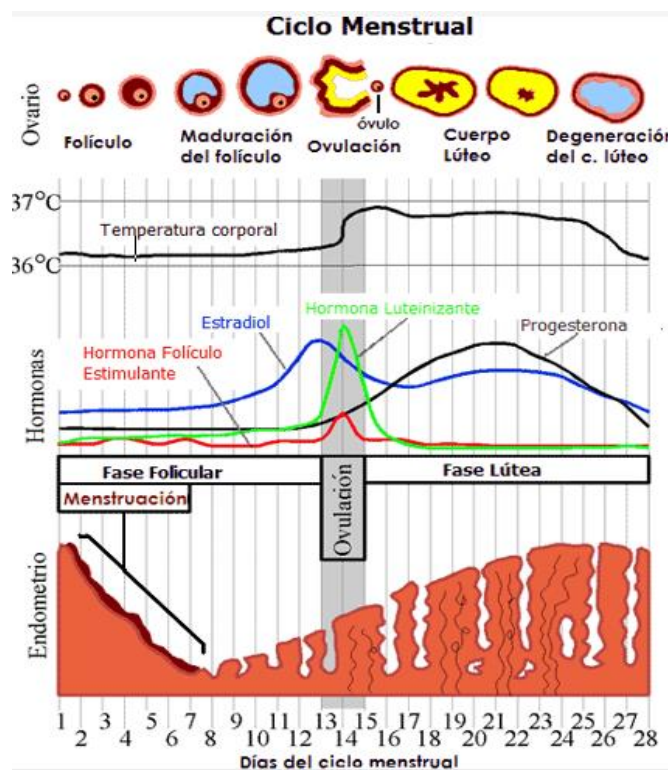


Figura 4. Secreción hormonal durante ciclo menstrual. El ciclo menstrual puede dividirse en dos partes, siendo la primera a nivel de ovario y la segunda a nivel de endometrio. En la fase folicular se lleva a cabo la maduración y selección del folículo dominante, así como la proliferación del endometrio debido al incremento de estradiol. Posteriormente, en la fase lútea los niveles circulantes de progesterona aumentan por el cuerpo lúteo, llevando al endometrio a un estadio secretor (modificado de www.sexualidad.es).

2.1.4 Ciclo endometrial.

Durante la primer fase del ciclo menstrual, que abarca de los días 1 al 14, existe una secreción predominante de FSH por parte de la hipófisis, que favorece la formación, maduración y selección del folículo dominante en el ovario, el cual a su vez secreta estrógenos y promueve el engrosamiento del endometrio (endometrio proliferativo) (Vázquez et al., 2015). En esta etapa existen tres procesos importantes:

1. Fragmentación y descamación del endometrio: Al no existir fertilización del óvulo (y por tanto señales para generar implantación), la capa funcional del endometrio comienza a fragmentarse para comenzar con su regeneración en el nuevo ciclo por efecto de estradiol.
2. Vascularización: Durante esta etapa se restaura la superficie de la capa funcional y existe una revascularización de la misma.
3. Proliferación: Las células epiteliales superficiales adquieren numerosas microvellosidades que aumentan el área superficial epitelial, además de existir una proliferación de células mesenquimales estimuladas por efecto de estrógenos.

Posterior a los 14 días comienza la fase lútea en el ovario, con una ventana que abarca de los días 14 a 28. Durante esta fase se libera un óvulo del folículo por estímulo de la LH, dando paso a la generación del cuerpo lúteo; este punto es importante ya que el cuerpo lúteo comienza a crecer generando progesterona, que inducirá cambios morfológicos y funcionales en el endometrio volviéndolo más receptivo para la implantación (decidualización). Si durante esta etapa no existe fertilización del óvulo, los niveles circulantes de estrógenos y progesterona disminuyen, lo que a su vez genera la regresión y degeneración del cuerpo lúteo. Finalmente, al no existir una inhibición para la secreción de FSH por los estrógenos, dicha hormona inicia el nuevo ciclo menstrual mediante el “reclutamiento” de nuevos folículos (Ricardo et al., 2004; Vázquez et al. 2015).

Los procesos anteriormente descritos se alteran en mujeres con SOP, principalmente se ha caracterizado el fenotipo de SOP por un estancamiento en la fase proliferativa hablando en términos de endometrio y un exceso en la producción de folículos ováricos atribuidos por una desregulación en la relación LH/FSH (Azziz et al., 2016)

2.1.5 Relación endometrio-SOP.

Actualmente, se ha encontrado evidencia en la cual se demuestra que el ovario no es el único tejido que se afecta durante la patología, a nivel morfológico y funcional el endometrio es modificado indirectamente por la disfunción ovárica (Ricardo et al., 2004), así como también diversos autores han identificado los cambios moleculares en el endometrio mediante la evaluación de la expresión diferencial de diversas proteínas involucradas en receptividad, proliferación endometrial, metabolismo de glucosa y resistencia a la insulina, entre otros (Barber et al, 2015; Rosas et al., 2016; Wallace et al., 2011). Dado lo anterior, se ha centrado la atención en evaluar los cambios que presenta el endometrio de mujeres con SOP.

Durante cada ciclo menstrual existe una comunicación endocrina entre el ovario y endometrio, dando como resultado el dinamismo entre ambos tejidos (Fig. 5), por otra parte, durante el SOP existe una alteración en el ciclo ovárico que se expande a una alteración a nivel de endometrio (Ricardo et al., 2004).

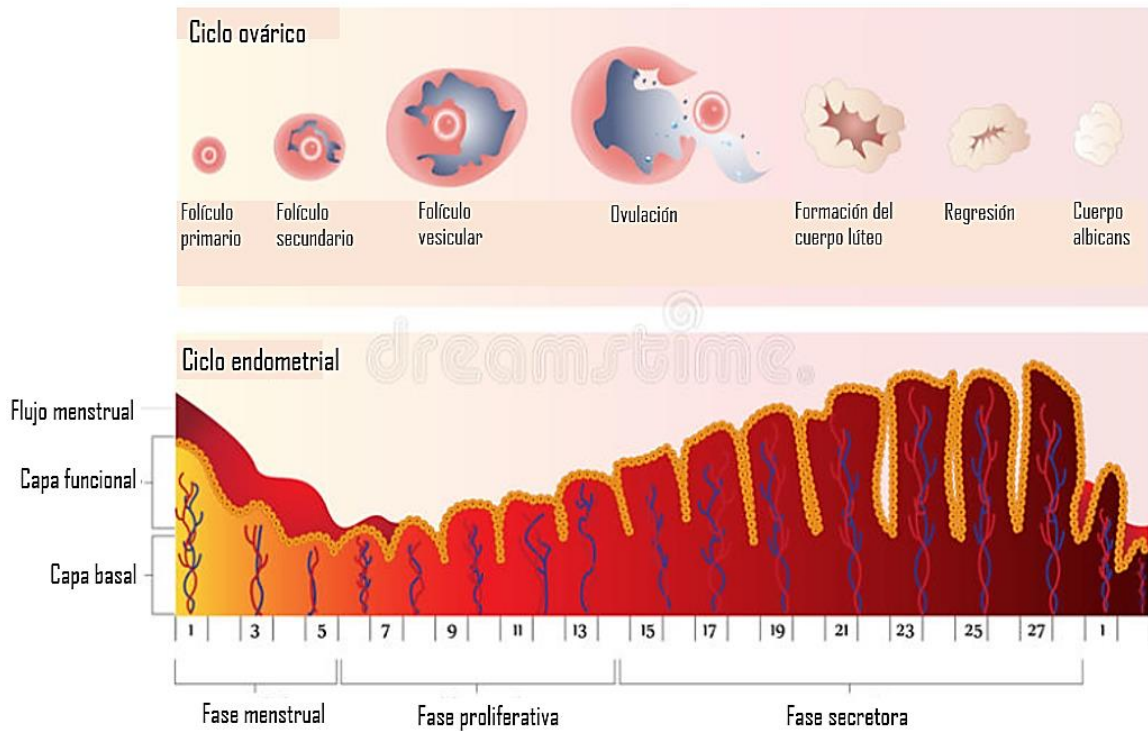


Figura 5. Ciclo ovárico-endometrial. Representación esquemática del proceso simultáneo de maduración y secreción del óvulo, aunado al ciclo endometrial y desarrollo de sus fases en un ciclo menstrual normal (modificado de <https://es.dreamstime.com> ver Anexo A-10.2).

El desbalance de la regulación hormonal en la patología tiene efectos variables, tal es el caso de resistencia a la insulina, el cual es un factor que predispone a otras patologías como DM II, dislipidemias y síndrome metabólico (Pulido et al., 2016). Una de las características del SOP es que existe una alteración a nivel metabólico que compromete a diversos tejidos como hígado, músculo esquelético y tejido adiposo (Baptiste et al., 2010; Rosenfield et al., 2016), lo que sugiere que el endometrio también puede presentar afectaciones debido a que es un tejido metabólicamente activo.

2.2 Insulina.

La insulina es una hormona polipeptídica de 6 KDa codificada por el gen *INS* que se localiza en la región 5 de la banda 15 del brazo corto del cromosoma 11 (11p15.5). Dicha hormona se sintetiza y se secreta hacia la circulación por las células β pancreáticas de los islotes de Langerhans (Fig. 6); cumple las funciones principales de estimular la entrada de glucosa a las células mediante el movimiento vesicular del acarreador de glucosa *SLC2A4* o también llamado GLUT4 (García, 2016). Dado lo anterior, el consumo

de glucosa dependerá de las acciones de la insulina en aquellos tejidos que expresen receptores de tipo GLUT4 (entre otros).

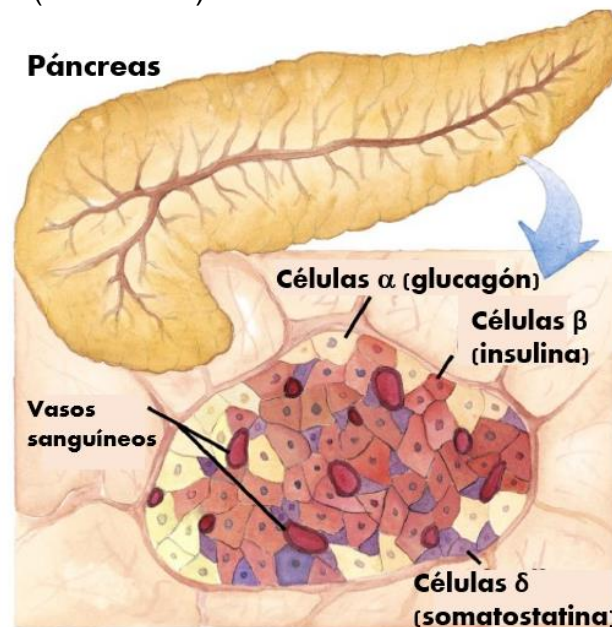


Figura 6. Ubicación de células beta. El islote de Langerhans se considera como la parte funcional endocrina dentro del páncreas (entre otras regiones), ya que dentro del mismo se hallan agrupadas tres tipos de células: células α cuya función principal es la secreción de glucagón, células β que secretan insulina y las células δ cuya secreción es la somatostatina (imagen obtenida de <http://meetgenes.blogs.uv.es>, ver anexo A-10.3).

Por otra parte, el endometrio al ser un tejido con alta actividad a lo largo del ciclo menstrual, sus demandas energéticas son elevadas, por lo que además, se ha demostrado que en dicho tejido se expresan receptores de la familia de los acarreadores de soluto (SLC) (von et al., 2003), lo que evidencia que la insulina ejerce un papel importante a nivel de endometrio.

2.2.1 Vía de señalización de insulina.

La vía de la insulina al igual que cualquier vía molecular de señalización es bastante compleja, sin embargo, se pueden resaltar dos eventos importantes los cuales son característicos de una actividad adecuada de la vía.

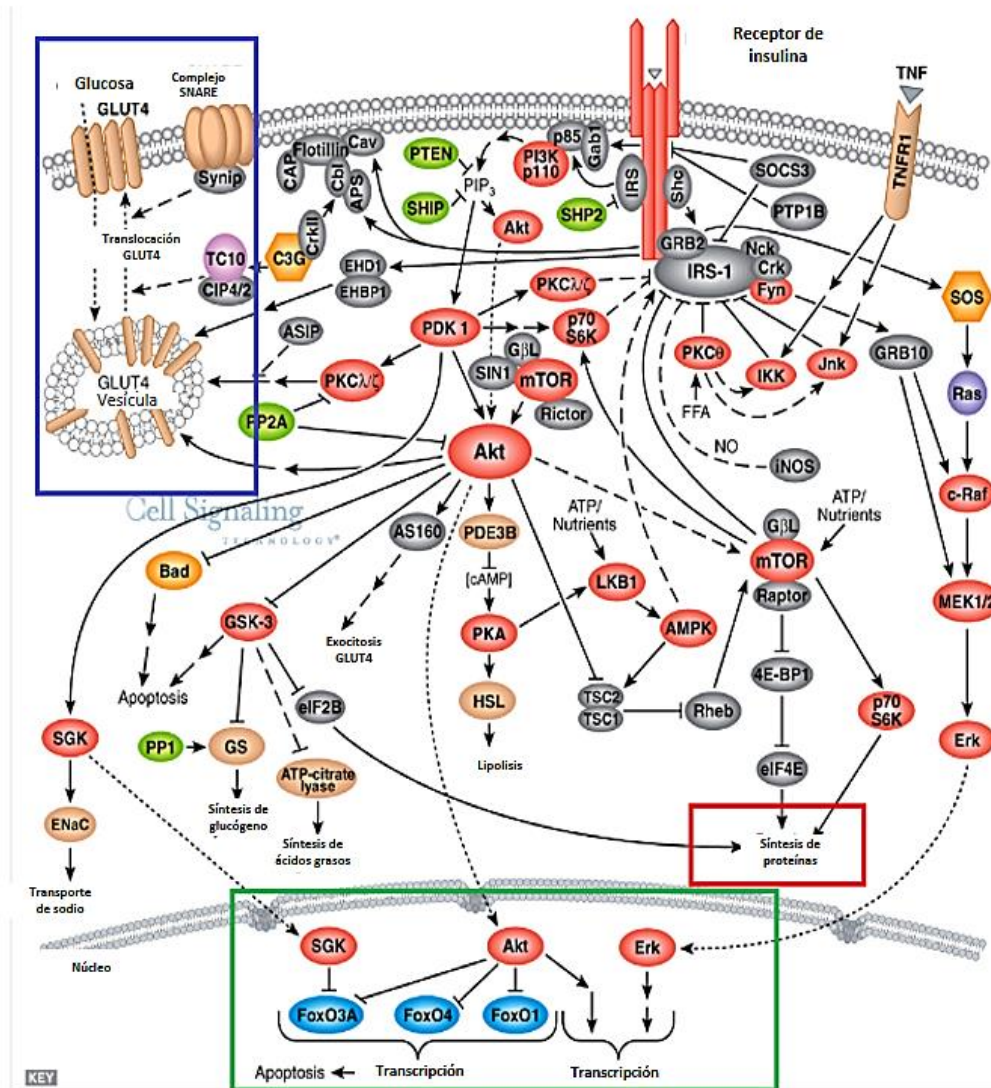


Figura 7. Vía de señalización de insulina. Esquema que muestra la cascada de señalización molecular que se activa cuando la insulina es reconocida y unida a su receptor (IR). Durante esta cascada ocurren tres procesos principales: el primero (cuadro morado) consiste en la movilización de las vesículas que contienen al receptor GLUT4 hacia la membrana extracelular. El segundo (cuadro verde) consiste en la activación de factores de transcripción; para esta vía destaca el factor de transcripción FOXO el cual induce la transcripción de diversos genes que codifican para proteínas involucradas en el metabolismo de la glucosa. El tercero (cuadro rojo) consiste en promover la síntesis de proteínas involucradas en diferentes procesos celulares como proliferación, apoptosis, entre otros (modificado de Cell signaling <http://www.cellsignet.com/research.html>, ver anexo A-10.4).

Como se presenta en la Fig.7 y centrado en contexto, existen dos mecanismos primordiales de la acción de insulina, los cuales van de acuerdo a la cascada de señalización:

-
1. La vía dependiente de fosfoinositol-3-cinasa (IP3K): una vez que la insulina se une en la subunidad alfa de su receptor (sitio de fijación de la insulina), dicho receptor se autofosforila en un residuo de tirosina (García Sainz, 2016). Este evento genera la fosforilación del sustrato del receptor de insulina (IRS), lo que promueve la formación del complejo fosfo-IRS-1-IP3K(p-IRS/IP3K) para generar inositol trifosfato (IP3), el cual actúa como segundo mensajero para activar a la fosfatasa PDK1 que a su vez activa a la proteína-cinasa B (también conocida como AKT, participa en la vía mitógena) y a la proteína cinasa C (PKC, principalmente a la isoforma lambda), que activa mediante fosforilación al miembro de la familia de dominios TBC14 (AS160) y finalmente permite la movilización de las vesículas con GLUT4 hacia la membrana extracelular (Míinea et al., 2005).
 2. Mitogénica: esta vía se activa simultáneamente por la generación de IP3 que activa a la proteína cinasa-treonina (AKT). Durante la activación de esta vía, la fosforilación de IRS-1 promueve el reclutamiento de proteínas acopladoras como las proteínas, Proteína transformadora1 (SHC) y la proteína de unión 1 asociada a GRB2 (GAB1), las cuales favorecen la unión del complejo GRB2/SOS (Factor recambiador de nucleótidos de guanina), para posteriormente activar a las proteínas RAS y RAF1 (mediadores de señales intracelulares) para finalmente activar a la proteína cinasa de doble especificidad (MEK), la cual activa a las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) (Laviola et al., 2007).

Cabe mencionar que esta vía de señalización se lleva a cabo en todas las células, siendo de principal estudio las células de tejido adiposo y células de músculo esquelético, debido a que en estados patológicos (principalmente por resistencia a la insulina) dichas células han presentado cambios en la expresión a nivel de mensajero y de proteína de las moléculas involucradas en la vía (Zhang et al., 2014).

2.2.2 Resistencia a la insulina en mujeres con SOP.

La resistencia a la insulina es una de las principales complicaciones del SOP, la cual conlleva a hiperinsulinemia compensatoria en la mayoría de las ocasiones. Aproximadamente el 60% de mujeres que presentan SOP también manifiestan hiperinsulinemia y/o resistencia a la insulina (Azziz et al., 2016). A pesar de que la

resistencia a la insulina no es un signo para el diagnóstico de SOP, se ha propuesto una asociación directa entre la hiperinsulinemia y el hiperandrogenismo (Baptiste et al., 2010; Barber et al., 2015).

A pesar de que aún no se han descrito los mecanismos moleculares por los cuales se unen dichos eventos, se ha demostrado en modelos *in vitro* que existe una actividad sinérgica entre los niveles de LH y la misma hiperinsulinemia (Fig. 8). Por otra parte, se ha demostrado que la insulina dentro del ovario también promueve un arresto pre-folicular (Barber et al., 2015).

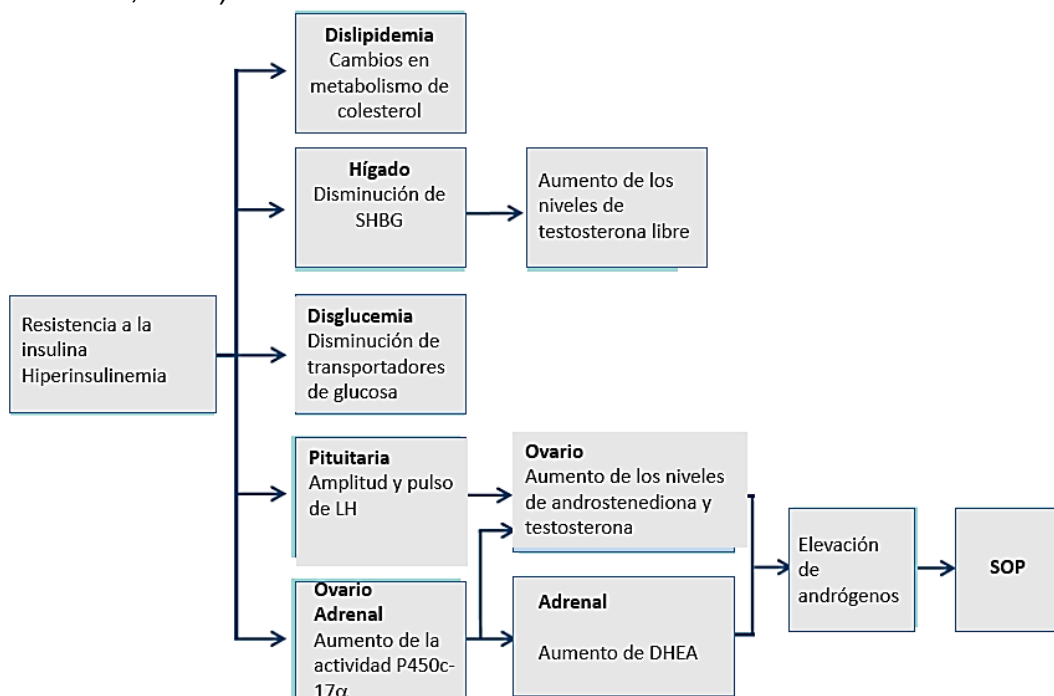


Figura 8. Relación de hiperinsulinemia con hiperandrogenismo. La resistencia a la insulina tiene dos implicaciones importantes en SOP: la primera a nivel metabólico afectando el metabolismo de glucosa que posteriormente compromete al metabolismo de colesterol, este último, siendo importante para la síntesis de hormonas. El segundo evento de relevancia es la afectación directa en la síntesis de hormonas y los niveles séricos de las mismas (modificado de Baptiste, et al., 2010).

Se ha demostrado que los niveles hormonales de andrógenos en la mujer dependen de la actividad del ovario y de la glándula adrenal, los cuales contribuyen en un 60% y 40%, respectivamente (Baptiste et al., 2010). En estados fisiológicos no patológicos, la mayoría de los andrógenos son transformados a estrógenos. Las secreciones hormonales de

andrógenos dependen en gran medida de la expresión del gen *CYP17A1*, el cual codifica una enzima microsomal que determina el tipo de hormona a sintetizar ya sea mineralocorticoide, glucocorticoide u hormona sexual (Bremer et al., 2008). Es importante resaltar que los niveles elevados de insulina estimulan a la glándula adrenal y favorecen la síntesis de andrógenos, que a su vez son sintetizados por las células de la theca del ovario, las cuales también contienen a la enzima esteroide 17-alfa-hidroxilasa / 17,20 liasa (*CYP17A1*). Por otra parte, al existir la estimulación de las células theca por la elevación de los niveles de LH y la estimulación de la glándula adrenal por efecto de la insulina, se favorece una hipersecreción de andrógenos a nivel sistémico (Rosenfield et al., 2016). Con la alteración de dichos procesos y una probable disminución de la actividad de la aromatasa (*CYP19A1*), se da paso a complicaciones mayores atribuidas por este desbalance entre la cantidad de andrógenos y estrógenos. Por otra parte, los niveles elevados de andrógenos estimulan a las células beta pancreáticas, propiciando un desbalance que carece de mecanismos auto-reguladores.

2.2.3 Alteraciones en la activación de la vía de la insulina en pacientes con SOP.

En diversos estudios se ha evaluado la importancia del estado de fosforilación en los residuos de tirosina (Tyr) tanto en el receptor de insulina (IR) como en IRS-1, dado que estas proteínas son las iniciadoras de la vía, de forma que esto puede indicar si la vía de la insulina está activa o reprimida (Fig. 9). Los hallazgos realizados en mujeres con SOP revelaron que existe una alteración en la vía dependiente de IP3K de la insulina en células de músculo esquelético. Además se demostró que tanto IR como IRS-1 están fosforiladas en residuos de serina en la posición Ser¹⁰⁰ (sitio catalítico) y Ser³¹², respectivamente, que a su vez está relacionado con la inactivación de la vía (Seow et al., 2007).

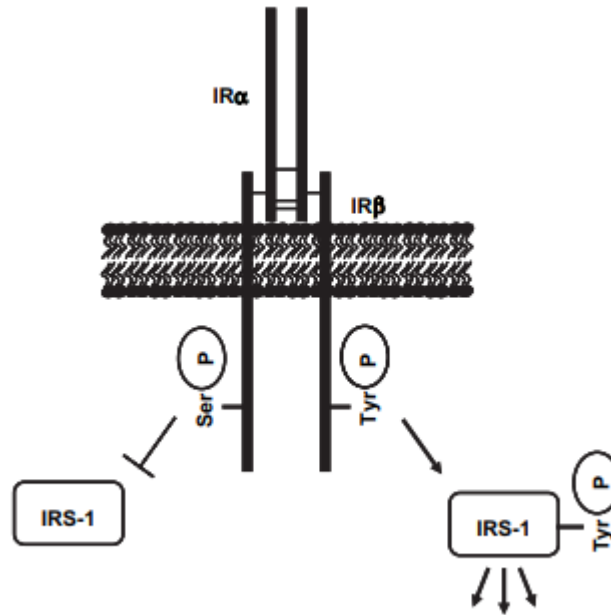


Figura 9. Efectos por la fosforilación de IR e IRS-1. Se ha caracterizado que la activación de la vía de insulina inicia por la fosforilación de los residuos de tirosina en IR e IRS-1 (Bremer et al., 2008).

Al existir esta deficiencia de la actividad de la vía de la insulina, se generan complicaciones asociadas al SOP como hiperinsulinemia (aproximadamente 60% de los casos), por lo que la mayoría de las mujeres con SOP presentan además obesidad u otros trastornos metabólicos que involucran alteraciones en el metabolismo de colesterol o ácidos grasos (principalmente LDL), lo que conlleva a la activación de proteínas denominadas serin/treonin cinasas que favorecen la fosforilación de residuos de serina. Se ha propuesto que dichas serin/treonin cinasas son las encargadas de inhibir la vía de señalización de insulina por inactivación a nivel de la proteína AKT o bien el subsecuente AS160 en mujeres obesas que presentan SOP (Baptiste et al., 2010). Por lo tanto, se genera una deficiencia en las actividades de la insulina que a su vez puede agravar el estado de resistencia a la insulina por modificaciones post-traduccionales principalmente en el receptor de insulina e IRS-1.

Se ha demostrado experimentalmente que la resistencia a la insulina es afectada por distintos procesos biológicos como defectos en la fosforilación de proteínas involucradas en la vía (Bremer et al., 2008) o disminución de la expresión de genes, tal es el caso de la expresión de *INSR* que se encuentra disminuida en células theca de pacientes con SOP (McAllister et al., 2015), dando paso a suponer que otra probable causa de una

“deficiencia” en la vía es la alteración en los niveles de expresión de los genes involucrados en dicha señalización. Por otra parte, en otro estudio se estableció que existen cambios epigenéticos (metilación) en el gen *INSR* en tejido adiposo de pacientes con SOP (Jones et al., 2015), lo que sugiere una importante participación de los mecanismos epigenéticos. Sin embargo, en la actualidad son pocos los estudios que han caracterizado de manera particular si existen cambios en la expresión de genes involucrados en la vía de señalización de la insulina bajo condiciones controladas, y sobre todo en tejidos específicos, tal es el caso del endometrio.

2.3 Tratamiento para SOP.

Debido a la heterogeneidad de los síntomas asociados con el SOP y las complicaciones que se pueden presentar, los tratamientos son diversos de acuerdo con las necesidades de cada paciente (Tabla 3). Dado que la enfermedad afecta la salud reproductiva y principalmente a mujeres jóvenes, los esquemas de tratamiento se centran primordialmente en restaurar la fertilidad (Valencia, 2006).

Tal y como se observa en la Tabla 3, los tratamientos se pueden agrupar principalmente en tres líneas siendo selectivo para las características que se presentan en cada paciente (Azziz et al., 2016; Baptiste et al., 2010; Carmina et al., 2010; Valencia, 2006).

Tabla 3. Tratamientos para SOP.

Primera línea (farmacológico).	Segunda línea (farmacológico).	Tercera línea (o farmacológico).
Bloqueadores del receptor de andrógenos: <ul style="list-style-type: none"> • Espironolactona • Flutamida • Ciproterona 	Con impacto metabólico: <ul style="list-style-type: none"> • Tiazolidinediona • Metformina 	<ul style="list-style-type: none"> • Cambio en hábitos alimenticios y ejercicio. Dicho tratamiento se usa en combinación primordialmente con los de segunda línea para mejorar la progresión de la patología.
Agentes estimulantes de la ovulación: <ul style="list-style-type: none"> • Progesterona • Acetato de clomifeno • Oestrógeno 		

De los fármacos con impacto metabólico más empleados para el tratamiento del cuadro patológico de SOP, son aquellos que tienen actividades como sensibilizantes de la insulina, tal es el caso de metformina (Valencia, 2006).

2.3.1 Metformina.

La metformina (Fig. 10) es un fármaco hipoglucemiante que se administra vía oral y es empleado para el tratamiento y prevención de DMII. Dicho fármaco se caracteriza principalmente por su actividad como “sensibilizante” de la insulina (Ortega Millan., 2015), esto mediante la activación de la proteína cinasa activada por adenosín monofostato (AMPK).

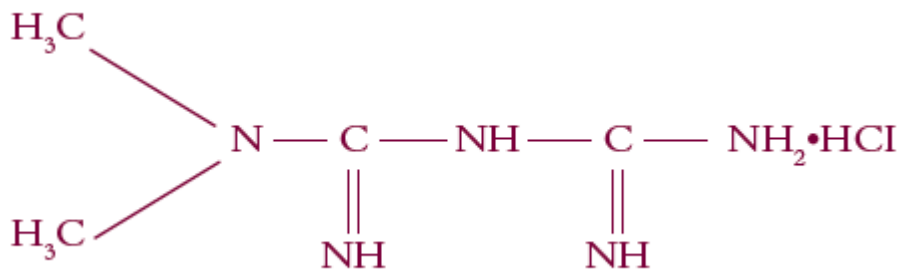


Figura 10. Estructura de metformina. Estructuralmente consta de dos grupos guanida fusionados (biguanida) (modificado de Ortega Millan., 2015).

Actualmente, en estudios recientes se demostró que el tratamiento con metformina tiene gran impacto en diferentes patologías, por ejemplo, se ha establecido que posee propiedades anti-tumorales en modelos *in vitro* y en estudios con pacientes (Afzal et al., 2018; Arima et al., 2018; Richards et al., 2018). Sin embargo, se han propuesto otras actividades de este fármaco como agente inductor de la ovulación en pacientes con SOP (además de que disminuye la hiperinsulinemia), aunque aún no se ha esclarecido el mecanismo exacto por el cual se ejercen dichos efectos (Abu et al., 2015; Shao et al., 2014). Es importante mencionar que los efectos descritos en mujeres con SOP son atribuidos a una terapia conjunta de metformina con dieta y/o ejercicio (Tabla 3).

2.3.2 Farmacocinética de la metformina.

La metformina es un fármaco del grupo III dentro de la clasificación biofarmacéutica (alta solubilidad, baja permeabilidad) (Crison et al., 2012), sin embargo, a pesar de pertenecer

a este grupo, se ha demostrado que posee un volumen de distribución favorable que abarca de 63 a 276 L (Garduño, 2009). La absorción de metformina se lleva a cabo en intestino delgado, la cual es lenta siendo aproximadamente de 2.6 h y en un máximo de 6 h en dosis única; a pesar de que la metformina actúa principalmente a nivel hepático, dicho fármaco no sufre biotransformación, por lo que es eliminada en su forma activa, teniendo un tiempo de vida media (considerando la administración oral) de 4.0 a 7.8 h en dosis de 0.5 g a 1.5 g (Garduño, 2009)

2.3.3 Mecanismo de acción de la metformina.

La actividad principal de la metformina es a nivel hepático mediante la inhibición de la expresión de los genes que participan en el proceso de gluconeogénesis (Cao et al., 2014), lo que favorece el consumo de glucosa presente en circulación. Dicho mecanismo de acción se debe a que la metformina induce la activación de AMPK a través de la fosforilación en el residuo α Thr 172 (Carvajal et al., 2013), lo que a su vez activa la vía de señalización dependiente de AKT para promover la movilidad de vesículas que contienen al transportador de glucosa dependiente de insulina GLUT4 (Lee et al., 2012) e inhibiendo la expresión de moléculas lipogénicas (Zhou et al., 2001), entre otras acciones. Sin embargo, se ha demostrado que la metformina también tiene efectos en otros tejidos, principalmente en tejido adiposo y músculo esquelético (Arner et al., 2018; Lee et al., 2012; Ortega, 2015).

2.3.3.1 Transporte celular de la metformina.

Como ya se mencionó con anterioridad, la metformina actúa sobre otros tejidos diferentes al hepático y dado que este fármaco no sufre modificaciones por metabolismo hepático, la forma activa entra en circulación periférica (Garduño, 2009). La metformina se encuentra en forma iónica (catión) en pH fisiológico, por lo que es blanco de los transportadores de cationes orgánicos (OCT), los cuales se ha demostrado se expresan en hígado, músculo esquelético, tejido adiposo y endometrio. Dichos transportadores son de gran relevancia ya que permiten la introducción de la metformina dentro de la célula para que posteriormente se induzca la activación de AMPK (Shu et al., 2007). Estos transportadores pertenecen a la familia de acarreadores de solutos (SLC) que se expresan de manera diferencial en diversos tejidos como el hepático y el renal, que

expresan mayoritariamente OCT1 (SLC22A1). En tejido adiposo predomina la expresión de OCT3 (SLC22A3) (Arner et al., 2018), mientras que, en placenta y endometrio se ha demostrado la expresión de OCT1-3, así como también la expresión de los transportadores encargados de la eliminación de metformina, como la proteína de extursión de toxinas y multifármacos (MATE) (Kovo et al. 2008; Shao et al., 2014).

2.3.4 Actividad de metformina en endometrio.

Tal y como se ha descrito con anterioridad, la metformina actúa como sensibilizante de la insulina por sus actividades anti-hiperglucemiantes, mediante la activación de AMPK y la modulación de la vía de insulina (Ortega Millán, 2015). Por otra parte, se ha demostrado que el endometrio es un tejido sensible que responde a insulina (Giudice, 2006), además de que se ha establecido que el endometrio humano también expresa a GLUT4 (María et al., 2010). Lo anterior se ha atribuido al elevado consumo de glucosa que requiere el endometrio, sobre todo durante la especialización de dicho tejido, esto por la secreción de glucógeno y dar paso a un endometrio receptivo (von Wolff et al., 2003). Adicionalmente, se ha demostrado que la metformina actúa de manera directa sobre el endometrio, presentando actividades antitumorales en cáncer de endometrio (Arima et al., 2018; Shao et al., 2014), así como modificando la expresión de moléculas involucradas en el transporte de glucosa (Lee et al., 2012).

2.3.5 Actividad de metformina a nivel epigenético.

Recientemente, se ha demostrado en modelos *in vitro* que la metformina favorece la metilación del DNA mediante la inducción de la expresión del microRNA (let-7), el cual promueve la metilación del DNA (Fig. 11). Dicha actividad, se lleva a cabo mediante la interacción directa de let-7 con el RNA largo no codificante H19 (lncRNA H19), inhibiendo así la actividad inhibitoria de H19 sobre la enzima S-adenosil homocisteinhidrolasa (SAHH), la cual favorece la activación indirecta de la metiltransferasa de DNA tipo tres (DNMT3B) (Zhong et al., 2017).

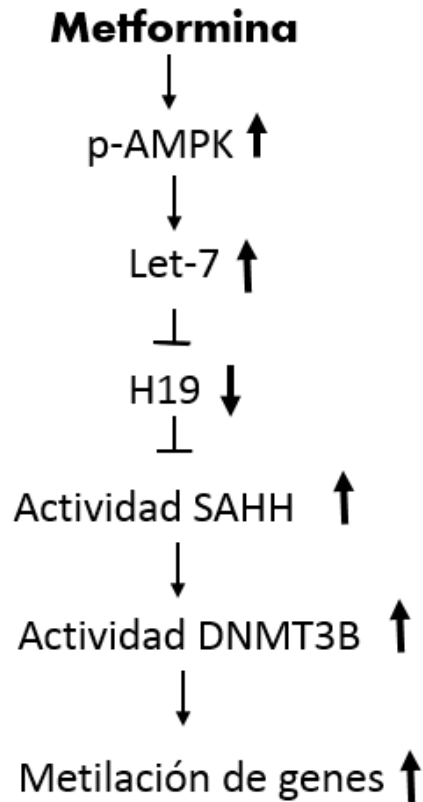


Figura 11. Mecanismo de inducción de la metilación del DNA por efecto de metformina. La metformina favorece la activación del miRNA let-7 a través de AMPK, el cual, bloquea la actividad de lncRNAH19, lo que favorece la actividad de la enzima SAHH, la cual regenera a S-adenosil metionina (AdoMet o SAM), el cual es el donador universal de grupos metilo y sustrato de DNMT, favoreciendo finalmente la activación de la DNMT3b. (Modificado de Zhong et al., 2017)

Con esta evidencia se sugiere que la metformina genera un cambio en los estados de metilación del genoma dependiente de la actividad de DNMT3b.

2.4 Epigenética.

2.4.1 Concepto y definición de epigenética.

El estudio del conjunto de factores moleculares que implican una expresión diferencial fuera del concepto de la genética clásica se le llama epigenética. En la actualidad la epigenética se define como aquellos cambios heredables en la expresión genética que son independientes de la secuencia del DNA (Delgado , 2011).

2.4.2 Epigenética aspectos actuales.

A lo largo del estudio de la epigenética se han encontrado grandes hallazgos, siendo el primero el papel de la epigenética en la regulación de la expresión genética (expresión diferencial), teniendo una gran relevancia en múltiples procesos como la impronta genética, inactivación del cromosoma X, el mantenimiento de la integridad del genoma mediante el silenciamiento de elementos transponibles, entre otros, por lo que también se considera un mecanismo de regulación con gran importancia biológica (Bourc'his et al., 2006; Rodríguez et al., 2004).

2.4.3 Mecanismos epigenéticos de regulación de la expresión génica.

Actualmente, se han descrito cuatro principales mecanismos epigenéticos que juegan el papel de regulación de la expresión génica, sin embargo, el mecanismo molecular por el cual se efectúan dichos cambios (o interacción con otros procesos genéticos) no se conoce por completo. El desarrollo embrionario es el principal blanco de estudio en esta área debido a que durante esta etapa del desarrollo se lleva a cabo la reprogramación epigenética y por tanto se comienza con la expresión diferencial para dar paso a los diferentes linajes celulares (Mahadevan et al., 2017; Wilkins et al., 2008), sin embargo, la participación de los mecanismos epigenéticos está siendo ampliamente estudiada en fenómenos fisiológicos y patológicos.

Los cambios descritos en la epigenética son los siguientes:

- 1 Modificación post-traducciona l de histonas o código de histonas. Estas modificaciones ocurren en el amino terminal de las histonas, o en regiones internas de las mismas. Las principales modificaciones son la acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, sumoilación y ADP-ribosilación (Bourc'his & Viegas-Péquignot, 2006; Delgado-Coello, 2011). Las modificaciones de histonas más estudiadas son la acetilación y metilación, las cuales ocurren principalmente en residuos de lisina, arginina, entre otros. A lo largo de diversos estudios se ha demostrado que estas modificaciones juegan un papel crucial en la disposición de la eucromatina o bien en la compactación de la heterocromatina, siendo así, un marcador epigenético clave que brinda información sobre la

actividad en determinadas regiones genómicas. La histona H3 es una de las más estudiadas por la relación tan estrecha que tiene con la activación o inhibición de la transcripción mediante la metilación de sus residuos de lisina, principalmente los residuos K4, K9, K27 y K36 los cuales pueden estar mono, di o tri metilados, dando así una configuración predeterminada que brinda información sobre regiones transcripcionalmente activas o en su defecto inactivas (Delgado-Coello, 2011).

- 2 Remodelación de la cromatina. Este proceso va muy de la mano con la modificación de histonas, ya que depende de la interacción histona-complejo remodelador, el cual es capaz de cambiar la disposición del DNA en el nucleosoma. Se ha descrito que algunos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP como los complejos SWI/SNF (*Switch/sucrose non fermenting*), que a su vez forman parte de los complejos superiores tipo complejo represor *polycomb (PcG)* y *trithorax (TrxG)*, los cuales generan no solo un cambio en la disposición espacial de la cromatina, sino también una regulación positiva o negativa de la expresión dependiente de distintos factores de transcripción (Bourc'his et al., 2006; Dávalos-Salas et al., 2005; Delgado-Coello, 2011).

- 3 RNAs no codificantes. Este mecanismo de regulación está siendo ampliamente estudiado principalmente por su papel en el desarrollo de cáncer. Dichos RNAs son unidades funcionales dentro del genoma que se transcriben, pero no se traducen en proteínas. Dentro de este grupo se encuentra una gran variedad de RNAs no codificantes como microRNA (miRNA), RNA de transferencia (tRNA), lncRNA, entre otros (Law et al., 2018) . Estos RNAs no codificantes participan en una gran variedad de funciones de importancia biológica como lo es la regulación de la expresión génica. El impacto de su actividad es notable en el desarrollo de algunas patologías como cáncer, en metabolismo, diferenciación sexual y otros procesos (Desmettre, 2018; Neve et al., 2018).

-
- 4 Metilación del DNA. En eucariontes superiores este proceso se realiza principalmente en citosina, la cual está unida por un enlace fosfodiéster con guanina (denominado dinucleótido CpG). Dicha metilación se lleva cabo en el carbono 5 de la citosina, dando lugar a la base modificada 5-metilcitosina (5mc). Estudios recientes han demostrado que la citosina no es la única base nitrogenada que sufre modificaciones, ya que por ejemplo la adenina sufre una metilación en la posición 6 dentro de su estructura dando lugar a 6N-metiladenina (Wu et al., 2016).

2.4.3.1 Metilación del DNA.

Como se mencionó anteriormente, la metilación del DNA juega un papel importante en la regulación de la expresión genética, inactivación del cromosoma X o inclusive en el desarrollo de patologías como el cáncer (Yin et al., 2017), por lo que, la regulación de dichas marcas es tan importante como la conservación de la secuencia genómica. Se ha estimado que aproximadamente entre el 10 y 20% del genoma corresponde particularmente a DNA satélite, y al menos un 35% a elementos transponibles, siendo ambos blancos particulares para la metilación con el objetivo de mantener la integridad del genoma y tener un control de la expresión génica. Otra región importante blanco de metilación es la heterocromatina centromérica, ya que parece ser crucial para mantener la conformación e integridad de los cromosomas (Rodríguez-Dorantes et al., 2014).

La metilación del DNA se puede llevar a cabo en las islas CpG. Dichas islas son regiones de aproximadamente 1000 pb con al menos 60% de contenido de dinucleótidos CpG (Bourc'his et al., 2006). Se ha evaluado su abundante presencia en 72% de los promotores del genoma humano (Saxonov et al., 2006). La hipermetilación de dichas regiones está asociada a la represión génica, sin embargo, cabe resaltar que esta marca epigenética interacciona con las otras marcas epigenéticas mediante interacciones moleculares y reclutamiento enzimático, lo que repercute en la regulación de la expresión génica y otros eventos celulares que dependen de la estructura de la cromatina (Sweatt et al., 2013)

2.4.3.1.1 Mecanismo de metilación del DNA.

La metilación del DNA se lleva a cabo por enzimas que catalizan la transferencia del grupo metilo del sustrato universal S-adenosil metionina (AdoMet o SAM) al carbono 5 de la citosina (Fig. 12). Las enzimas que catalizan esta reacción reciben el nombre de metiltransferasas de DNA (DNMT por sus siglas en inglés). Actualmente, existen dos tipos principales de metiltransferasas, cuya importancia y nombre depende de su sustrato, por lo que su clasificación es de acuerdo al patrón de metilación que establecen, siendo así la DNMT de *novo* (DNMT3) y la DNMT de mantenimiento (DNMT1) (A. R. J. Jeltsch, 2016). El proceso de metilación del DNA es de gran relevancia durante el desarrollo embrionario, ya que en éste es donde se establecen los patrones de metilación que darán lugar a la reprogramación embrionaria. Durante dicha reprogramación embrionaria los genomas heredados, tanto paterno como materno, sufren un borrado de sus patrones de metilación (desmetilación) para posteriormente adquirir un patrón nuevo dependiendo del linaje que dará lugar (Cerbón, 2014; Sweatt et al., 2013). Se ha descrito que el genoma materno es desmetilado por la vía de desmetilación pasiva, mientras que el genoma paterno es desmetilado principalmente por la vía activa (Jeltsch, 2016).

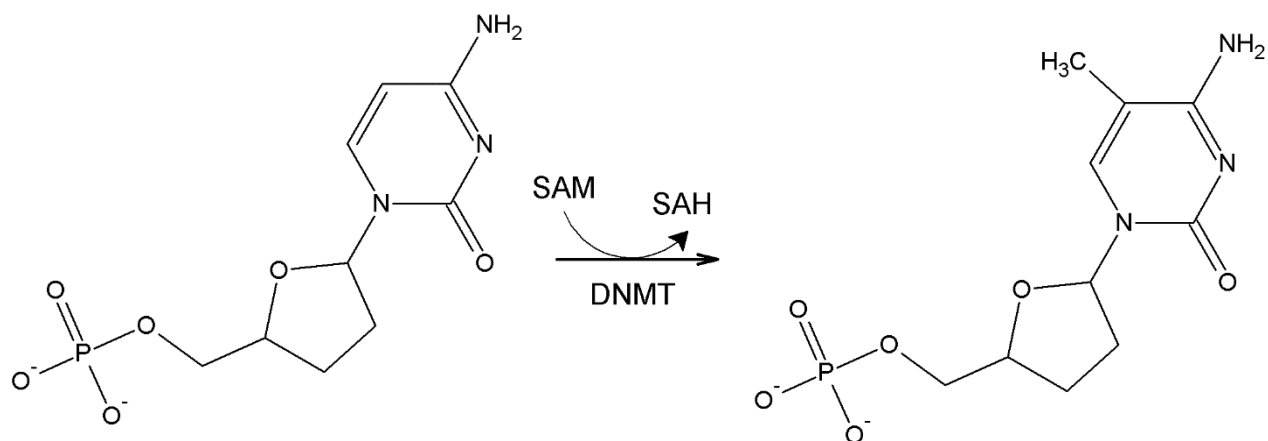


Figura 12. Metilación de citosinas. Se muestra la metilación del nucleótido citosina en el carbono cinco por actividad de la metiltransferasa de DNA, esto mediante la transferencia del grupo metilo del sustrato S-adenosilmetionina (SAM).

2.4.3.1.2 Metilación de *novo*.

Como ya se mencionó anteriormente, los dos tipos de metilación dependen del sustrato y la enzima que participa en la catálisis de dicha reacción. La metilación *novo* se lleva a

cabo por la DNMT3a y DNMT3b (Chédin, 2011; A. R. J. Jeltsch, 2016), las cual tienen diferentes regiones blancas de entre las cuales destacan:

- Heterocromatina centromérica y pericéntrica.
- Regiones repetidas.
- Cuerpos génicos.

2.4.3.1.3 Metilación de mantenimiento.

Este tipo de metilación se realiza una vez que se ha replicado el DNA. Este tipo de metilación ocurre en DNA hemimetilado (metilación en solo una cadena) esto con el objetivo de propagar los patrones de metilación y de esta forma mantenerlos a lo largo del desarrollo o división celular (A. R. J. Jeltsch, 2016). El mantenimiento de los patrones genómicos de metilación es llevado a cabo primordialmente por la enzima DNA-metiltransferasa 1 (DNMT1), la cual reconoce específicamente a la cadena de ADN hemimetilado; se ha descrito que DNMT1 tiene una preferencia aproximadamente de 10 a 40 veces más por sitios CpG hemimetilados (Bashtrykov et al., 2014).

2.4.3.1.4 Desmetilación.

El proceso de desmetilación es la reacción inversa a la adición del grupo metilo del carbono cinco de citosina. En la actualidad se han descrito dos principales mecanismos de desmetilación que participan en la reprogramación embrionaria, siendo así, la vía activa o dependiente de enzimas (Fig. 13) y la vía pasiva (Hackett et al., 2013; Kohli & Zhang, 2013). La vía pasiva, también conocida como desmetilación por efecto de dilución, es una pérdida de la actividad de la metilación de mantenimiento dependiente de replicación (Dean, 2016; He et al., 2017).

Como se presenta en la figura 13, la 5mC es sustrato de las enzimas TET, las cuales llevan a cabo la oxidación del grupo metilo generando así la base modificada 5-hidroximetilcitosina (5hmC), la cual sufre una segunda oxidación y es transformada a dos subproductos: 5-formilcitosina (5fc) y 5-carboxicitosina (5caC). Dichos subproductos son reconocidos y removidos por la acción de la enzima Timina DNA glicosilasa (TDG) dando lugar a un sitioapurínico (AP), lo que conlleva la activación del sistema de reparación del DNA por escisión de base (BER) dependiente de DNA glicosilasa permitiendo la inserción de la base citosina no metilada (Kohli et al., 2013; Rasmussen et al., 2016).

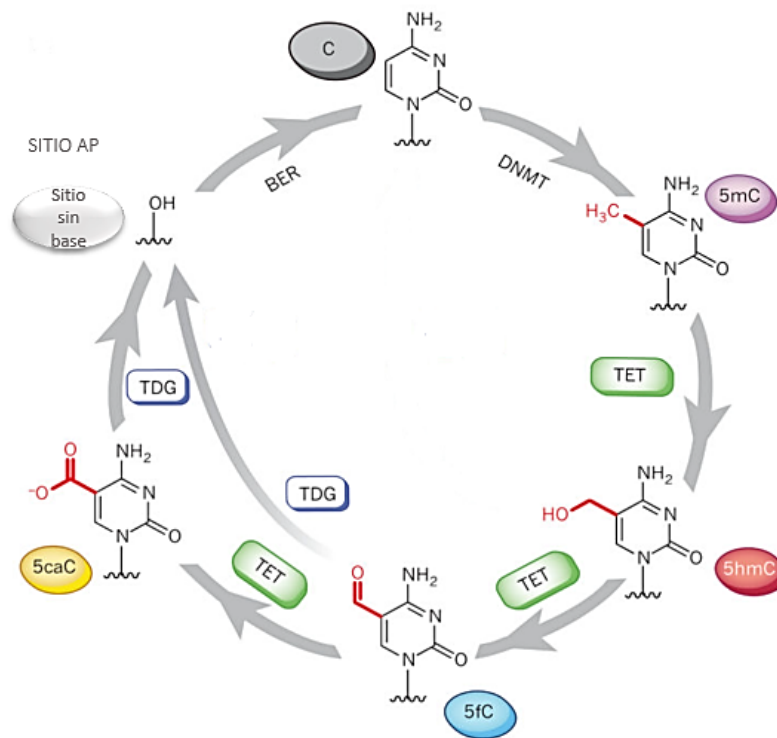


Figura 13. Proceso de desmetilación activa. Este mecanismo consiste en la oxidación de la base modificada 5mC a través de la actividad de la enzima Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase (TET), para su posterior remoción por el sistema de reparación del DNA por escisión de base (modificado de Kohli & Zhang, 2013).

3. Antecedentes

Actualmente el SOP se considera una patología con etiología desconocida pero con un grado de susceptibilidad por factores genéticos, epigenéticos y estilo de vida (como la dieta). Recientemente se ha demostrado que otro gran factor predisponente es la exposición *in útero* a las hormonas maternas, siendo que, si una mujer embarazada presenta niveles elevados de la hormona anti mulleriana (AMH), se lleva a cabo una programación fetal que predispone a la descendencia (mujeres) de presentar SOP por una elevación de LH y posteriormente una estimulación ovárica anormal (Tata et al., 2018). Esto es de gran relevancia considerando que la descendencia femenina que presente SOP a su vez tendrá niveles elevados de AMH durante el embarazo, lo que programará a la siguiente generación con la enfermedad, dando lugar a la herencia transgeneracional de la patología.

Al ser el SOP una patología con un gran impacto en el metabolismo, se han evaluado diferentes aspectos como metabolismo de glucosa y resistencia a la insulina en tejidos como el adiposo y músculo esquelético, además, se han demostrado afectaciones a niveles proteicos mediante análisis del proteoma (Amjadi et al., 2018) y haciendo algunas correlaciones con los niveles de RNA mensajero (mRNA). En algunos estudios se ha profundizado el mecanismo que está asociado con los cambios de expresión de diversos genes en mujeres con SOP que presentan obesidad y resistencia a la insulina mediante el análisis de metilación de genes relacionados con inflamación, adhesión celular, entre otros procesos, principalmente en tejido adiposo, músculo esquelético y ovario (Kokosar et al., 2018; Nilsson et al., 2018; Pan et al., 2018; Sagvekar et al., 2017). Sin embargo, de manera particular no se han evaluado si existen cambios en los estados de metilación en genes específicos de la vía de la insulina, generados por el SOP, o el establecimiento de los estados de metilación basal a nivel de endometrio, el cual como ya se mencionó anteriormente, juega un papel importante en el ciclo menstrual y la determinación de la fertilidad.

Existen estudios en los que se han evaluado a nivel de endometrio los cambios de expresión de mRNA de genes relacionados con la vía de la insulina en el endometrio de mujeres con SOP (Giudice, 2006), lo que demuestra la importancia de evaluar la

expresión de dichos genes en enfermedades reproductivas como el SOP, tal como, *GAB1* (Roemer et al., 2014), el cual codifica una proteína acopladora relacionada con la activación del sustrato del receptor de insulina tipo I (IRS-1) (Fig. 7), y cuya expresión se ha observado disminuida en pacientes con SOP. También se ha observado una disminución de la expresión de los genes *IRS-1*, *AS160* y *SLC2A4* en el endometrio de mujeres con SOP (Oróstica et al., 2016). Adicional a lo anterior solo existe un estudio de cohorte en el que se evalúa el efecto del tratamiento con metformina sobre la expresión de *SLC2A4* en el endometrio de mujeres obesas con SOP (Zhai et al., 2012). Esta evidencia demuestra que el SOP tiene una afectación de la vía de la insulina en tejidos que responden ante dicha hormona y que se puede observar a nivel de expresión génica, sin embargo, hasta el momento no se han establecido los mecanismos a través de los cuáles se altera la expresión de dichos genes y si la terapia podría reestablecer los niveles normales de expresión génica.

De acuerdo a los antecedentes que demuestran la disminución de la expresión de genes relacionados con la vía de la insulina en el endometrio humano, el cual es un tejido metabólicamente activo y que responde a insulina, se plantea uno de los objetivos principales del presente trabajo, que consiste en determinar si existe un cambio en la marca epigenética de metilación del DNA en las regiones promotoras de los genes *GAB1*, *IRS-1* y *SLC2A4* en el endometrio de mujeres con SOP y establecer si existe una relación con los niveles de expresión antes y después del tratamiento con metformina.

4. Justificación

El SOP es el trastorno endocrinológico más frecuente en mujeres de edad reproductiva, su fenotipo se caracteriza principalmente por hiperandrogenismo, anovulación crónica y presencia de ovarios poliquísticos, además de ser la causa más frecuente de infertilidad anovulatoria (Azziz et al., 2016). En México, se estima que el SOP tiene una prevalencia del 6% en mujeres con dichas condiciones (Francisco & Gonz, 2013; Moran et al., 2010), por otra parte, se ha demostrado que la prevalencia a nivel mundial es de entre el 5 al 20%.

Pese a que existen diferentes tratamientos enfocados primordialmente a restaurar la funcionalidad reproductiva mediante la mejora del ciclo ovárico, actualmente no existe un tratamiento específico para la enfermedad, esto debido a la heterogeneidad que presenta la misma. Aunque anteriormente se había considerado que el SOP era una patología multifactorial *de novo*, en la actualidad se está estudiando el factor hereditario para la predisposición de SOP (Tata et al., 2018). Son pocos los estudios realizados acerca de SOP cuya evaluación se centre en el factor genético o epigenético, por lo que, surge la necesidad de caracterizar los cambios moleculares que se generan durante la patología del SOP.

Debido a que dicha patología tiene alta predisposición a otras comorbilidades por su estrecha relación con afectaciones metabólicas es necesario determinar a nivel molecular, siendo más específicos a nivel epigenético, los cambios tejido-específico (endometrio) que se están llevando a cabo y que a su vez están asociados con el cuadro patológico de la enfermedad. El tejido de estudio es de gran relevancia ya que como se mencionó con anterioridad, cumple un papel importante a lo largo de todo el ciclo menstrual y tiene una función crucial para la implantación del embrión. Por otra parte, la metformina ha demostrado tener una actividad a nivel epigenético (modulando la metilación del DNA) en modelos *in vitro* de células de cáncer endometrial (Zhong et al., 2017), lo cual sugiere que el tratamiento con metformina puede generar cambios epigenéticos en el endometrio de mujeres con SOP.

5. Preguntas de investigación

- 1 ¿Cuáles son los niveles de metilación basales del DNA de los genes relacionados con la vía de la insulina en el endometrio de mujeres sanas y mujeres con SOP?
- 2 ¿El tratamiento con metformina en las mujeres con SOP inducirá un cambio en dichos niveles de metilación?

6. Hipótesis

Se presentarán cambios en los niveles de metilación del DNA de los genes *GAB1*, *IRS-1* y *SLC2A4* en el endometrio de mujeres con SOP con respecto a mujeres sanas (controles). Los niveles de metilación de las pacientes con SOP posterior al tratamiento con metformina serán similares a los obtenidos a partir de controles.

7. Objetivos

7.1 Objetivo general.

Determinar el efecto del tratamiento con metformina sobre la metilación del DNA en genes relacionados con la vía de señalización de la insulina en el endometrio de mujeres con SOP.

7.2 Objetivos particulares:

- I. Comparar los niveles de metilación del DNA en las regiones promotoras e intragénicas de los genes *GAB1*, *IRS-1* y *SLC2A4* en el endometrio de mujeres con SOP con respecto a mujeres sanas (controles).
- II. Confrontar los niveles de metilación en las regiones de estudio de los genes seleccionados en mujeres con SOP antes del tratamiento y después del tratamiento con metformina.
- III. Confrontar los niveles de expresión a nivel de mRNA de los genes seleccionados en mujeres con SOP antes y después del tratamiento, y comparar con respecto a controles.
- IV. Correlacionar los cambios de metilación de las regiones de estudio con la expresión a nivel de mRNA de los genes seleccionados.

8. Metodología

8.1 Selección de pacientes.

Se realizó un estudio de casos y controles en 23 mujeres mexicanas. Todas las pacientes fueron reclutadas dentro del Instituto Nacional de Perinatología (INPer), de acuerdo al protocolo de investigación “Efecto de la intervención metabólica con metformina sobre la programación epigenética del endometrio de mujeres con síndrome de ovario poliquístico” con número de registro 3000-2029-04-16, el cual fue aprobado y autorizado por los Comités de Investigación, de Ética en la Investigación y de Bioseguridad del INPer. Al finalizar el estudio, se obtuvieron tres grupos que consisten en un grupo control, grupo caso antes del tratamiento, y grupo caso después del tratamiento con metformina. Es importante mencionar que los grupos caso antes y después del tratamiento consistieron en individuos pareados.

Se determinó como pacientes caso a aquellas mujeres que cumplieron dos o tres características de los criterios de Rotterdam (anovulación-oligoovulación, hiperandrogenismo y presencia de ovarios poliquísticos) y que cumplieron con las características presentadas en la Tabla 4. La descripción del procedimiento se encuentra en la carta de consentimiento informado (ver anexo C).

Tabla 4. Criterios de inclusión y exclusión para pacientes del grupo caso.

Criterio	Características
Inclusión	<ul style="list-style-type: none"> • Mujeres con edad de 18 a 45 años. • IMC: 25 a 39.9. • Mujeres con diagnóstico de infertilidad asociado a SOP. • Mujeres sin tratamientos hormonales o de antagonistas de GnRH al menos a tres meses previos a la toma de muestra. • Sin hábitos de tabaquismo y/o alcoholismo. • Mujeres que acepten participar en el proyecto y firmen la carta de consentimiento informado (Anexo C).
Exclusión	<ul style="list-style-type: none"> • Mujeres con cáncer o que se encuentren en tratamiento (quimioterapia o radioterapia). • Mujeres con enfermedades cardíacas, renales o problemas de hipertensión. • Mujeres con asma y /o enfermedades autoinmunes. • Pacientes con trastornos neurológicos.

Se estableció como pacientes del grupo control, a aquellas mujeres que cumplieran los criterios de la Tabla 5.

Tabla 5. Criterios de inclusión y exclusión para pacientes del grupo control.

Criterio	Características
Inclusión	<ul style="list-style-type: none"> • Mujeres con edad de 18 a 45 años. • IMC:25 a 39.9. • Sin diagnóstico de SOP (con ciclos menstruales regulares). • Mujeres que acudan a oclusión tubaria bilateral como método anticonceptivo o a colocación de dispositivo intrauterino (DIU). • Sin hábitos de tabaquismo y/o alcoholismo. • Mujeres que acepten participar y firmen hoja de consentimiento informado (Anexo C).
Exclusión	<ul style="list-style-type: none"> • Mujeres con diagnóstico de SOP. • Mujeres con tratamientos hormonales o de agonistas de GnRH, al menos tres meses antes de la toma de muestra. • Mujeres con enfermedades cardíacas, renales o problemas de hipertensión. • Mujeres con asma y /o enfermedades autoinmunes. • Pacientes con trastornos neurológicos.

Para el grupo de pacientes caso se reclutó a un total de 36 pacientes, de las cuales solo 15 cumplieron los criterios de inclusión y no los de exclusión; al término del proyecto 6 pacientes mantuvieron la adherencia al tratamiento y cumplieron los requisitos solicitados. En el grupo control, se reclutaron 12 pacientes, sin embargo, solo ocho pacientes aceptaron participar en el proyecto.

8.2 Toma de muestras.

Al finalizar el reclutamiento de las pacientes, se procedió a la entrega del consentimiento informado, así como una breve explicación de la metodología del proyecto. Para las pacientes del grupo control, se les citó dentro del INPer en los días tres a cinco correspondientes a su ciclo menstrual; se les realizó la toma de muestra sanguínea en un tubo colector vacutainer (con gel separador), para la obtención de suero. Las muestras séricas se emplearon para la determinación del perfil hormonal en el que se evaluaron los niveles de androstenediona, DHEA, estradiol, FSH, insulina, LH, prolactina, progesterona y testosterona, así mismo como la determinación de SHBG mediante los kits de la marca *Siemens*, empleando el equipo *Immulite 2000*. El suero de las participantes también se utilizó para la determinación de glucosa mediante el uso del kit *Fuji dri-chem slide glu-PIII* de *Fujifilm* empleando el equipo *Fuji dri-chem analyzer*. Posteriormente, con el apoyo de médicos especialistas en gineco-ostetricia, se procedió a la toma de biopsia de endometrio (en el fundus uterino), mediante una cánula de *Pipelle* entre los días ocho a diez del ciclo menstrual. Finalmente, dicha biopsia se colocó en solución estabilizadora RNA *later*® de *Qiagen* (para evitar la activación de nucleasas, principalmente RNAasas) y almacenada a -20°C.

Para las pacientes del grupo caso se realizó un procedimiento similar, sin embargo, por la característica clínica del SOP (mujeres anovulatorias), en las pacientes de este grupo se les indujo la ovulación mediante la administración de medroxiprogesterona (Provera) a una dosis de 10 mg cada 24 h por 10 días. Posteriormente se realizaron la toma de muestras correspondientes y entrega del tratamiento (metformina). Al finalizar el

tratamiento se realizó una segunda cita para obtener nuevamente las muestras de sangre y endometrio.

8.3 Tratamiento con metformina.

Las pacientes del grupo caso recibieron tres cajas de metformina de liberación prolongada (Dabex XR ® Merck) en presentación de 750 mg para cubrir tres meses de tratamiento a una dosis diaria de 1.5 g. Adicional a lo anterior, se les brindó dos citas con la unidad de nutrición del INPer para otorgarles una dieta (restricción de carbohidratos al 40%) y seguimiento nutricional personalizado, con el objetivo de tener un control del peso de las pacientes participantes.

8.4 Procesamiento de las muestras.

Las muestras de endometrio se lavaron en un amortiguador salino de fosfatos (PBS) para retirar los remanentes sanguíneos que pudieran quedar junto con la muestra. Se tomó la cantidad de tejido equivalente a 25 mg para posteriormente homogenizar el tejido con la ayuda de una jeringa de 5 mL y punta calibre 21 en solución de lisis (AllPrep DNA/RNA Mini kit de Qiagen). Posteriormente, dichas muestras fueron centrifugadas para sedimentar los fragmentos de mayor tamaño y separarlos del homogenizado, se tomó el sobrenadante y se transfirió a una columna de separación de DNA para después transferir a una columna RNAeasy y realizar las extracciones correspondientes mediante el Kit AllPrep DNA/RNA Mini kit de Qiagen, siguiendo las especificaciones del fabricante.

El DNA y RNA extraído fue cuantificado en NanoDrop2000. Se verificó la integridad de ambos ácidos nucleicos por electroforesis en gel de agarosa al 1.0% y, para el caso del RNA, se realizó un análisis de integridad mediante el equipo bioanalizador de Agilent (2100 expert). Finalmente, las muestras de DNA y RNA se almacenaron a -20°C y -70°C respectivamente, para posteriormente ser empleados en el análisis de inmunoprecipitación de DNA metilado (MeDIP) y análisis de expresión.

8.5 Selección de genes y diseño de oligos.

Se realizó una búsqueda dirigida en bases de datos y artículos científicos con el objetivo de encontrar genes cuya evidencia demostrara que tienen alguna alteración (ya sea a nivel de mRNA o proteínas) en la patología del SOP y a su vez estar relacionados con la

vía de señalización de la insulina. Posteriormente, se aplicó como filtro que dichos hallazgos en los genes candidatos estuvieran evaluados a nivel de endometrio. Una vez seleccionado el criterio, se buscó la evidencia de la alteración de dichos genes a nivel de expresión de mRNA y/o cambios en la metilación de dichos genes. Con base en la información obtenida se seleccionaron los tres genes candidatos:

- *GAB1*
- *IRS-1*
- *SLC2A4*

A partir de los genes seleccionados, se buscó en bases de datos bioinformáticas las regiones promotoras e intragénicas con posibles cambios de metilación, para posteriormente realizar el diseño de oligos correspondiente mediante el uso de la herramienta primer-BLAST, diseñando así pares de oligos para regiones promotoras ricas en CpG, así como oligos para ensayos de expresión (Ver anexo B).

8.6 Análisis mediante MeDIP-qPCR.

La técnica de inmunoprecipitación de DNA metilado nos permitió separar fragmentos de DNA metilado mediante la adición de un anticuerpo que reconoce específicamente a la 5-metilcitosina. Los inmunoprecipitados se analizaron mediante qPCR en las regiones seleccionadas para determinar los niveles de metilación en regiones promotoras y región intragénica (*SLC2A4*). Dado lo anterior, el análisis MeDIP-qPCR consta de tres etapas principales:

- 1 Sonicación y reacción antígeno-anticuerpo: en esta etapa se sonicaron 2 μ g de DNA genómico en solución Tris-EDTA (TE), posteriormente se desnaturalizó 1 microgramo de DNA (sonicado) a 100°C durante 10 minutos. Cada muestra se dividió en dos tubos: el primero para ser incubado con anticuerpo anti-5-metilcitosina (inmunoprecipitado) y el segundo, no fue expuesto con dicho anticuerpo (INPUT, que corresponde al 10% del volumen original del DNA metilado). Adicionalmente una fracción de DNA sonicado se incubó con un anticuerpo monoclonal inespecífico (control negativo). Finalmente, los tubos que

-
- contenían anticuerpos se dejaron incubando a 4°C toda la noche en agitación rotativa.
- 2 Tratamiento con perlas magnéticas y purificación de inmunoprecipitado: al día siguiente se realizó el bloqueo de las perlas magnéticas que se unen al anticuerpo. Dicho bloqueo se realizó con una solución amortiguadora de fosfatos-albúmina sérica bovina (PBS/BSA). Lo siguiente fue agregar la mezcla de reacción (DNA-anticuerpo) a los microtubos que contenían las perlas magnéticas; dicha mezcla fue incubada 1h a 4°C con agitación rotativa. Posteriormente se realizaron cuatro lavados con solución de inmunoprecipitación (IP 1X, buffer de fosfatos 100 mM pH 7.0, NaCl 1.4 M, y tritón X-100 0.5%), y en el último lavado las perlas magnéticas se resuspendieron en solución de digestión (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, y SDS 0.5%) para de esta forma liberar el DNA que fue reconocido por el anticuerpo. Finalmente, se realizó la purificación mediante la extracción con mezcla de solventes fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), tomando la fase acuosa y precipitando la fracción de DNA identificada con GlycoBlue para posteriormente resuspender en solución TE.
 - 3 qPCR: en esta última etapa el DNA resultante de la inmunoprecipitación fue empleado para realizar qPCR con el objetivo de determinar el grado de metilación de las regiones de interés en los genes de estudio. La qPCR se llevó a cabo preparando volúmenes de reacción de 10 µL, empleando el reactivo Power Up™ SYBR™ *Green Master Mix* de *Applied Biosystems*, y realizando un triplicado de cada reacción dando un total de seis reacciones por muestra (tres réplicas de inmunoprecipitado y tres réplicas de INPUT) preparadas en placas de 96 pozos. Finalmente, las placas que contenían los tubos de reacción fueron colocadas dentro del termociclador *StepOne plus* (*Applied Biosystems*) para llevar a cabo la reacción de PCR, así como una curva de desnaturalización para verificar si durante el progreso de la reacción se llevaban a cabo reacciones por uniones inespecíficas. A su vez, se realizó una confirmación visual mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2.0 %, empleando GelRed como agente intercalante y observando en fotodocumentador.
-

Finalmente se empleó el método $\Delta\Delta\text{CT}$ para determinar los niveles de metilación de los datos obtenidos de qPCR.

8.7 Ensayo RT-qPCR.

Una vez obtenida la calidad adecuada del mRNA (pureza espectrofotométrica e integridad estructural), se procedió a la obtención de DNA complementario (cDNA), empleando el kit de reacción SuperScript™ II Reverse Transcriptase de ThermoFisher. El cDNA obtenido se analizó mediante qPCR para determinar los niveles de expresión relativa con respecto al gen de expresión constitutiva que codifica para actina (ACTB), de igual manera por el método $\Delta\Delta\text{CT}$.

8.8 Análisis estadístico.

Una vez obtenidos los resultados de enriquecimiento de DNA metilado y expresión relativa, se empleó el programa *GraphPad Prism 6* para realizar una prueba de Kruskal-Wallis; dicha prueba no paramétrica se empleó debido a que los grupos control no tenían la misma cantidad de pacientes en comparación con los grupos de pacientes caso, así como también se realizaron pruebas para determinar si los datos presentaban una distribución normal. Para los resultados de expresión relativa, adicional a la prueba mencionada anteriormente, se realizó una prueba de t pareada entre los grupos de pacientes, antes y después del tratamiento. Para el comparativo de los niveles de expresión entre los grupos individuales de pacientes con respecto a controles se empleó una prueba de Mann Whitney para determinar la diferencia entre ambos grupos. Los resultados se consideraban estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$.

Una vez corroboradas las diferencias significativas entre los grupos de estudio, se realizó una prueba post hoc de Dunnet para definir la diferencia de medias por grupos.

9. Resultados

9.1 Caracterización de la población de estudio.

De acuerdo a la Tabla 6, la comparación del IMC entre pacientes antes y después del tratamiento muestran cambios significativos (prueba t pareada $p < 0.05$), lo cual nos demuestra el impacto del tratamiento combinado de dieta con metformina sobre el control de peso en las pacientes con el SOP. En la evaluación del perfil hormonal se observaron niveles mayores de androstenediona, estradiol, testosterona y el porcentaje de andrógenos libres, así como también se presentó un aumento en la relación LH/FSH en las pacientes con SOP sin tratamiento en comparación con el grupo control. De manera interesante, se presentaron niveles mayores de insulina y por consiguiente en el índice HOMA en las pacientes con SOP previamente al tratamiento respecto a controles. Dichos valores presentaron una tendencia a disminuir con el tratamiento con metformina a excepción de SHBG, la cual aumentó en comparación con las pacientes antes del tratamiento.

Tabla 6. Características clínicas y antropométricas de controles y pacientes.

Determinación	Control	SOP	SOP + MET
Edad	27.8 ± 5.1	27.93 ± 4.4	27.93 ± 4.4
IMC	25.5 ± 3.2	27.11 ± 4.7	27.08 ± 5.06 #
Androstenediona (ng/mL)	2.08 ± 0.60	4.24 ± 1.64 *	3.15 ± 0.85 *,#
DHEA (µg/dL)	170 ± 72.14	206.58 ± 121.70	182.33 ± 6.91
Estradiol (pg/mL)	39.3 ± 15.76	72.05 ± 9.22 *	62.75 ± 7.12 *,#
FSH (mIU/mL)	6.30 ± 2.24	4.79 ± 1.26	5.85 ± 1.57 #
LH (mIU/mL)	3.73 ± 1.67	5.99 ± 2.37	7.03 ± 2.57 #
LH/FSH	0.64 ± 0.20	1.23 ± 0.20 *	1.20 ± 0.23 *
Progesterona (ng/mL)	0.28 ± 0.07	0.27 ± 0.06	0.24 ± 0.06
Prolactina (ng/mL)	11.53 ± 4.56	11.63 ± 4.09	8.80 ± 1.70
SHBG (nmol/L)	44.8 ± 27.32	29.44 ± 13.59	36 ± 15.87 #
Testosterona (nmol/mL)	0.81 ± 0.13	1.38 ± 0.49 *	1.39 ± 0.65 *,#
% Andrógenos libres	2.21 ± 0.93	5.51 ± 3.21 *	4.75 ± 2.29 *
Glucosa (mg/dL)	82.17 ± 8.19	90.6 ± 13.46	86.3 ± 3.38
Insulina (µIU/mL)	5.17 ± 3.10	14.80 ± 8.66 *	7.91 ± 3.20
HOMA	1.04 ± 0.56	3.43 ± 2.43 *	1.69 ± 0.70

* $p < 0.05$ (vs control), # $P < 0.05$ (vs SOP), los datos mostrados son promedio ± desviación estándar.

9.2 Cambios físicos y sintomatológicos de las pacientes posterior al tratamiento con metformina.

Al concluir los tres meses de tratamiento con metformina, a las pacientes se les realizó una serie de preguntas para evaluar cambios notables que se hayan generado a consecuencia del tratamiento (Fig. 14).

Como se presenta en la Fig. 14A, el tratamiento conjunto de metformina con dieta hipocalórica favoreció el cambio de categoría de IMC en el 33% de las pacientes, cambiando de sobre peso a un IMC normal. Por otra parte, como se ha descrito en los antecedentes de este trabajo, uno de los efectos de la metformina en las pacientes con SOP es el restablecimiento del ciclo menstrual; como se observa en la Fig. 14B fue notable dicho efecto en este estudio, generando así una tasa del 84% en el restablecimiento del ciclo menstrual (considerando la presencia de un solo ciclo como efecto positivo). Este hallazgo es relevante ya que una de las características de mujeres que presentan el SOP es la irregularidad o pérdida de sus ciclos menstruales, y tal como se presenta en la Tabla 3, el tratamiento conjunto de metformina y un cambio en los hábitos alimenticios son de los principales esquemas empleados para el tratamiento del SOP.

Finalmente, se registraron los efectos secundarios, adversos y extraños al tratamiento con metformina (Fig. 14C), los cuales se presentaron en todas las pacientes; en algunos casos se presentaron dos o más efectos adversos. Por otra parte, como efectos extraños se obtuvieron: somnolencia y cambios drásticos de humor, los cuales se refirieron por dos pacientes, cuya duración fue a lo largo de los tres meses de tratamiento. Es importante mencionar que no se observaron efectos adversos graves con el tratamiento.

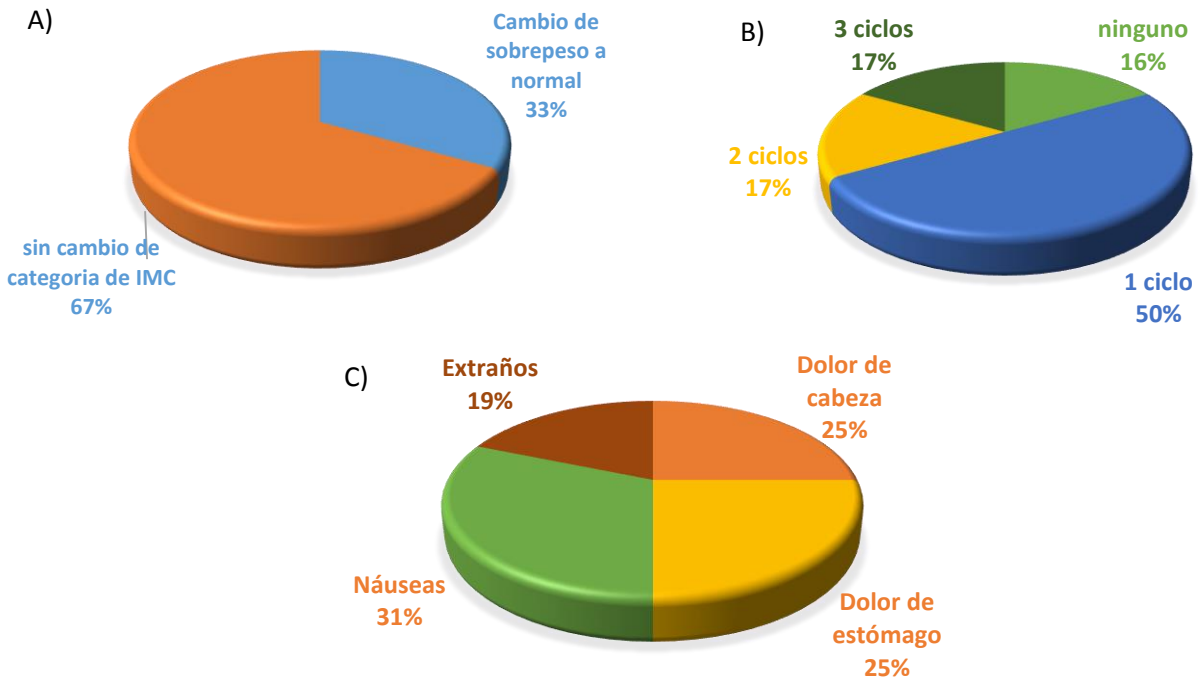
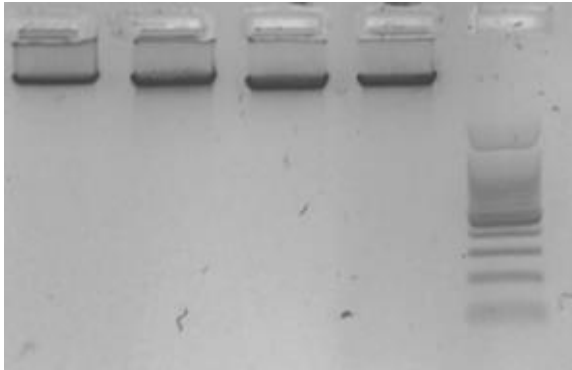


Figura 14. Cambios fisiológicos generados por el tratamiento con metformina. A) Se presenta el impacto de la intervención metabólica con metformina sobre el IMC, denotando un cambio de categoría en el 33% de las pacientes. B) Se muestra el porcentaje de restablecimiento de los ciclos menstruales observado durante los tres meses de tratamiento. C) Se ilustra la frecuencia de los diferentes efectos adversos presentados en las pacientes durante los tres meses de tratamiento.

9.3 Integridad de DNA genómico, DNA sonicado y RNA.

Como se mencionó en la metodología, para el análisis por la técnica de MeDIP, es necesario realizar la sonicación del DNA para obtener fragmentos de entre 100 y 300 pb con el objetivo de favorecer las interacciones del anticuerpo anti-5mC con el DNA. Como se muestra en la Fig. 15, la sonicación del DNA produjo fragmentos entre 100 y 300 pb

A)



B)

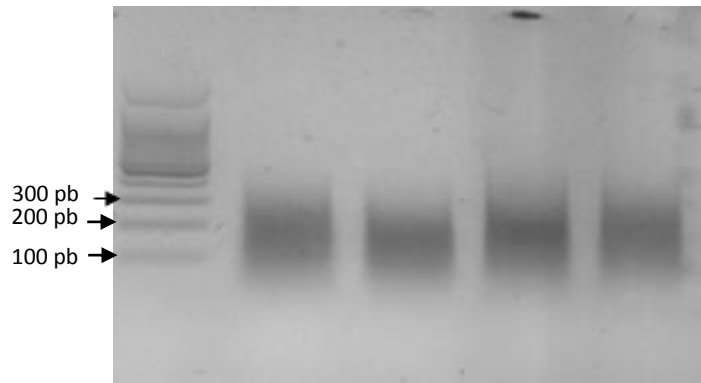


Figura 15. Integridad del DNA antes y después de la sonicación. Se aprecia la primera etapa del análisis MeDIP con muestras representativas que consiste en la sonicación del DNA genómico. A) Se ilustra el resultado de una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, en cual se observa que el DNA genómico empleado para sonicar es de alto peso molecular, lo que indica una buena integridad. B) Resultado de una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en el cual las muestras de DNA genómico utilizadas en el inciso A se sonicaron para obtener fragmentos de entre 100 y 300 pares de bases, lo cual se puede observar de acuerdo al uso de un marcador de peso molecular de 100 pb, demostrando así la homogeneidad de los fragmentos obtenidos en cada muestra.

Para asegurarse que el RNA no estuviera degradado, la integridad de dicha molécula se evaluó mediante el uso del Bionalizador (*Agilent 2100*) (Fig. 16).

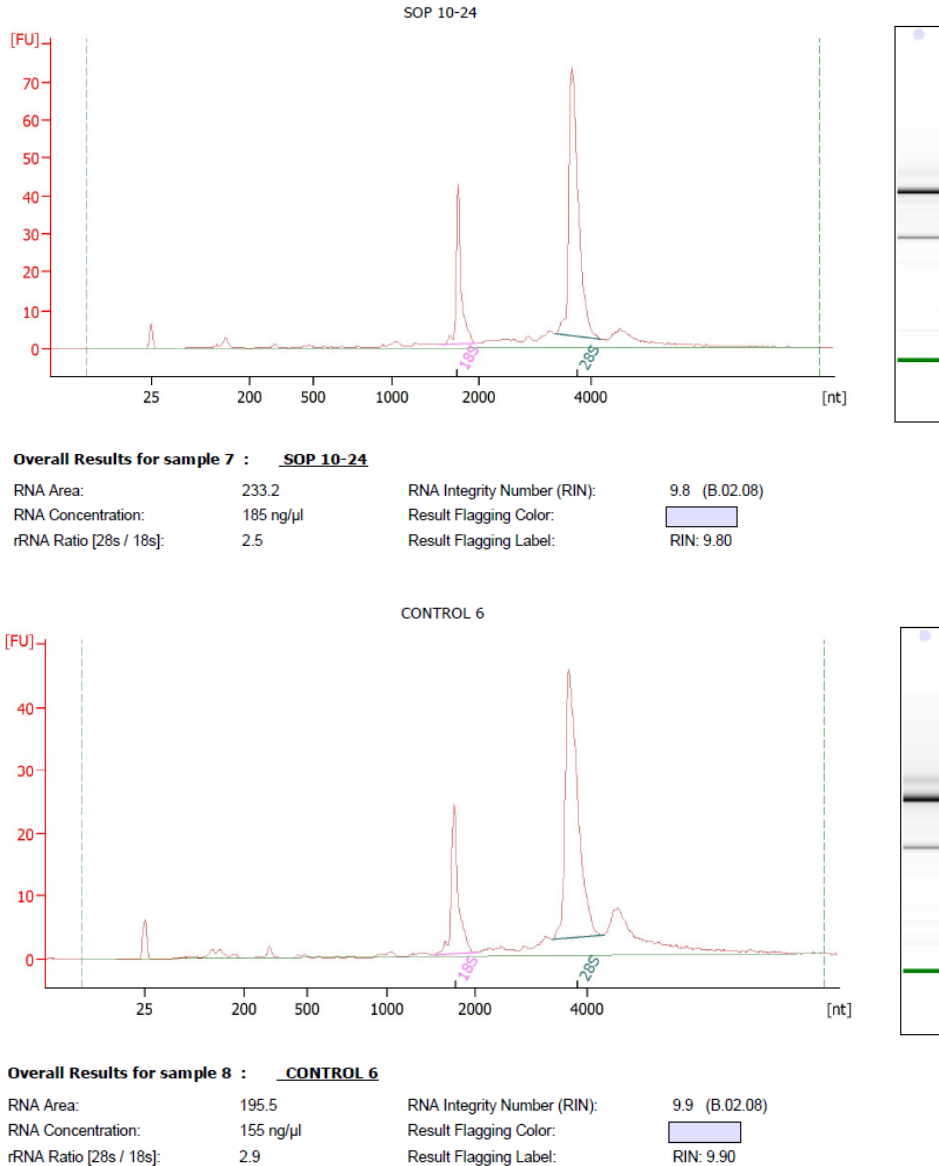


Figura 16. Integridad del RNA analizada mediante el equipo Bioanalizador. Se presentan dos electroferogramas de muestras representativas (paciente y control) empleando como referencia un marcador de peso molecular de 25 nucleótidos (nt). Se observan las dos señales de fluorescencia de los rRNA 18s y 28s, los cuales muestran una buena integridad mediante el valor de integridad del RNA (RIN, por sus siglas en inglés). De lado derecho de cada electroferograma se muestra una imagen de un gel digital, en el que también se puede apreciar la relación 28s/18s.

9.4 Resultados de metilación de los genes de estudio.

Para evaluar el estado global de metilación en las pacientes con SOP antes y después del tratamiento, y en controles, se analizaron las regiones correspondientes a un gen improntado (*H19*) y un gen de secuencia repetida del genoma (*LINE-1*). Los resultados revelaron que no hubo diferencias significativas entre los niveles de metilación de estas regiones en los tres grupos de estudio (Fig. 17).

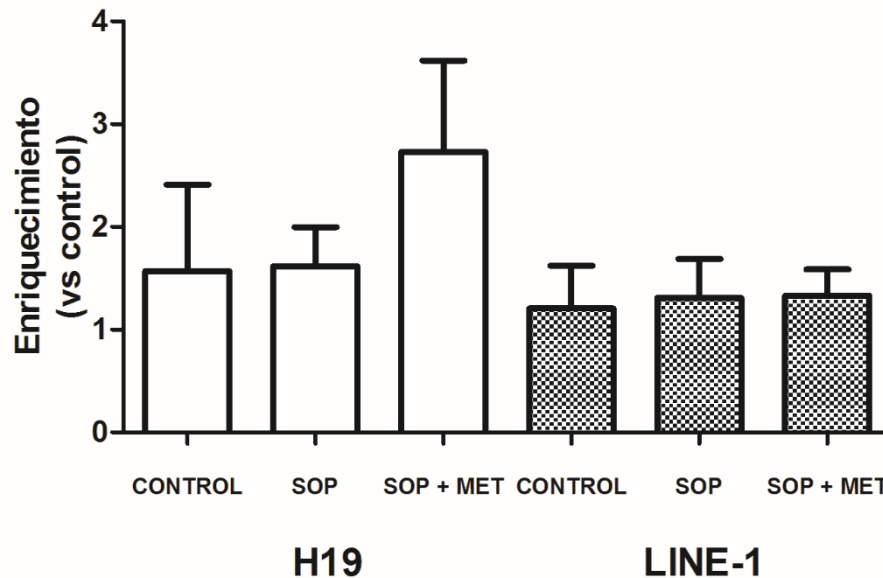


Figura 17. Enriquecimiento relativo de metilación en los genes *H19* y *LINE-1* en los diferentes grupos de estudio. Se muestra el enriquecimiento relativo de dos genes empleados como control de metilación global (*H19* y *LINE-1*), calculado por el método $\Delta\Delta CT$ (normalizando con respecto a controles) en el endometrio de mujeres con SOP y controles. Grupo control ($n=5$), grupo antes del tratamiento ($n=6$), y grupos después del tratamiento ($n=6$). Los datos se presentan como el promedio \pm error estándar.

Posteriormente, se procedió a evaluar los niveles de metilación en las regiones promotoras de los genes *GAB1*, *IRS-1* y *SLC2A4*, así como en la región intragénica del gen *SLC2A4* (Fig. 18).

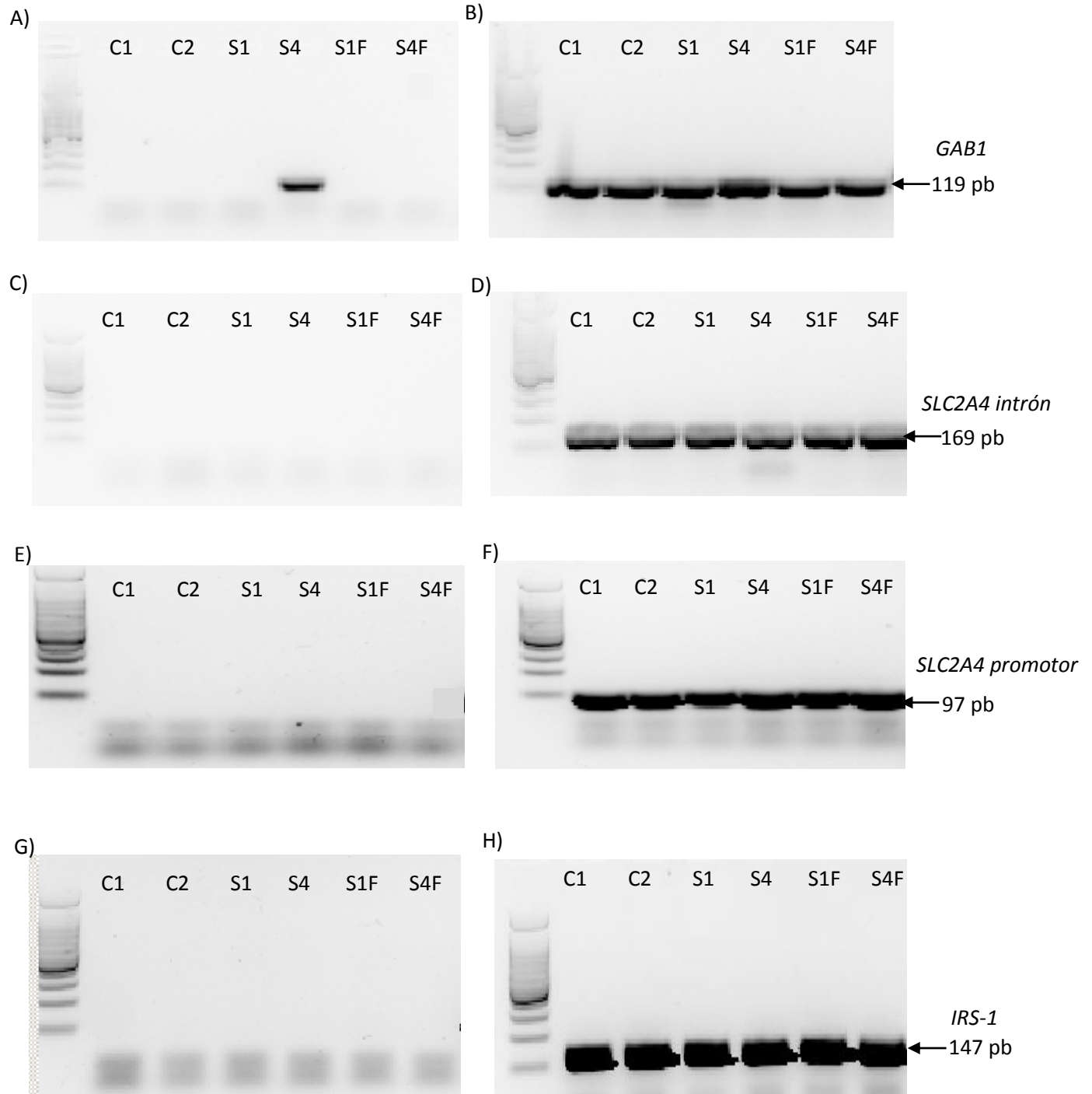


Figura 18. Visualización de los amplicones obtenidos de la MeDIP-qPCR en gel de agarosa al 2%. Se ilustran seis muestras representativas de los productos de amplificación: dos muestras control (C1 y C2), dos muestras de pacientes antes del tratamiento (S1 y S4), y dos muestras de pacientes posterior al tratamiento con metformina (S1F y S4F), empleando como referencia un marcador molecular de 100 pb. Las regiones genómicas analizadas fueron las siguientes: región promotora del gen *GAB1* (A y B), del intrón 1-2 del gen *SLC2A4* (C y D), región promotora del gen *SLC2A4* (E y F), y región promotora del gen *IRS-1* (G y H). En todos los casos se presentan los productos de amplificación de los inmunoprecipitados obtenidos (A, C, E, y G) y el INPUT o fracción sin inmunoprecipitar (B, D, F, y H).

Los resultados de la figura 18 evidencian un estado de hipometilación en las regiones de estudio, a excepción de una muestra identificada con clave S4. La muestra S4, que corresponde a una paciente antes del tratamiento con metformina mostró enriquecimiento de metilación respecto al control negativo en el promotor del gen *GAB1* (imagen A, carril S4), que se pierde posterior al tratamiento con metformina (imagen A, carril S4F). Lo anterior demuestra un estado de hipometilación en las regiones de estudio de los genes evaluados a nivel de endometrio humano.

9.5 Resultados de expresión relativa de los genes de estudio.

Se analizaron los niveles de expresión de los genes *GAB1*, *IRS-1* y *SLC2A4*, considerando que en trabajos previos se ha demostrado una alteración en los niveles de expresión de dichos genes en diferentes tejidos de mujeres con SOP respecto a los correspondientes de mujeres sin la enfermedad. En la figura 19 se muestran los niveles de expresión en las pacientes evaluadas en este trabajo.

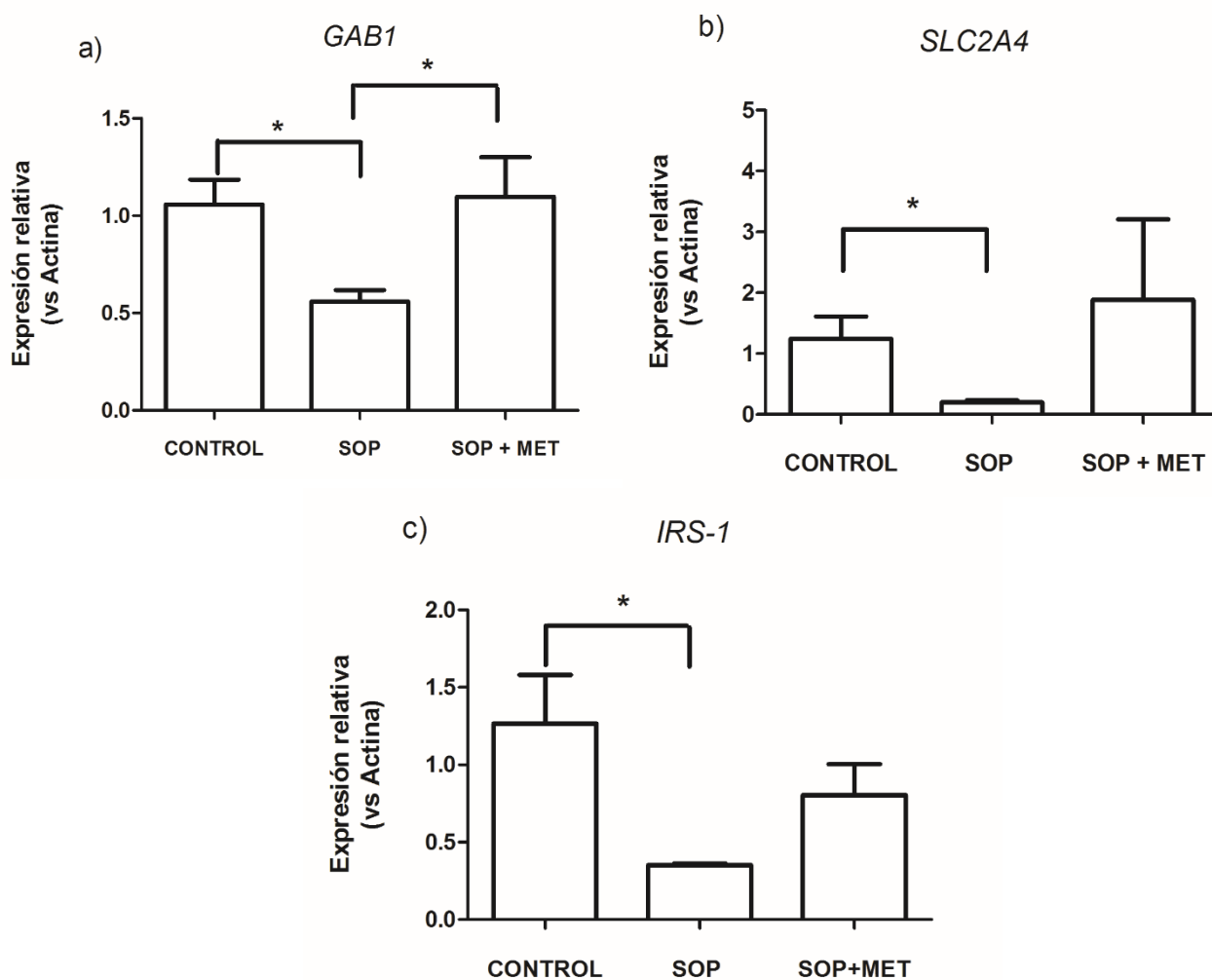


Figura 19. Niveles relativos de expresión de los genes de estudio. Se muestran los niveles de expresión de los genes *GAB1* (A), *SLC2A4* (B) e *IRS-1* (C) en el endometrio de mujeres del grupo control, pacientes antes del tratamiento con metformina y pacientes después del tratamiento normalizado con respecto al gen endógeno que codifica para actina. Los datos se muestran como el promedio \pm error estándar y, * valor de significancia Prueba Mann Whitney $p < 0.05$.

Como se presenta en la figura 19, los niveles de expresión de los tres genes de estudio *GAB1* (A), *SLC2A4* (B) e *IRS-1* (C) se encuentran disminuidos en las pacientes con SOP antes del tratamiento en comparación con las pacientes del grupo control ($p < 0.05$). Por otra parte, el tratamiento con metformina en las pacientes con SOP (SOP + MET) induce un aumento de expresión en los tres genes de estudio, siendo solamente en el gen *GAB1* estadísticamente diferente al grupo sin tratamiento ($p < 0.05$). En los tres genes de estudio los niveles de expresión entre pacientes después del tratamiento y controles son estadísticamente comparables (Prueba Mann Whitney, $p > 0.05$), lo que sugiere que se restablecieron los niveles de expresión a los correspondientes de los controles.

10. Análisis de resultados

La patología del SOP es un desorden heterogéneo caracterizado por una combinación de signos y síntomas, los cuales pueden abarcar desde aspectos físicos (como hirsutismo), clínicos (hiperandrogenismo), metabólicos (como la resistencia a la insulina), genéticos y epigenéticos, afectando principalmente a los tejidos blanco de las hormonas sexuales (Amjadi et al., 2018; Azziz et al., 2016; Ullah et al., 2017). En el presente trabajo se demuestra que la expresión de los genes *GAB1*, *IRS-1* y *SLC2A4* relacionados con la vía de la insulina está disminuida en el endometrio de pacientes con SOP respecto a mujeres sin la enfermedad, y que la metformina elimina dichas diferencias. Los cambios en la expresión no se asociaron con alteraciones en la metilación del DNA.

Se ha demostrado que las pacientes con SOP presentan hiperandrogenismo bioquímico, así como aumento en los niveles de LH y una disminución en los niveles de FSH, además de tener mayor probabilidad de presentar sobrepeso y obesidad con respecto a mujeres sin la enfermedad. Como ya se mencionó con anterioridad, el SOP tiene un importante impacto en el metabolismo de las pacientes con esta enfermedad, caracterizado principalmente por hiperinsulinemia y resistencia a la insulina, que son factores de riesgo para desarrollar enfermedades como DM II, dislipidemia y síndrome metabólico (Escobar-Morreale, 2018; Merino et al., 2015; Rosenfield et al., 2016). Tal y como se muestra en la tabla 6, los valores de IMC de las pacientes con SOP disminuyeron después de someterse al tratamiento con metformina, mostrando una diferencia significativa con respecto al inicio del tratamiento. La tendencia general del grupo de las pacientes después del tratamiento con respecto al estado inicial consiste en una disminución del IMC (incluso en una paciente con obesidad cuyo IMC inicial fue de 38.5 y que disminuyó a 36.9), teniendo pacientes cuya escala de IMC antes del tratamiento se clasificaba en sobrepeso y posterior al tratamiento su clasificación era de normal (Fig.14), dicho efecto era esperado debido a la actividad que la metformina tiene sobre el metabolismo.

Tal y como se presenta en la Tabla 6, existen cambios estadísticamente significativos en los niveles hormonales de las pacientes con SOP antes del tratamiento con respecto a mujeres del grupo control, siendo elevados en el grupo de pacientes los del precursor androgénico androstenediona, el estradiol, la testosterona, relación LH/FSH, así como el

porcentaje de andrógenos libres. Como ya se mencionó en la introducción de este trabajo, el ovario aporta un 60% de los niveles hormonales circulantes en la mujer. Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que existe una alteración en la actividad ovárica en las pacientes de estudio considerando el incremento en los niveles de androstenediona antes del tratamiento con metformina (los cuales son prácticamente el doble con respecto al grupo control). Lo anterior sugiere que existe una actividad elevada en las células de la Theca, debido a que en dichas células se lleva a cabo la síntesis y liberación de androstenediona, la cual a su vez es captada por células de la granulosa, las cuales generan dos productos principalmente: estradiol y dehidroepiandrosterona (DHEA) (Chou & Chen, 2018) Resulta interesante que al igual que androstenediona, los niveles de estradiol son elevados, de esta manera evidenciando una alteración ovárica muy probablemente en células de la Theca y células de la granulosa en la patología del SOP. Es importante mencionar que aunque se presentó una elevación en los niveles de androstenediona y a su vez de estradiol, el cual es el estrógeno más potente presente en la mujer, el perfil androgénico muestra un fenotipo de SOP clásico (Fig. 2), el cual está evidenciado por la elevación en los niveles de testosterona y por consecuente en el porcentaje de andrógenos libres, siendo el hiperandrogenismo bioquímico (principalmente por niveles elevados de testosterona) un criterio importante para su diagnóstico. A pesar de que la concentración de la SHBG no se encuentra significativamente disminuida, sí se presenta una elevación en la cantidad total de andrógenos libres.

Como ya se mencionó con anterioridad, las pacientes con SOP antes del tratamiento con metformina presentan un fenotipo hiperandrogénico, pero que a su vez favorece la síntesis y secreción de estradiol, probablemente como parte de un mecanismo compensatorio o una alteración en la esteroidogénesis. Dado los resultados presentados se sugiere que la actividad aromatasa puede ser estimulada por el hiperandrogenismo *per se*, mediante mecanismos indirectos sobre células de la granulosa debido a que tanto los niveles de androstenediona, testosterona y estradiol aumentan simultáneamente, demostrando una actividad normal o inclusive compensatoria en la conversión de andrógenos a estrógenos, lo cual refleja una alteración en la esteroidogénesis observada

en modelos animales de SOP (Veiga-Lopez et al., 2008). En el presente trabajo no se observaron cambios en los niveles de progesterona esto debido a que todas las biopsias de endometrio fueron tomadas durante la fase proliferativa (días 8 a 10).

Por otra parte, la relación LH/FSH fue significativamente mayor en las pacientes con SOP respecto a controles, generando así una disminución relativa de los niveles de FSH. Es importante mencionar que la proporción LH/FSH no es mayor a 2, y que en la gran mayoría de los estudios realizados en pacientes con SOP la relación de dichas hormonas es mayor o igual a 2, por lo que dicha proporción podría ser característica de la población estudiada. La alteración en la proporción LH/FSH impactan en la actividad de las células de la Theca, ya que la LH (al igual que insulina) estimula a dichas células para favorecer la síntesis de andrógenos mediante la inducción de la expresión del gen *CYP17A1* (Baptiste et al., 2010). Sin embargo, dicha elevación puede no ser la única variable que afecte a la actividad de las células de la Theca y por consecuencia que se favorezca el hiperandrogenismo sobre todo en los niveles elevados de androstenediona.

Otra característica del cuadro patológico del SOP es la afectación del metabolismo, caracterizada principalmente por la presencia de hiperinsulinemia. Como se muestra en la Tabla 6, el 83% de las pacientes antes del tratamiento presentan hiperinsulinemia, la cual se evidencia en el índice HOMA, mostrando así, que las pacientes con SOP antes del tratamiento presentan resistencia a la insulina. Este hallazgo es relevante debido a que la hiperinsulinemia tiene como consecuencia la estimulación de la glándula adrenal y el ovario (en células de la Theca), favoreciendo un estado de hiperandrogenismo (Fig. 8), principalmente por la elevación de androstenediona y testosterona. La elevación en el índice LH/FSH y los niveles de insulina sugieren que se está favoreciendo la actividad de las células de la Theca, las cuales al ser estimuladas generan androstenediona que es captada por células de la granulosa para generar estrona y estradiol. De esta manera se propone que existe una relación entre el hiperandrogenismo y la hiperinsulinemia, generando de esta manera un “círculo vicioso” en el cual una variable metabólica impacta con una variable hormonal y viceversa (Condorelli et al., 2018).

Posterior al tratamiento con metformina, se observa una disminución en los niveles de androstenediona, testosterona y el índice de andrógenos libres en las pacientes con SOP, sin embargo, estadísticamente no son comparables con respecto al grupo control. Lo anterior sugiere que la metformina regula la secreción de andrógenos a nivel de glándula adrenal. Tal y como se presenta en la Fig.8, la hiperinsulinemia favorece la actividad de la glándula adrenal y por tanto la secreción de andrógenos, por lo que, la metformina al disminuir la hiperinsulinemia, también disminuye la actividad adrenal (Baptiste et al., 2010), viéndose reflejado en el descenso moderado de androstenediona, y el porcentaje de andrógenos libres.

Por otra parte, el tratamiento con metformina generó un aumento en los niveles de SHBG, lo que sustenta la disminución que se presentó en los niveles de androstenediona y en la proporción de andrógenos libres. Esto sugiere que el tratamiento con metformina modula el hiperandrogenismo por dos vías, siendo la primera por la producción hepática de SHBG atribuido a la disminución de hiperinsulinemia, y la segunda por disminución del aporte androgénico por parte de la glándula adrenal, sin embargo, se requieren realizar más estudios que sustenten esta hipótesis. En el segundo caso, la disminución de andrógenos posterior al tratamiento con metformina puede ser atribuida a la inhibición de la actividad androgénica a nivel de glándula adrenal, dejando a la actividad ovárica como el único responsable del exceso de andrógenos restante.

Adicionalmente, posterior al tratamiento se obtuvo una elevación en los niveles de LH y FSH, ambos siendo diferentes con respecto a pacientes antes del tratamiento, pero conservándose la relación LH/FSH, lo que a su vez no tendría efecto en los niveles de andrógenos.

El tratamiento con metformina tuvo un gran impacto en la condición de hiperinsulinemia mediante la disminución del índice HOMA, el cual posterior al tratamiento es comparable con respecto a controles, mostrando el potencial de la metformina para reestablecer dicha condición. Resulta interesante que antes del tratamiento con metformina la hiperinsulinemia muestra un comportamiento similar al hiperandrogenismo, siendo ambos elevados en las pacientes con SOP. Posterior al tratamiento con metformina no

se observa esta relación, lo que sugiere que existen otros mecanismos que promueven la producción de andrógenos y que es independiente a las actividades de la insulina, probablemente a nivel de ovario. En este trabajo la presencia de hiperinsulinemia en las pacientes con SOP es de gran relevancia, ya que se observó que dichas pacientes presentaron una disminución en la expresión de genes relacionados con la vía de señalización de la insulina, y ambas alteraciones fueron revertidas por el tratamiento con metformina.

Por otra parte, a nivel metabólico también se determinaron los niveles de glucosa, los cuales son ligeramente más elevados en las pacientes antes y después del tratamiento con respecto a controles, sin embargo, los tres grupos de estudios se encuentran dentro de los valores de referencia establecidos en población general. Estos resultados corresponden a lo informado previamente en la literatura, en la que se ha establecido que las pacientes con este síndrome no presentan glucemias elevadas (Baptiste et al., 2010). No se encontraron cambios estadísticamente significativos entre los valores de glucosa debido a que se obtuvieron dos resultados inesperados de pacientes cuyos valores de glucemia después del tratamiento son ligeramente más elevados en comparación a sus niveles de glucosa antes del tratamiento (dichos valores siguen dentro de los valores de referencia). Resulta interesante que estas dos pacientes cuyas glucemias fueron más elevadas después del tratamiento, también presentaron niveles de expresión elevados en los tres genes de estudio, así como también, tuvieron un restablecimiento de sus ciclos menstruales (Fig. 14). Esto sugiere que se está viendo favorecida la función endometrial durante el ciclo ovárico-endometrial, favoreciendo a su vez una liberación moderada de glucosa para consumo de dicho tejido (Ullah et al., 2017), lo que podría justificar las glucemias elevadas, pero dentro de los valores de referencia.

Como ya se mencionó en el párrafo anterior, uno de los efectos que se observaron y van de acuerdo a lo publicado en otros estudios, es el restablecimiento de los ciclos menstruales (Rezk et al., 2018), los cuales en este estudio se observaron en un 83% de las pacientes, lo cual indica que la metformina también tiene acción a nivel tejido específico, en este caso, a nivel de ovario y endometrio humano, poniendo de manifiesto el potencial de la metformina como agente inductor de la ovulación.

Posteriormente, un análisis más específico presentado en la Fig. 17, consistió en evaluar y determinar el efecto de la metformina sobre la metilación del DNA, usando dos marcadores de metilación global. Estos marcadores consistieron en el promotor de *H19*, gen de impronta materna, y el gen *LINE-1*, el cual consiste en regiones repetitivas en el genoma que se encuentran silenciadas por metilación de DNA. En la Fig. 17, se presenta el enriquecimiento de metilación de sitios CpG de los genes *H19* y *LINE-1* con respecto al observado en el grupo control, demostrando que el impacto de la metformina sobre la metilación en los marcadores de metilación global que comúnmente se encuentran hipermetilados no es significativo. En un estudio previo en el que se evaluó la metilación de CpGs de *LINE-1* en células de la granulosa y leucocitos de sangre periférica, se demostró una asociación entre la hipometilación de un sitio CpG específico con la susceptibilidad al SOP (Sagvekar et al., 2017), sin embargo, en este estudio no se observaron cambios de metilación en *LINE-1* a nivel de endometrio, lo que sugiere que dichos cambios son tejido específico. Por otra parte, se observó un aumento moderado de metilación en el gen *H19* en las pacientes después del tratamiento con metformina (Fig. 17), a pesar de que, estadísticamente dicho cambio no es significativo, este resultado corresponde a un estudio previo en el cual se observa un incremento en la metilación de DNA de *H19* en cáncer de endometrio (Yan et al., 2015), por lo que es indispensable aumentar el tamaño de la muestra y establecer el efecto de la metformina sobre el gen *H19* en el endometrio de pacientes con SOP. Cabe mencionar que la patología del SOP no se ha caracterizado por una alteración mayor en la metilación de regiones de repetidos como en el cáncer o bien en regiones de impronta como en el síndrome Beckwith-Wiedemann (Cammarata-Scalisi et al., 2018), lo que confirma los resultados obtenidos.

Con el resultado presentado en la Fig. 17 se demuestra que la técnica MeDIP-qPCR empleada permite evaluar estados de metilación independiente de la región génica. Adicionalmente, se evaluó la capacidad de la técnica para discriminar cantidad de CpGs metilados, en la cual es capaz de discriminar un solo CpG metilado (dato no presentado).

Posteriormente, se evaluaron los niveles de metilación de los genes *GAB1*, *SLC2A4* e *IRS-1* en el endometrio de mujeres sanas y mujeres con SOP antes y después del

tratamiento con metformina. Los resultados obtenidos revelaron que existe un estado de hipometilación en las regiones promotoras de los genes de estudio, así como en la región del intrón del gen *SLC2A4*, en los tres grupos evaluados. Estos resultados refutan la hipótesis principal dado que no se observa un cambio en los estados de metilación en los grupos de estudio. Sin embargo, se presentó un caso particular en el que una paciente presentó un incremento en los niveles de metilación en la región promotora del gen *GAB1* (Fig. 18-carril S4), y posterior al tratamiento se observa la pérdida de dicha metilación (Fig.18-carril S4F). Esta misma paciente presentó un aumento ligero de metilación en la región intrónica del gen *SLC2A4* en comparación con controles, el cual no es apreciado en electroforesis (Fig.18B- carril S4), sin embargo, en el ensayo qPCR es detectado. Debido a que el SOP posee un cuadro patológico heterogéneo, estos cambios particulares de metilación pueden estar asociados a algunos de los diferentes fenotipos del SOP (Fig. 2), confirmando a nivel molecular que se pueden observar diferentes fenotipos en las pacientes con la enfermedad. En particular, la paciente que presentó cambios de metilación en el promotor del gen *GAB1* y la región intrónica del gen *SLC2A4*, presentó mejoras con el tratamiento con metformina como: disminución de IMC (sin cambiar de categoría de IMC) y restablecimiento del ciclo menstrual (presentó dos ciclos espontáneos a lo largo del tratamiento). Este hallazgo es relevante, ya que la paciente había tenido pérdida del ciclo menstrual durante un año previo al tratamiento con metformina. Los resultados obtenidos en esta paciente implicarían no solamente que se está llevando a cabo una activación de la vía de la insulina a nivel de endometrio en la rama metabólica, sino que también en la rama mitogénica, permitiendo dar paso a procesos de crecimiento y división celular que favorecen la presencia de los ciclos menstruales y por consecuencia al ciclo endometrial. Sin embargo, se requieren más estudios para confirmar lo anterior.

Por otra parte, el resultado de la paciente cuyo cambio es el estado de metilación en la región promotora del gen *GAB1* (Fig. 18) no fue el esperado de acuerdo con los trabajos previos, ya que estos estudios indican que la metformina aumenta los niveles de metilación al promover la activación indirecta de DNMT3b (Zhong et al., 2017). Sin embargo, no se puede descartar que la metformina pudiera modular otros mecanismos

epigenéticos o de regulación de la transcripción. Uno de estos mecanismos, es el involucrado en la activación de la desmetilación activa del DNA, probablemente mediante la activación de las enzimas TET. Es interesante que en la actualidad solo existe un trabajo en el cual se ha propuesto la activación indirecta de TET mediante el mediador endógeno AMPK, el principal blanco de metformina (Yang et al., 2016).

De acuerdo a la literatura, la metilación del DNA por efecto de metformina es llevada a cabo mediante la activación indirecta de la enzima DNMT3b, la cual es encargada de realizar el proceso de metilación *de novo*. Dicho proceso se ha estudiado principalmente en cáncer, en la cual se asocia el desarrollo de estas patologías por metilación en genes supresores de tumor y/o desmetilación de oncogenes (Delpu et al., 2013; Zhong et al., 2017), entre otras causas. Por lo que la metilación *de novo* por DNMT3b podría ser observado en estas patologías, que de igual manera alteraría la expresión de los genes involucrados. De acuerdo a los resultados obtenidos en el gen *GAB1*, al mostrar cambios de metilación, sería interesante evaluar su perfil de expresión y metilación simultáneamente en una muestra mayor para demostrar cómo actúa la metformina y la actividad de DNMT3b sobre este gen en particular, ya que, estudios relacionan la sobreexpresión de *GAB1* con algunos tipos de cáncer, tal es el caso del cáncer epitelial de ovario (Hu et al., 2016). Sin embargo, actualmente no existen estudios a nivel de endometrio.

Al no encontrar cambios significativos en los niveles de metilación en los genes de estudio, conlleva a suponer que la regulación de dichos genes también esta mediada por otros mecanismos epigenéticos (modificación de histonas y remodeladores de cromatina), o por miRNAs, tal como se propone para *GAB1* (Xu et al., 2018)

De manera general, los resultados demostraron que los tres genes de estudio se encuentran hipometilados en el endometrio de los tres grupos de trabajo. Por otro lado, considerando que la metformina regula la expresión de genes relacionados con el metabolismo en diferentes tejidos, y que las pacientes evaluadas presentaron hiperinsulinemia antes del tratamiento, se procedió a evaluar los niveles de expresión de los genes de estudio en el endometrio de las pacientes evaluadas. Los resultados de

expresión a nivel de mRNA presentaron cambios interesantes, principalmente entre los grupos de controles y pacientes antes del tratamiento (Fig. 19).

En la Fig. 19A se observa una disminución significativa de la expresión del gen *GAB1* del grupo de pacientes antes del tratamiento en comparación con el grupo control, así como también, un incremento en la expresión después del tratamiento con metformina. Estos resultados correlacionan con los cambios de metilación observados en la paciente S4, ya que en el endometrio de la paciente con SOP antes del tratamiento con metformina se observó un incremento en los niveles de metilación en la región promotora del gen *GAB1* en comparación con los controles, el cual se revirtió después del tratamiento. Lo anterior sugiere que la disminución de la metilación en el promotor del gen *GAB1* favorece la expresión del gen, la cual es reestablecida por el tratamiento con metformina, lo que a su vez tiene una gran relevancia debido a la función que desempeña *GAB1* en el crecimiento y proliferación celular (Hu et al., 2016). Considerando que las muestras de endometrio se tomaron en fase proliferativa, este resultado indicaría que en efecto dicho endometrio se encuentra en fase proliferativa por la expresión de *GAB1* favoreciendo la proliferación del mismo, sin embargo, es necesario evaluar los niveles de expresión de este gen en fase secretora, para determinar la importancia de *GAB1* en cada fase del endometrio a lo largo del ciclo menstrual. Por otra parte, sería interesante evaluar más genes encargados de regular la proliferación celular, tales como los que codifican a las proteínas RAS, RAF, y GRB2, o bien caracterizar la expresión conjunta y actividad de las proteínas MAPK, ya que son indispensables para la modulación de señales intracelulares de crecimiento y proliferación celular, tal y como se muestra en la Fig.2.

En la Fig. 19B, se observa que la expresión del gen *SLC2A4* en el endometrio de pacientes antes del tratamiento con metformina es menor con respecto al grupo control ($p < 0.05$). Este hallazgo coincide con los valores obtenidos de insulina en suero, y de hiperinsulinemia lo que puede afectar la expresión del gen *SLC2A4* esto debido a que dicho producto proteico del gen, es activado y movilizado mediante la señalización adecuada de insulina, por lo que, al existir un estado de alteración en los niveles y muy probablemente en la actividad de la insulina se ve afectado el requerimiento de dicho producto génico. Posterior al tratamiento con metformina, se observó una disminución en

los niveles de insulina y un restablecimiento en los niveles de expresión de *SLC2A4*, lo que sugiere que la intervención metabólica con metformina tiene un impacto importante sobre la hiperinsulinemia y la sensibilidad a dicha hormona a nivel de endometrio. Es importante mencionar que aunque se observó una disminución notable en la expresión del gen *SLC2A4* en las pacientes antes del tratamiento con metformina, esto no necesariamente refleja la actividad del producto que codifica (GLUT4), ya que es necesario que GLUT4 sea vesiculado y traslocado a la membrana citoplasmática para ser funcional (María et al., 2010). Por otra parte, se observa que después del tratamiento con metformina existe un aumento notable en la expresión de dicho gen, que aunque estadísticamente no es significativo, ya no difiere con los niveles de expresión de los controles, lo que sugiere que la expresión se normalizó en dichas pacientes. Es importante mencionar que la paciente con obesidad después del tratamiento con metformina presentó un aumento más pronunciado en la expresión de *SLC2A4* en comparación con las otras pacientes, lo cual sugiere que la metformina tiene un gran impacto en la expresión de genes relacionados al transporte de glucosa, lo que demuestra sus acciones como fármaco para el control glucémico e insulínico en pacientes con alteraciones metabólicas.

Este resultado es comparable con los obtenidos en trabajos previos, ya que se ha demostrado en diferentes modelos (músculo esquelético, endometrio y tejido adiposo) que la metformina favorece la expresión de GLUT4 a nivel de mRNA y proteína (Li et al., 2015). Al analizar los resultados obtenidos no se encuentra una relación directa entre el estado de metilación en las regiones de Intrón y promotor del gen *SLC2A4* y los cambios en los niveles de expresión, lo cual sugiere que la expresión de este gen podría regularse por otros mecanismos independientes de la metilación. Existe evidencia que sustenta que otro mecanismo de regulación de la expresión de este gen es mediante miRNAs, tal es el caso del miRNA-95, el cual se ha demostrado que se encuentra sobreexpresado en músculo esquelético de pacientes con SOP. Se ha propuesto que este miRNA actúa inhibiendo la expresión de *SLC2A4* y por tanto generando una disminución en los niveles proteicos de GLUT4 (Chen et al., 2013). Actualmente no hay ningún estudio en el que se evalúen los niveles de metilación del gen *SLC2A4*, por lo que este estudio demuestra el

estado basal de metilación en el endometrio, así como la propuesta de que otros mecanismos epigenéticos pudieran regular su expresión. Lo anterior es de gran relevancia ya que el SOP es una patología que predispone para padecer DM II.

Con los resultados obtenidos, principalmente en las dos pacientes cuyas glucemias fueron elevadas después del tratamiento (una de las cuales presenta disminución en la expresión del gen *SLC2A4*), se propone caracterizar la expresión del miRNA-95 y evaluar el efecto que tiene el tratamiento con metformina sobre este tipo de RNAs no codificantes.

El hallazgo de encontrar niveles elevados de insulina (además del índice HOMA, que indica resistencia a la insulina) y niveles bajos de expresión de *SLC2A4* en el endometrio de pacientes antes del tratamiento con metformina respecto a controles, sugiere que en el endometrio existen otras proteínas encargadas del transporte de glucosa, aunque para confirmar esto primero sería necesario determinar los niveles de glucosa directamente en el endometrio de las pacientes y establecer si se modifican con el tratamiento con metformina. Se ha demostrado que en el endometrio se expresan otros miembros de la familia SLC que codifican para productos como GLUT1, el cual desempeña la función de proporcionar un aporte constante de glucosa y el cual se encuentra sobreexpresado en la fase secretora endometrial (María et al., 2010). Esto sugiere que la glucemia y el consumo de glucosa no sólo dependen de los niveles de expresión de *SLC2A4* ni de su producto proteico, sino de la afectación a los demás miembros de esta familia, sin embargo, se requieren más estudios para confirmar esta observación.

La relevancia de encontrar niveles de expresión normales de los genes *GAB1* y *SLC2A4* después del tratamiento con metformina, y considerando la inducción de la ovulación en el 83% de las pacientes, sugiere que el endometrio bajo las acciones de metformina se encuentra realizando los procesos normales que lleva a cabo para pasar de un endometrio proliferativo a un endometrio secretor (decidualizado). Una de las características del endometrio decidualizado es la secreción de glucógeno, lo que proporciona una mayor probabilidad para la implantación exitosa del embrión (Giudice, 2006), por lo que, la regulación de la expresión del gen *SLC2A4* juega un papel importante para proporcionar toda la glucosa necesaria para llevar a cabo los procesos

de crecimiento, proliferación y especialización celular que llevan a cabo las células del endometrio.

En la Fig. 19C se presentan los niveles de expresión relativa del gen *IRS-1*, el cual al igual que los dos genes previos, se observa una disminución significativa en el endometrio de las pacientes antes del tratamiento con metformina al comparar con el grupo control. Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas al comparar los niveles de expresión de *IRS-1* entre el grupo de pacientes después del tratamiento con respecto a los otros dos grupos restantes. Al no encontrar cambios en los estados de metilación en la región promotora de dicho gen, pero sí en los niveles de expresión, se sugiere que al igual que en *GAB1* se esté observando un estado de desmetilación homogéneo que no está relacionado con los fenotipos del SOP. Dado lo anterior, se propone aumentar el número de individuos de estudio para poder tener un análisis más certero y evaluar los cambios generados por el tratamiento con metformina. Se ha descrito que existen al menos dos variantes de este gen a nivel de endometrio (*IRS-1* e *IRS-2*), las cuales desempeñan la misma función de activación de la vía de insulina (Tamura et al., 2016), por lo que surge la propuesta de evaluar los niveles de expresión del gen *IRS-2* y comparar con los niveles obtenidos con *IRS-1* y determinar la importancia de cada uno de ellos. El producto proteico del gen *IRS-1* es importante ya que es el encargado de iniciar la activación de ambas ramas de la vía de la insulina dando paso a los eventos de proliferación celular y secreción de glucógeno, por lo que, la evidencia experimental sugiere que un defecto en la actividad de la vía de la insulina puede ser atribuido en principio por la disminución de la expresión de *IRS-1*.

Finalmente, los resultados de expresión de los genes *IRS-1*, *GAB1* y *SLC2A4* antes y después del tratamiento muestran una relación con los niveles de insulina, lo que sugiere que la metformina mejora la condición de hiperinsulinemia a nivel sistémico y en el endometrio de las pacientes con SOP. A su vez, se sugiere que la metformina es capaz de modular la vía de señalización de la insulina a nivel de mRNA en ambas ramas, la metabólica y la mitogénica, lo cual podría influir en la correcta funcionalidad del endometrio y el progreso de sus fases.

11. Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron que las regiones reguladoras de los genes *GAB1*, *SLC2A4* e *IRS-1* se encuentran hipometiladas en el endometrio de mujeres con SOP y mujeres sin la enfermedad. Posterior al tratamiento con metformina no se presentaron cambios significativos en dichos estados de metilación. Adicionalmente, se estableció que la intervención metabólica con metformina restaura los niveles de expresión de genes relacionados con la vía de la insulina en el endometrio de mujeres con SOP, de tal manera que son comparables con respecto a pacientes sanas, lo cual correlaciona con la disminución en los niveles séricos de insulina y por consecuente en el índice HOMA. Nuestros resultados sugieren que la intervención metabólica con metformina promueve el restablecimiento de la sensibilidad a la insulina a nivel sistémico y de la expresión de genes fundamentales en la señalización de la insulina en el endometrio de pacientes con SOP.

12. REFERENCIAS

- Abu Hashim, H., Foda, O., & Ghayaty, E. (2015). Combined metformin-clomiphene in clomiphene-resistant polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, *94*(9), 921–930. <https://doi.org/10.1111/aogs.12673>
- Afzal, M. Z., Mercado, R. R., & Shirai, K. (2018). Efficacy of metformin in combination with immune checkpoint inhibitors (anti-PD-1/anti-CTLA-4) in metastatic malignant melanoma. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, *6*(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0375-1>
- Amjadi, F., Mehdizadeh, M., Ashrafi, M., Nasrabadi, D., Taleahmad, S., Mirzaei, M., ... Aflatoonian, R. (2018). Distinct changes in the proteome profile of endometrial tissues in polycystic ovary syndrome compared with healthy fertile women. *Reproductive Biomedicine Online*, *37*(2), 184–200. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.04.043>
- Arima, R., Marttila, M., Hautakoski, A., Arffman, M., Sund, R., Ilanne-Parikka, P., ... Puistola, U. (2018). Antidiabetic Medication, Statins and the Risk and Prognosis of Non-endometrioid Endometrial Cancer in Women with Type 2 Diabetes. *Anticancer Research*, *38*(7), 4169–4178. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12710>
- Arner, P., Kulyté, A., Batchelor, K., Laurencikiene, J., Livingston, J., & Rydén, M. (2018). Mapping of biguanide transporters in human fat cells and their impact on lipolysis. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, *20*(10), 2416–2425. <https://doi.org/10.1111/dom.13395>
- Aulinas, A., Valassi, E., & Webb, S. M. (2014). Pronóstico del paciente tratado de síndrome de Cushing. *Endocrinología y Nutrición*, *61*(1), 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2013.03.008>
- Azziz, R., Carmina, E., Chen, Z., Dunaif, A., Laven, J. S. E., Legro, R. S., ... Yildiz, B. O. (2016). Polycystic ovary syndrome. *Nature Reviews Disease Primers*, *2*, 16057. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.57>
- Baptiste, C. G., Battista, M.-C., Trottier, A., & Baillargeon, J.-P. (2010). Insulin and
-

-
- hyperandrogenism in women with polycystic ovary syndrome. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 122(1–3), 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2009.12.010>
- Barber, T. M., Dimitriadis, G. K., Andreou, A., & Franks, S. (2015). Polycystic ovary syndrome: insight into pathogenesis and a common association with insulin resistance. *Clinical Medicine*, 15(Suppl_6), s72–s76. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.15-6-s72>
- Bashtrykov, P., Rajavelu, A., Hackner, B., Ragozin, S., Carell, T., & Jeltsch, A. (2014). Targeted mutagenesis results in an activation of DNA methyltransferase 1 and confirms an autoinhibitory role of its RFTS domain. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 15(5), 743–748. <https://doi.org/10.1002/cbic.201300740>
- Bourc'his, D., & Viegas-Péquignot, E. (2006). Epigenetic Factors and Chromosome Organization. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–6. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0005788>
- Bremer, A. A., & Miller, W. L. (2008). The serine phosphorylation hypothesis of polycystic ovary syndrome: a unifying mechanism for hyperandrogenemia and insulin resistance. *Fertility and Sterility*, 89(5), 1039–1048. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.02.091>
- Cammarata-Scalisi, F., Avendaño, A., Stock, F., Callea, M., Sparago, A., & Riccio, A. (2018). Beckwith-Wiedemann syndrome. Clinical and etiopathogenic aspects of a model genomic imprinting entity. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 116(5), 368–373. <https://doi.org/10.5546/aap.2018.eng.368>
- Cao, J., Meng, S., Chang, E., Beckwith-Fickas, K., Xiong, L., Cole, R. N., ... He, L. (2014). Low Concentrations of Metformin Suppress Glucose Production in Hepatocytes through AMP-activated Protein Kinase (AMPK). *Journal of Biological Chemistry*, 289(30), 20435–20446. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.567271>
- Carmina, E., Oberfield, S. E., & Lobo, R. A. (2010). The diagnosis of polycystic ovary syndrome in adolescents. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 203(3),
-

201.e1-201.e5. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.03.008>

Carvajal, R., Rosas, C., Kohan, K., Gabler, F., Vantman, D., Romero, C., & Vega, M. (2013). Metformin augments the levels of molecules that regulate the expression of the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the endometria of hyperinsulinemic PCOS patients. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 28(8), 2235–2244. <https://doi.org/10.1093/humrep/det116>

Cerbón, M. a. (2014). Metilación del ADN: un fenómeno epigenético de importancia médica DNA methylation: an epigenetic process of medical importance. *Revista de Investigación Clínica*, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2014.07.029>

Chédin, F. (2011). The DNMT3 Family of Mammalian De Novo DNA Methyltransferases. In *Progress in molecular biology and translational science* (Vol. 101, pp. 255–285). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387685-0.00007-X>

Chen, Y.-H., Heneidi, S., Lee, J.-M., Layman, L. C., Stepp, D. W., Gamboa, G. M., ... Azziz, R. (2013). miRNA-93 inhibits GLUT4 and is overexpressed in adipose tissue of polycystic ovary syndrome patients and women with insulin resistance. *Diabetes*, 62(7), 2278–2286. <https://doi.org/10.2337/db12-0963>

Chou, C.-H., & Chen, M.-J. (2018). The Effect of Steroid Hormones on Ovarian Follicle Development. *Vitamins and Hormones*, 107, 155–175. <https://doi.org/10.1016/BS.VH.2018.01.013>

Condorelli, R. A., Calogero, A. E., Di Mauro, M., Mongioi', L. M., Cannarella, R., Rosta, G., & La Vignera, S. (2018). Androgen excess and metabolic disorders in women with PCOS: beyond the body mass index. *Journal of Endocrinological Investigation*, 41(4), 383–388. <https://doi.org/10.1007/s40618-017-0762-3>

Crison, J. R., Timmins, P., Keung, A., Upreti, V. V, Boulton, D. W., & Scheer, B. J. (2012). Biowaiver approach for biopharmaceutics classification system class 3 compound metformin hydrochloride using in silico modeling. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101(5), 1773–1782. <https://doi.org/10.1002/jps.23063>

Dávalos-Salas., I. M., & Recillas-Targa, F. (2005). La vía Rb /E2F y la familia de proteínas

-
- represoras Polycomb en el desarrollo de cáncer. *Tip Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas TIP Rev.Esp.Cienc.Quím.Biol*, 8(1), 38–49. Retrieved from <http://www.revistas.unam.mx/index.php/tip/article/view/43058>
- Dean, W. (2016). Pathways of DNA Demethylation. In *Advances in experimental medicine and biology* (Vol. 945, pp. 247–274). https://doi.org/10.1007/978-3-319-43624-1_11
- Delgado-Coello, B. A. (2011). Epigenética?, 73–82. Retrieved from http://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/62_1/PDF/12_Epigenetica.pdf
- Delpu, Y., Cordelier, P., Cho, W. C., & Torrisani, J. (2013). DNA methylation and cancer diagnosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), 15029–15058. <https://doi.org/10.3390/ijms140715029>
- Desmettre, T. J. (2018). Epigenetics in Age-related Macular Degeneration (AMD). *Journal Français d'Ophtalmologie*, 41(9), e407–e415. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2018.09.001>
- Ding, D.-C., Chen, W., Wang, J.-H., & Lin, S.-Z. (2018). Association between polycystic ovarian syndrome and endometrial, ovarian, and breast cancer. *Medicine*, 97(39), e12608. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000012608>
- Escobar-Morreale, H. F. (2018). Polycystic ovary syndrome: definition, aetiology, diagnosis and treatment. *Nature Reviews. Endocrinology*, 14(5), 270–284. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2018.24>
- Francisco, J., & Gonz, C. O. (2013). Síndrome de ovario poliquistico. *Revista Mexicana de Medicina de La Reproducción*, 57–68.
- García Sainz, J. A. (2016). *Hormonas mensajeros quimicos* (5th ed.). Ciudad de México.
- Garduño, L. (2009). *Farmacocinetica poblacional de metformina en mexicanos*. Insituto Politecnico Nacional.
- Giudice, L. C. (2006). Endometrium in PCOS: Implantation and predisposition to endocrine CA. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 20(2), 235–244. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2006.03.005>
-

-
- Hackett, J. A., Sengupta, R., Zyllicz, J. J., Murakami, K., Lee, C., Down, T. A., & Surani, M. A. (2013). Germline DNA Demethylation Dynamics and Imprint Erasure Through 5-Hydroxymethylcytosine. *Science*, 339(6118), 448–452. <https://doi.org/10.1126/science.1229277>
- He, S., Sun, H., Lin, L., Zhang, Y., Chen, J., Liang, L., ... Zheng, H. (2017). Passive DNA demethylation preferentially up-regulates pluripotency-related genes and facilitates the generation of induced pluripotent stem cells. *Journal of Biological Chemistry*, 292(45), 18542–18555. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.810457>
- Hu, L., & Liu, R. (2016). Expression of Gab1 Is Associated with Poor Prognosis of Patients with Epithelial Ovarian Cancer. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 239(3), 177–184. <https://doi.org/10.1620/tjem.239.177>
- Indhavivadhana, S., Rattanachaiyanont, M., Wongwananuruk, T., Techatraisak, K., Rayasawath, N., & Dangrat, C. (2018). Endometrial neoplasia in reproductive-aged Thai women with polycystic ovary syndrome. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 142(2), 170–175. <https://doi.org/10.1002/ijgo.12522>
- Jeltsch, A. R. J. (2016). *DNA Methyltransferases - Role and Function*. (A. Jeltsch & R. Z. Jurkowska, Eds.) (Vol. 945). Cham: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-43624-1>
- Jones, M. R., Brower, M. A., Xu, N., Cui, J., Mengesha, E., Chen, Y. D. I., ... Goodarzi, M. O. (2015). Systems Genetics Reveals the Functional Context of PCOS Loci and Identifies Genetic and Molecular Mechanisms of Disease Heterogeneity. *PLoS Genetics*, 11(8), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005455>
- Kohli, R. M., & Zhang, Y. (2013). TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*, 502(7472), 472–479. <https://doi.org/10.1038/nature12750>
- Kokosar, M., Benrick, A., Perfilyev, A., Nilsson, E., Källman, T., Ohlsson, C., ... Stener-Victorin, E. (2018). A Single Bout of Electroacupuncture Remodels Epigenetic and Transcriptional Changes in Adipose Tissue in Polycystic Ovary Syndrome. *Scientific Reports*, 8(1), 1878. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17919-5>
-

-
- Kovo, M., Haroutiunian, S., Feldman, N., Hoffman, A., & Glezerman, M. (2008). Determination of metformin transfer across the human placenta using a dually perfused ex vivo placental cotyledon model. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 136(1), 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2007.01.013>
- Laviola, L., Natalicchio, A., & Giorgino, F. (2007). The IGF-I signaling pathway. *Current Pharmaceutical Design*, 13(7), 663–669. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17346182>
- Law, P.-P., & Holland, M. (2018). Deciphering the Role of the Non-Coding Genome in Regulating Gene-Diet Interactions. *Nutrients*, 10(12), 1831. <https://doi.org/10.3390/nu10121831>
- Lee, J. O., Lee, S. K., Kim, J. H., Kim, N., You, G. Y., Moon, J. W., ... Kim, H. S. (2012). Metformin Regulates Glucose Transporter 4 (GLUT4) Translocation through AMP-activated Protein Kinase (AMPK)-mediated Cbl/CAP Signaling in 3T3-L1 Preadipocyte Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 287(53), 44121–44129. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.361386>
- Li, X., Cui, P., Jiang, H.-Y., Guo, Y.-R., Pishdari, B., Hu, M., ... Shao, R. (2015). Reversing the reduced level of endometrial GLUT4 expression in polycystic ovary syndrome: a mechanistic study of metformin action. *American Journal of Translational Research*, 7(3), 574–586. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26045896>
- Mahadevan, S., Sathappan, V., Utama, B., Lorenzo, I., Kaskar, K., & Van Den Veyver, I. B. (2017). Maternally expressed NLRP2 links the subcortical maternal complex (SCMC) to fertility, embryogenesis and epigenetic reprogramming. *Scientific Reports*, 7(November 2016). <https://doi.org/10.1038/srep44667>
- María, D., Pustovrh, C., Villarroel, C., Arriagada, B. C., Muñoz, T. M. A., Biología, L. De, ... Molecular, B. (2010). Expresión y función de los glucotransportadores en el endometrio humano : efecto del síndrome de ovario poliquístico y el tratamiento con metformina. *Revista de La Sociedad Argentina de Endocrinología Ginecológica y*
-

Reproductiva, 17(3), 24–38.

- McAllister, J. M., Legro, R. S., Modi, B. P., Strauss, J. F., & III. (2015). Functional genomics of PCOS: from GWAS to molecular mechanisms. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 26(3), 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.12.004>
- Merino, P. M., Schulin-Zeuthen, P. C., Cannoni, B. G., & Conejero, R. C. (2015). Síndrome de ovario poliquístico: diagnóstico en la adolescencia. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 26(1), 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2015.02.009>
- Miinea, C. P., Sano, H., Kane, S., Sano, E., Fukuda, M., Peränen, J., ... Lienhard, G. E. (2005). AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain. *Biochemical Journal*, 391(1), 87–93. <https://doi.org/10.1042/BJ20050887>
- Moran, C., Tena, G., Moran, S., Ruiz, P., Reyna, R., & Duque, X. (2010). Prevalence of Polycystic Ovary Syndrome and Related Disorders in Mexican Women. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 69(4), 274–280. <https://doi.org/10.1159/000277640>
- Neve, B., Jonckheere, N., Vincent, A., & Van Seuning, I. (2018). Epigenetic Regulation by lncRNAs: An Overview Focused on UCA1 in Colorectal Cancer. *Cancers*, 10(11), 440. <https://doi.org/10.3390/cancers10110440>
- Nilsson, E., Benrick, A., Kokosar, M., Krook, A., Lindgren, E., Källman, T., ... Stener-Victorin, E. (2018). Transcriptional and Epigenetic Changes Influencing Skeletal Muscle Metabolism in Women With Polycystic Ovary Syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 103(12), 4465–4477. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-00935>
- Oróstica, L., Rosas, C., Plaza-Parrochia, F., Astorga, I., Gabler, F., García, V., ... Vega, M. (2016). Altered Steroid Metabolism and Insulin Signaling in PCOS Endometria: Impact in Tissue Function. *Current Pharmaceutical Design*, 22(36), 5614–5624. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27514712>
- Ortega Millán, C. (2015). *Metformina (primer escalón terapéutico): titulación de la dosis*. Retrieved from <http://books.google.co.ve/>
-

-
- Pan, J.-X., Tan, Y.-J., Wang, F.-F., Hou, N.-N., Xiang, Y.-Q., Zhang, J.-Y., ... Huang, H.-F. (2018). Aberrant expression and DNA methylation of lipid metabolism genes in PCOS: a new insight into its pathogenesis. *Clinical Epigenetics*, *10*, 6. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0442-y>
- Pulido, D. I., Scott, M. L., Barreras, C., Soto, F., Barrios, C., & López, C. M. (2016). SINDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO EN MUJERES PORTADORAS DE SINDROME METABÓLICO. *Revista Médica Clínica Las Condes*, *27*(4), 540–544. <https://doi.org/10.1016/J.RMCLC.2016.07.013>
- Rasmussen, K. D., & Helin, K. (2016). Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. *Genes and Development*, *30*(7), 733–750. <https://doi.org/10.1101/gad.276568.115>
- Rezk, M., Shaheen, A.-E., & Saif El-Nasr, I. (2018). Clomiphene citrate combined with metformin versus letrozole for induction of ovulation in clomiphene-resistant polycystic ovary syndrome: a randomized clinical trial. *Gynecological Endocrinology*, *34*(4), 298–300. <https://doi.org/10.1080/09513590.2017.1395838>
- Ricardo, O.-R., Eduardo, L. C., Alba Satisteban, S., Cabezas Cruz, E., Farnot Cardoso, U., Vazquez Cabrera, J., ... Álvarez Báez, P. (2004). Ginecología y obstetricia. In C. Médicas (Ed.) (Vol. 136, pp. 277–325). La Habana, Cuba.
- Richards, K. A., Liou, J., Cryns, V. L., Downs, T. M., Abel, E. J., & Jarrard, D. F. (2018). Metformin Use is Associated with Improved Survival for Patients with Advanced Prostate Cancer on Androgen Deprivation Therapy. *The Journal of Urology*, *200*(6), 1256–1263. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2018.06.031>
- Rodríguez-Dorantes, M., Téllez-Ascencio, N., Cerbón, M. A., López, M., & Cervantes, A. (2004). [DNA methylation: an epigenetic process of medical importance]. *Revista de Investigacion Clínica; Organo Del Hospital de Enfermedades de La Nutricion*, *56*(1), 56–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15144044>
- Roemer, K. L., Young, S. L., & Savaris, R. F. (2014). Characterization of GAB1 expression over the menstrual cycle in women with and without polycystic ovarian syndrome
-

-
- provides a new insight into its pathophysiology. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99(11), E2162-8. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-2128>
- Rosas, C., Oróstica, L., Poblete, C., Carvajal, R., Gabler, F., Romero, C., ... Vega, M. (2016). Hyperandrogenism Decreases GRP78 Protein Level and Glucose Uptake in Human Endometrial Stromal Cells. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 23(6), 761–770. <https://doi.org/10.1177/1933719115618283>
- Rosenfield, R. L., & Ehrmann, D. A. (2016). The Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The Hypothesis of PCOS as Functional Ovarian Hyperandrogenism Revisited. *Endocrine Reviews*, 37(5), 467–520. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1104>
- Sagvekar, P., Mangoli, V., Desai, S., Patil, A., & Mukherjee, S. (2017). LINE1 CpG-DNA Hypomethylation in Granulosa Cells and Blood Leukocytes Is Associated With PCOS and Related Traits. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 102(4), 1396–1405. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-2645>
- Saxonov, S., Berg, P., & Brutlag, D. L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(5), 1412–1417. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510310103>
- Seow, K.-M., Juan, C.-C., Hsu, Y.-P., Hwang, J.-L., Huang, L.-W., & Ho, L.-T. (2007). Amelioration of insulin resistance in women with PCOS via reduced insulin receptor substrate-1 Ser312 phosphorylation following laparoscopic ovarian electrocautery. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 22(4), 1003–1010. <https://doi.org/10.1093/humrep/del466>
- Shao, R., Li, X., Feng, Y., Lin, J.-F., & Billig, H. (2014). Direct effects of metformin in the endometrium: a hypothetical mechanism for the treatment of women with PCOS and endometrial carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 33(1), 41. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-33-41>
- Shu, Y., Sheardown, S. A., Brown, C., Owen, R. P., Zhang, S., Castro, R. A., ... Giacomini,
-

-
- K. M. (2007). Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *Journal of Clinical Investigation*, 117(5), 1422–1431. <https://doi.org/10.1172/JCI30558>
- Simón, C. (2009). El Endometrio Humano: Desde la investigación a la clínica, 242. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=9UUQyEHPX7EC&pgis=1>
- Sweatt, J. D., Nestler, E. J., Meaney, M. J., & Akbarian, S. (2013). *An Overview of the Molecular Basis of Epigenetics. Epigenetic Regulation in the Nervous System* (First Edit). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391494-1.00001-X>
- Tamura, H., & Sugino, N. (2016). Potential mechanism by which glucose regulates decidualization in human endometrial stromal cells. *Fertility and Sterility*, 106(3), e218. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.07.628>
- Tata, B., Mimouni, N. E. H., Barbotin, A. L., Malone, S. A., Loyens, A., Pigny, P., ... Giacobini, P. (2018). Elevated prenatal anti-Müllerian hormone reprograms the fetus and induces polycystic ovary syndrome in adulthood. *Nature Medicine*, 24(6), 834–846. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0035-5>
- Ullah, K., Rahman, T. U., Pan, H.-T., Guo, M.-X., Dong, X.-Y., Liu, J., ... Sheng, J.-Z. (2017). Serum estradiol levels in controlled ovarian stimulation directly affect the endometrium. *Journal of Molecular Endocrinology*, 59(2), 105–119. <https://doi.org/10.1530/JME-17-0036>
- Valencia. (2006). Ovarios poliquísticos. *Guías de Practica Clinica, Instituto Mexicano Del Seguro Social*.
- Vázquez Lara, J. M., & Rodríguez, L. (2015). Manual básico de Obstetricia y Ginecología. *Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad*, 353. <https://doi.org/687-17-010-5>
- Veiga-Lopez, A., Ye, W., Phillips, D. J., Herkimer, C., Knight, P. G., & Padmanabhan, V. (2008). Developmental programming: deficits in reproductive hormone dynamics and ovulatory outcomes in prenatal, testosterone-treated sheep. *Biology of Reproduction*, 78(4), 636–647. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.065904>
-

-
- von Wolff, M., Ursel, S., Hahn, U., Steldinger, R., & Strowitzki, T. (2003). Glucose transporter proteins (GLUT) in human endometrium: expression, regulation, and function throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(8), 3885–3892. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021890>
- Wallace, K. L., Johnson, V., Sopelak, V., & Hines, R. (2011). Clomiphene citrate versus letrozole: molecular analysis of the endometrium in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 96(4), 1051–1056. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.07.1092>
- Wang, R., & Mol, B. W. J. (2017). The Rotterdam criteria for polycystic ovary syndrome: evidence-based criteria? *Human Reproduction*, 32(2), 261–264. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew287>
- Wilkins, J. F., & Fe, S. (2008). Epigenetic Variation in Humans. *ELS*. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-10-22>
- Wu, T. P., Wang, T., Seetin, M. G., Lai, Y., Zhu, S., Lin, K., ... Xiao, A. Z. (2016). DNA methylation on N(6)-adenine in mammalian embryonic stem cells. *Nature*, 532(7599), 329–333. <https://doi.org/10.1038/nature17640>
- Xu, B.-B., Gu, Z.-F., Ma, M., Wang, J.-Y., & Wang, H.-N. (2018). MicroRNA-590-5p suppresses the proliferation and invasion of non-small cell lung cancer by regulating GAB1. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 22(18), 5954–5963. https://doi.org/10.26355/eurrev_201809_15926
- Yan, L., Zhou, J., Gao, Y., Ghazal, S., Lu, L., Bellone, S., ... Huang, Y. (2015). Regulation of tumor cell migration and invasion by the H19/let-7 axis is antagonized by metformin-induced DNA methylation. *Oncogene*, 34(23), 3076–3084. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.236>
- Yang, Q., Liang, X., Sun, X., Zhang, L., Fu, X., Rogers, C. J., ... Du, M. (2016). AMPK/ α -Ketoglutarate Axis Dynamically Mediates DNA Demethylation in the Prdm16 Promoter and Brown Adipogenesis. *Cell Metabolism*, 24(4), 542–554.
-

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.08.010>

Yin, Y., Morgunova, E., Jolma, A., Kaasinen, E., Sahu, B., Khund-Sayeed, S., ... Taipale, J. (2017). Impact of cytosine methylation on DNA binding specificities of human transcription factors. *Science (New York, N.Y.)*, 356(6337), eaaj2239. <https://doi.org/10.1126/science.aaj2239>

Zhai, J., Liu, C., Tian, Z., Jiang, Q., & Sun, Y. (2012). Effects of Metformin on the Expression of GLUT4 in Endometrium of Obese Women with Polycystic Ovary Syndrome1. *Biology of Reproduction*, 87(2), 29. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.099788>

Zhang, J., & Liu, F. (2014). Tissue-specific insulin signaling in the regulation of metabolism and aging. *IUBMB Life*, 66(7), 485–495. <https://doi.org/10.1002/iub.1293>

Zhong, T., Men, Y., Lu, L., Geng, T., Zhou, J., Mitsuhashi, A., ... Huang, Y. (2017). Metformin alters DNA methylation genome-wide via the H19/SAHH axis. *Oncogene*, 36(17), 2345–2354. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.391>

Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., ... Moller, D. E. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *Journal of Clinical Investigation*, 108(8), 1167–1174. <https://doi.org/10.1172/JCI13505>

ANEXO A

Páginas WEB consultadas

10.1 Valores de referencia para perfil hormonal obtenido de:

<https://www.reproduccionasistida.org/valores-hormonales-en-la-mujer/>

10.2 Ciclo ovarico-endometrial, obtenido de: [https://es.dreamstime.com/fotos-de-archivo-](https://es.dreamstime.com/fotos-de-archivo-libres-de-regal%C3%ADas-ciclo-ov%C3%A1rico-y-uterino-image17019748)

[libres-de-regal%C3%ADas-ciclo-ov%C3%A1rico-y-uterino-image17019748](https://es.dreamstime.com/fotos-de-archivo-libres-de-regal%C3%ADas-ciclo-ov%C3%A1rico-y-uterino-image17019748)

10.3 Consultado de: <http://meetgenes.blogs.uv.es/madres-pluripotentes-luchar-diabetes/>

10.4 Consultado de la base cell signaling, consultado en:

<http://www.cellsignet.com/research.html>

ANEXO B

Diseño de oligos para evaluación de los genes de estudio.

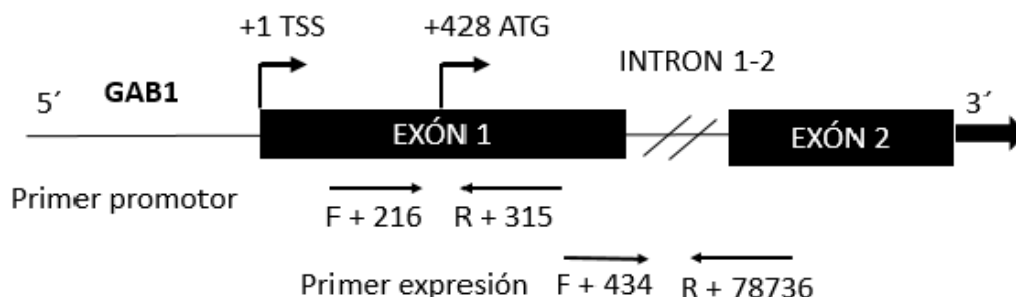


Figura 20. Diseño de oligos para GAB1. Se muestran las dos regiones de diseño para el ensayo MeDIP (promotor) y ensayo de expresión con sus respectivas posiciones de acuerdo al sitio de inicio de la transcripción (TSS), así como también se muestra el sitio correspondiente a la región de inicio de la traducción (ATG).

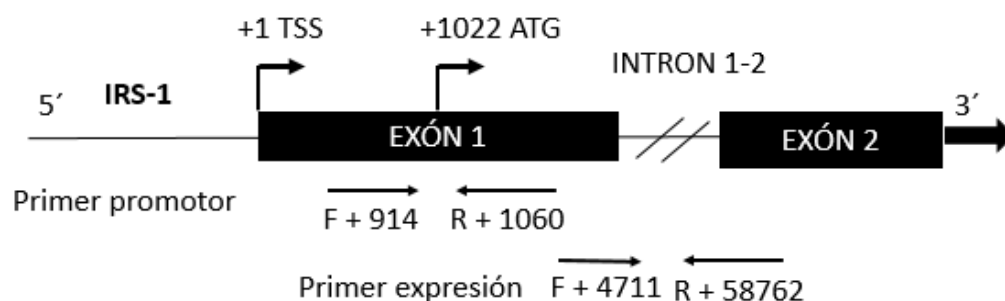


Figura 21. Diseño de oligos para IRS-1. Se muestran las dos regiones de diseño para el ensayo MeDIP (promotor) y ensayo de expresión con sus respectivas posiciones relativas de acuerdo al sitio de inicio de la transcripción (TSS), así como también se muestra el sitio de inicio de la traducción (ATG).

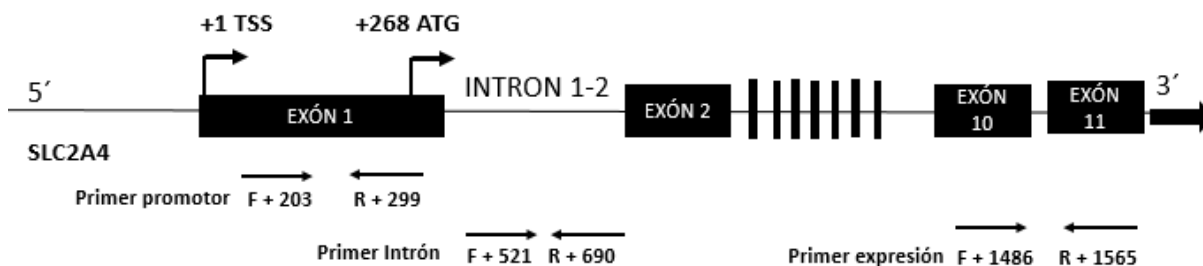


Figura 22. Diseño de oligos para SLC2A4. Se muestran las tres regiones de diseño para el ensayo MeDIP (promotor e Intrón), y ensayo de expresión con sus respectivas posiciones de acuerdo al sitio de inicio de la transcripción (TSS), así como también se muestra el sitio correspondiente a la región de traducción (ATG). Cabe mencionar que los esquemas anteriores están a escala representativa.

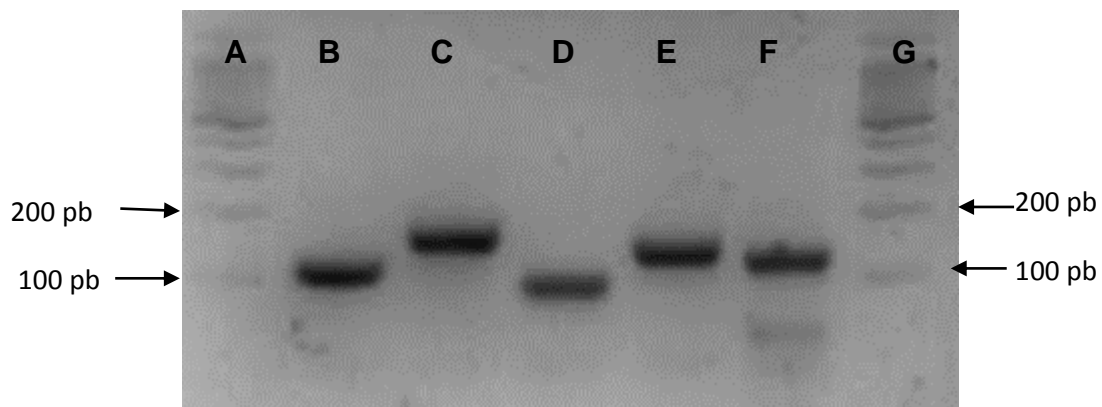


Figura 23. Pesos moleculares de los amplicones obtenidos mediante el ensayo MeDIP-PCR. Se muestra la electroforesis en gel de agarosa al 2%, en los cuales se aprecian los cuatro genes evaluados en metilación, en el carril B, corresponde al amplicón de la región promotora del gen GAB1 con peso molecular de 119pb. Carril C, corresponde al amplicón de la región del Intrón 1-2 del gen SLC2A4 cuyo peso molecular es de 169 pb. Carril D, corresponde al amplicón de la región promotora del gen SLC2A4 con peso molecular de 97 pb. Carril E, corresponde al amplicón de la región promotora del gen IRS-1 con peso molecular de 147 pb. Carril F corresponde al amplicón de la región promotora del gen control H19 con peso molecular de 134pb. Los pesos establecidos son respecto a un marcador de peso molecular de 100 pb (A y G)

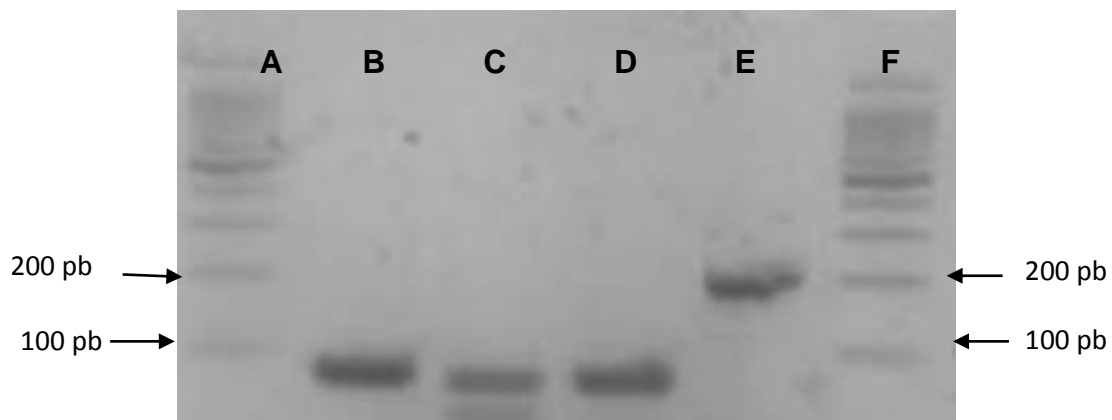


Figura 24. Pesos moleculares de los amplicones obtenidos mediante el ensayo RT-PCR. Se muestra la electroforesis en gel de agarosa al 2% en los cuales se aprecian los tres genes evaluados. Carril B, se muestra el amplicón correspondiente al gen GAB1 cuyo peso molecular es de 87 pb. Carril C, amplicón correspondiente al gen SLC2A4 cuyo peso molecular es de 79 pb. Carril D, amplicón correspondiente al gen IRS-1 cuyo peso molecular es de 84 pb. Carril E, amplicón correspondiente a control de prueba RNA 18s, cuyo peso molecular es de 197 pb, empleando como referencia un arcador de peso molecular de 100 pb (A y F)

Tabla 7. Características de los oligos diseñados.

Gen	Producto que codifica y/ o función	Oligos
ACTB (control endógeno de expresión)	Codifica para una proteína estructural encargadas de la motilidad celular.	Ensayo RT:
GAB1	Codifica para una proteína adaptadora multisustrato, posee una actividad importante para el crecimiento celular, apoptosis y metabolismo (respuesta a insulina).	Ensayo MeDIP: F: GCTCGCGTTCTGTTTCAGGTT R: AACCTAGCTCTCCTGGTCGC Tamaño del amplicón: 119 pb Ensayo RT: F: GGTGGTGAAGTGGTCTGCTC R: GAACCATCTCCTCTTCCATGCA Tamaño del amplicón: 87 pb
H19 (control metilación)	Codifica para un lncRNA, se ha descrito poseer una actividad importante para el desarrollo embrionario.	Ensayo MeDIP: F: GAGCCGCACCAGATCTTCAG R: TGATCACAGTGTGTTCCACCAA Tamaño de amplicón: 134 pb
IRS-1	Codifica para una proteína adaptadora encargada de permitir la activación de la señalización de la insulina.	Ensayo MeDIP: F: CCTCCAGCCCTGTTTGCATG R: CACGTCCGAGAAGCCATCG Tamaño del amplicón: 147 pb Ensayo RT: F: AGCATCAGTTTCCAGAAGCAG R: GCTGAGGTCATTTAGGTCTTCA Tamaño del amplicón: 84 pb
LINE-1	Elementos repetidos y silenciados del genoma cuya función radica en el silenciamiento del cromosoma X	Ensayo MeDIP: F: TTCCCTTTCCGAGTCAAAGA R: CAATATTCGGGTGGGAGAGA Tamaño del amplicón:
SLC2A4	Codifica para una proteína acarreadora de glucosa dependiente de insulina, desempeña un papel fundamental en prácticamente todas las estirpes celulares.	Ensayo MeDIP: Promotor F: TCAGAGACTCCAGGATCGGTT R: CGGAGCCTATCTGTTGGAAGC Tamaño del amplicón: 97 pb Intrón F: GCAAGTGGATTCTGCGAGCC R: GTCCTCGAAACTGCCCCGT Tamaño del amplicón: 169 pb Ensayo RT: F: CGAGCAACTTCATCATTGGCAT R: ACCGCAAATAGAAGGAAGACGT Tamaño del amplicón: 79 pb

ANEXO C

Consentimientos informados

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO (PACIENTES)

TEXTO INFORMATIVO

Nombre del proyecto de investigación: Efecto de la intervención metabólica con metformina sobre la programación epigenética del endometrio de mujeres con síndrome de ovario poliquístico.

Núm. Registro: 300020209-04-16

Investigador responsable: Dr. Edgar Ricardo Vázquez Martínez, Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología, Tel. 55209900 Ext. 513 ó 346, email: vamer@comunidad.unam.mx

Presidente del Comité de ética en Investigación: Dr. Alejandro Martínez Juárez, Tel. 55209900 Ext. 316

Propósito: Por medio de la presente se le invita a participar en este estudio que se realizará en el Instituto Nacional de Perinatología con mujeres que padecen de síndrome de ovario poliquístico y tienen dificultad para quedar embarazadas (infertilidad). El síndrome de ovario poliquístico es una enfermedad hormonal en la que existe una alteración en los niveles de las hormonas sexuales femeninas. Esta alteración está relacionada con cambios en el ciclo menstrual (irregularidades o ausencia del periodo menstrual), presencia de quistes en los ovarios, infertilidad y elevación de insulina en sangre. Esta enfermedad está asociada a un mayor riesgo de aborto espontáneo, hipertensión arterial, diabetes gestacional y esterilidad. Hasta la fecha, no se conoce con exactitud cuál es la causa del síndrome de ovario poliquístico y los mecanismos por los cuales produce infertilidad, sólo se sabe que las hormonas producidas por los ovarios (llamadas estrógenos y progesterona) y los andrógenos (hormonas masculinas que se encuentran en pequeñas cantidades en las mujeres) están involucradas y que existe un componente genético y ambiental para su desarrollo. La metformina junto con una dieta baja en carbohidratos se utiliza como tratamiento para mejorar las alteraciones metabólicas y hormonales en pacientes con síndrome de ovario poliquístico. Además, se ha observado que la metformina favorece la probabilidad de quedar embarazada y disminuye las complicaciones del embarazo en estas pacientes, sin embargo, se desconocen los mecanismos a través de los cuales la metformina favorece el embarazo.

El material genético está compuesto por ácidos nucleicos, los cuales se dividen en ácido desoxirribonucleico y ácido ribonucleico (ADN y ARN, respectivamente). En particular, el ADN puede tener modificaciones químicas que se pueden producir en respuesta a factores ambientales (como son contaminantes, alimentación, enfermedades, entre otros); dentro de éstas modificaciones del ADN, la modificación más estudiada es la metilación. Se ha demostrado que alteraciones en el contenido de ADN metilado y/o ARN pueden predecir el estado de enfermedades que tienen un componente genético y ambiental. Las células que forman el revestimiento del útero o matriz (llamado endometrio) contienen ADN y ARN y diversos estudios han demostrado que existen alteraciones en el contenido de ambas moléculas que están relacionadas con los problemas que tienen las mujeres para quedar embarazadas. En este trabajo se va a estudiar la diferencia que existe entre el contenido de los componentes de ADN metilado y ARN del endometrio de mujeres con síndrome de ovario poliquístico y el contenido de los mismos en mujeres que ya han logrado el embarazo. También se estudiará a pacientes con síndrome de ovario poliquístico que hayan recibido tratamiento con metformina y dieta para estudiar los cambios en el contenido de dichas moléculas que favorecen el embarazo. Esto nos permitirá investigar cuáles podrían ser las causas de la infertilidad en las pacientes con síndrome de ovario poliquístico y los efectos de la metformina para favorecer el embarazo, así como aportar información que en un futuro beneficie a las pacientes que sufren esta enfermedad.

Selección de participantes: A lo largo de este estudio se utilizarán las biopsias de aproximadamente 30 pacientes con síndrome de ovario poliquístico y que estén bajo tratamiento con metformina y dieta baja en carbohidratos. El motivo por el cual Usted fue seleccionada es debido a que tiene diagnóstico de síndrome de ovario poliquístico e infertilidad y a que es candidata a recibir dicho tratamiento. Otras alternativas al tratamiento que se ofrece generalmente a las pacientes con síndrome de ovario poliquístico en el Instituto son: dieta y ejercicio (para bajar de peso un 10 a 20% de su peso actual) y anticonceptivos por 3 a 6 meses. En el presente estudio sólo participarán mujeres con síndrome de ovario poliquístico bajo tratamiento con metformina y dieta baja en carbohidratos indicado por el médico tratante.

Procedimiento: Para realizar esta investigación, necesitamos su autorización para realizar una historia clínica completa, proporcionarle el tratamiento con metformina y dieta baja en carbohidratos y tomar un fragmento del recubrimiento del útero antes y después de haber cumplido el tratamiento. El tratamiento consistirá en la toma diaria de 1700 mg de metformina (2 tomas de 850 mg, por la mañana y la noche) junto con el seguimiento de una dieta con restricción de carbohidratos al 45% durante 6 meses. Normalmente, no se toman muestras del útero a pacientes con síndrome de ovario poliquístico, sin embargo, si usted acepta participar en esta investigación, el personal médico capacitado tomará un fragmento pequeño del recubrimiento del útero mediante una cánula de Pipelle sin aplicación de anestesia ni analgesia previa. El uso de la cánula de Pipelle es el método más común, mejor tolerado y el más aceptado para la toma de muestra del recubrimiento del útero (98% de las mujeres aceptan que se les tomó la muestra mediante este procedimiento), además de que se considera un método muy poco invasivo. De hecho, alrededor del 70% de las mujeres que han sido sometidas a este procedimiento están satisfechas con el mismo y lo recomendarían a otras mujeres. La toma de muestra se realizará en los consultorios médicos o en la sala de quirófano previo a realizar un procedimiento quirúrgico. Durante el procedimiento, Usted se recostará sobre una mesa y se colocarán sus piernas en las pierneras. Posteriormente, el médico colocará el espejo vaginal dentro de la vagina para abrirla ligeramente, esto permitirá observar el interior de la vagina y el cuello uterino. En caso de ser necesario se pinzará el cérvix o cuello uterino para la introducción de la cánula de Pipelle y proceder a la toma de muestra mediante un aspirado de las paredes del recubrimiento de su útero. En caso de que Usted presente ciclos menstruales regulares, la muestra se tomará durante la fase proliferativa del ciclo menstrual (posterior a la menstruación y previo a la ovulación). Si Usted

quedara embarazada después de la toma de muestra, por favor notifique a su médico ya que esta información es muy importante para este proyecto.

Riesgos: este procedimiento se considera de riesgo mayor al mínimo. Los riesgos consisten en lo siguiente (según lo referido en los trabajos en los que se ha llevado a cabo en este tipo de procedimiento): “cólico”, es decir un dolor agudo, brusco (también llamado espasmódico) e intermitente en el abdomen que generalmente es de intensidad leve y que se presenta al momento de la toma de muestra; también se puede presentar sangrado escaso o “manchado” posterior a la toma de muestra. Se ha reportado que el 92% de las pacientes a las que se les ha tomado la muestra mediante este procedimiento no presentan molestias, mientras que el 6% presenta dolor moderado y el 2% dolor severo. Las posibles complicaciones por la toma de muestra y sus frecuencias observadas son las siguientes: dolor que requiere de la toma de analgésicos (31.8%), laceración en el útero (5.9%) y fiebre (2.9%); no se han reportado casos de perforación del útero. En caso de presentar las molestias mencionadas se podrá considerar la ingesta de un analgésico (ketorolaco 10 mg vía oral, cada 6 horas), el cual no será proporcionado en caso de ingresar al protocolo. Existe muy poca probabilidad de que persistan las molestias, sin embargo, en caso de persistir las molestias deberá acudir al servicio de urgencias del INPer y notificar que es participante de este protocolo para que se le sea notificado a la doctora Vanessa Morales Hernández o a la doctora Norma Paulina Pérez Ramírez a la extensión 248 ó 239.

Confidencialidad: Los pacientes sólo serán identificados por una clave asignada durante la toma de muestra, por lo que sus datos y la información obtenida en este estudio serán mantenidos en estricta confidencialidad. Cualquier información relacionada con usted y derivada del estudio será archivada de manera electrónica en una base de datos y de forma escrita en una bitácora de laboratorio destinada a este protocolo, en la Unidad de Investigación en Reproducción Humana, 3º y 4º piso de la Torre de Investigación. Únicamente el autor principal y los coautores participantes en este estudio tendrán acceso esta información. Los resultados derivados del estudio podrán ser presentados en congresos científicos, informes y/o publicaciones nacionales y/o internaciones.

Participación voluntaria/retiro: El aceptar participar en el estudio no implicará la administración de medicinas ni exámenes diferentes a los que recibe actualmente. La decisión de participar implica que tendrá un conocimiento completo de los riesgos y beneficios, los cuales se detallan en esta carta. Cualquier duda adicional, podrá ser aclarada por los investigadores responsables. Si no desea participar en el estudio, su tratamiento y atención no cambiará en calidad y podrá retirarse en el momento que lo desee. Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.

Procedencia del Financiamiento: El proyecto será financiado por el Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social (FOSISS) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y el Instituto Nacional de Perinatología IER.

Efectos secundarios: Los efectos secundarios más comunes de la metformina son los siguientes: náuseas, vómitos, anorexia, pérdida de peso, alteraciones del gusto, disminución de la absorción intestinal (incluyendo la vitamina B12) y acidosis láctica. Si Usted presenta alguna alteración renal no debe tomar este medicamento.

Beneficios: usted no obtendrá ningún beneficio al participar en el estudio, únicamente existe una posibilidad de alrededor del 23% de conseguir el embarazo después del tratamiento con metformina y la dieta baja en carbohidratos y siguiendo las indicaciones de su médico. El presente protocolo sólo persigue fines académicos y de investigación.

Atención médica: Si usted decide participar o no en el estudio, no cambiará en nada la atención médica que recibirá en el instituto.

Costos financieros: Este estudio no tiene ningún costo para usted.

Compensación: Usted no recibirá ningún pago por participar en el estudio ni tampoco recibirá modificación en el pago de los servicios que reciba como parte de su atención médica.

Destino de las muestras: las muestras obtenidas consistirán en fragmentos de útero. A partir de dichas muestras, se obtendrán ADN y ARN para realizar los estudios mencionados. Estos productos de las muestras se conservarán en el laboratorio de Genómica/Unidad de Investigación en Reproducción Humana del INPER y estarán a cargo del Dr. Edgar Ricardo Vázquez Martínez. Debido al tipo de estudios que se realizarán no será posible recuperar ninguna parte de la muestra. Las muestras se conservarán durante la vigencia del presente estudio (un periodo máximo de 2 años a partir del momento de la toma). Una vez concluido este periodo, las muestras se van a desechar en los envases adecuados y no serán utilizadas para ninguna otra investigación.

TEXTO DECLARATORIO

Es de mi conocimiento que los investigadores me han ofrecido aclarar cualquier duda o contestar cualquier pregunta, que al momento de firmar el presente, no hubiese expresado o que surja durante el desarrollo de la investigación.

Se me ha informado la justificación y objetivos de la investigación, procedimientos que van a usarse y su propósito con un lenguaje entendible para mí, así como las responsabilidades que adquiero al participar, molestias y riesgos esperados, beneficios que pueden obtenerse, que si existieran gastos adicionales, derivados de este estudio de investigación, estos serán absueltos por el presupuesto de la misma, la seguridad de que no se me identificará y se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con mi privacidad de acuerdo a la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares, Capítulo I De los Principios de Protección de Datos Personales, Artículo 6, 7,8 y 9: Y aviso de privacidad institucional, libertad de retirar mi consentimiento en cualquier momento sin que por ello se creen prejuicios para continuar mi cuidado y tratamientos, que en caso de no aceptar participar en la investigación, no existirá ninguna penalidad, ni se verán afectados los derechos de atención médica presente o futura y la garantía de recibir respuesta a cualquier pregunta o duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados a la investigación.

Autorizo que los resultados derivados del estudio sean presentados en congresos científicos, informes y/o publicaciones nacionales y/o internaciones y mi nombre no será revelado, ya que solo será identificado por una clave asignada durante la toma de muestra.

Por lo anterior **[SI]** ó **[NO]** estoy de acuerdo en participar en la investigación arriba señalada firmando la declaración de Consentimiento Informado

Gracias por su Cooperación

Yo _____
Nombre y firma del participante

Para los fines que se estime conveniente, firmo la presente junto al investigador que me informó y dos testigos, conservando una copia de a) Consentimiento informado y b) Información proporcionada para obtener mi autorización.

Para dudas y aclaraciones sobre aspectos éticos de investigación deberá dirigirse con el Presidente del Comité de ética en investigación de este Instituto, con el Dr. Alejandro Martínez Juárez (Tel. 55209900 Ext. 316). Para dudas y aclaraciones sobre el proyecto de investigación deberá dirigirse con el investigador responsable, con el Dr. Edgar Ricardo Vázquez Martínez (Tel. 5520900, Ext. 513 ó 346)

Responsable o representante

Firma

Testigo

Nombre, dirección y relación

Firma

Testigo

Nombre, dirección y relación

Firma

Firma del Investigador
Responsable

Dr. Edgar Ricardo Vázquez Martínez

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO (CONTROLES)

TEXTO INFORMATIVO

Nombre del proyecto de investigación: Efecto de la intervención metabólica con metformina sobre la programación epigenética del endometrio de mujeres con síndrome de ovario poliquístico.

Núm. Registro: 300020209-04-16

Investigador responsable: Dr. Edgar Ricardo Vázquez Martínez, Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología, Tel. 55209900 Ext. 513 ó 346, email: vamer@comunidad.unam.mx

Presidente del Comité de ética en Investigación: Dr. Alejandro Martínez Juárez, Tel. 55209900 Ext. 316

Propósito: Por medio de la presente se le invita a participar en este estudio que se realizará en el Instituto Nacional de Perinatología con mujeres que padecen de síndrome de ovario poliquístico y tienen dificultad para quedar embarazadas (infertilidad). El síndrome de ovario poliquístico es una enfermedad hormonal en la que existe una alteración en los niveles de las hormonas sexuales femeninas. Esta alteración está relacionada con cambios en el ciclo menstrual (irregularidades o ausencia del periodo menstrual), presencia de quistes en los ovarios, infertilidad y elevación de insulina en sangre. Esta enfermedad está asociada a un mayor riesgo de aborto espontáneo, hipertensión arterial, diabetes gestacional y esterilidad. Hasta la fecha, no se conoce con exactitud cuál es la causa del síndrome de ovario poliquístico y los mecanismos por los cuales produce infertilidad, sólo se sabe que las hormonas producidas por los ovarios (llamadas estrógenos y progesterona) y los andrógenos (hormonas masculinas que se encuentran en pequeñas cantidades en las mujeres) están involucradas y que existe un componente genético y ambiental para su desarrollo. La metformina junto con una dieta baja en carbohidratos se utiliza como tratamiento para mejorar las alteraciones metabólicas y hormonales en pacientes con síndrome de ovario poliquístico. Además, se ha observado que la metformina favorece la probabilidad de quedar embarazada y disminuye las complicaciones del embarazo en estas pacientes, sin embargo, se desconocen los mecanismos a través de los cuales la metformina favorece el embarazo.

El material genético está compuesto por ácidos nucleicos, los cuales se dividen en ácido desoxirribonucleico y ácido ribonucleico (ADN y ARN, respectivamente). En particular, el ADN puede tener modificaciones químicas que se pueden producir en respuesta a factores ambientales (como son contaminantes, alimentación, enfermedades, entre otros); dentro de éstas modificaciones del ADN, la modificación más estudiada es la metilación. Se ha demostrado que alteraciones en el contenido de ADN metilado y/o ARN pueden predecir el estado de enfermedades que tienen un componente genético y ambiental. Las células que forman el revestimiento del útero o matriz (llamado endometrio) contienen ADN y ARN y diversos estudios han demostrado que existen alteraciones en el contenido de ambas moléculas que están relacionadas con los problemas que tienen las mujeres para quedar embarazadas. En este trabajo se va a estudiar la diferencia que existe entre el contenido de los componentes de ADN metilado y ARN del endometrio de mujeres con síndrome de ovario poliquístico y el contenido de los mismos en mujeres que ya han logrado el embarazo. También se estudiará a pacientes con síndrome de ovario poliquístico que hayan recibido tratamiento con metformina y dieta para estudiar los cambios en el contenido de dichas moléculas que favorecen el embarazo. Esto nos permitirá investigar cuáles podrían ser las causas de la infertilidad en las pacientes con síndrome de ovario poliquístico y los efectos de la metformina para favorecer el embarazo, así como aportar información que en un futuro beneficie a las pacientes que sufren esta enfermedad.

Selección de participantes: A lo largo de este estudio se utilizarán las biopsias de aproximadamente 30 mujeres sin historia de infertilidad (que al menos tengan un hijo vivo) ni diagnóstico de síndrome de ovario poliquístico. El motivo por el cual Usted fue seleccionada es debido a que cumple los criterios antes mencionados y a que se le practicará una de las siguientes cirugías por recomendaciones de su médico: histerectomía que consiste en la extracción completa del útero u obstrucción tubaria bilateral que consiste en cortar y ligar las trompas uterinas para impedir el paso del óvulo y de los espermatozoides para evitar el embarazo.

Procedimiento: para realizar esta investigación, necesitamos su autorización para realizar una historia clínica completa y tomar un fragmento del recubrimiento del útero previo a la histerectomía o durante la obstrucción tubaria bilateral. El fragmento será tomado durante la fase proliferativa (posterior a la menstruación y previo a la ovulación) de su ciclo menstrual. En el caso de que a Usted se le realice una histerectomía, el procedimiento mediante el cual se obtendrán las muestras es el mismo que se realizará como parte de dicha cirugía, bajo el efecto de anestesia. En caso de que a Usted se le realice una obstrucción tubaria bilateral, la muestra se obtendrá mientras Usted se encuentra bajo el efecto de anestesia. Normalmente, durante la obstrucción tubaria bilateral no se toman muestras del útero, sin embargo, si usted acepta participar en esta investigación, se tomará una muestra del recubrimiento del útero mediante una cánula de Pipelle para su estudio. En caso de que a Usted no se le realice cirugía y acepte participar en el estudio, el personal médico capacitado tomará un fragmento pequeño del recubrimiento del útero en los consultorios médicos mediante una cánula de Pipelle sin aplicación de anestesia ni analgesia previa. El uso de la cánula de Pipelle es el método más común, mejor tolerado y el más aceptado para la toma de muestra del recubrimiento del útero (98% de las mujeres aceptan que se les tomó la muestra mediante este procedimiento), además de que se considera un método muy poco invasivo. De hecho, alrededor del 70% de las mujeres que han sido sometidas a este procedimiento están satisfechas con el mismo y lo recomendarían a otras mujeres. Durante el procedimiento, Usted se recostará sobre una mesa y se colocarán sus piernas en las piñeras. Posteriormente, el médico colocará el espejo vaginal dentro de la vagina para abrirla ligeramente, esto permitirá observar el interior de la vagina y el cuello uterino. En caso de ser necesario se pinzará el cérvix o cuello uterino para la introducción de la cánula de Pipelle y proceder a la toma de muestra mediante un aspirado de las paredes del recubrimiento de su útero.

Riesgos: los riesgos asociados con los procedimientos de la investigación son los mismos que le indicaron para la cirugía, por lo que no hay riesgos adicionales a los que le indicó su médico. Este procedimiento no le generará dolor durante la toma debido a que se realizará mientras

usted continúa con el efecto de la anestesia utilizada para la cirugía, una vez que pase el efecto de la anestesia, podría presentar molestias leves por la toma de la muestra del útero. En caso de que a Usted no se le realice cirugía y acepte la toma de muestra en los consultorios médicos, los riesgos consisten en lo siguiente (según lo referido en los trabajos en los que se ha llevado a cabo en este tipo de procedimiento): "cólico", es decir un dolor agudo, brusco (también llamado espasmódico) e intermitente en el abdomen que generalmente es de intensidad leve y que se presenta al momento de la toma de muestra; también se puede presentar sangrado escaso o "manchado" posterior a la toma de muestra. Se ha reportado que el 92% de las pacientes a las que se les ha tomado la muestra mediante este procedimiento no presentan molestias, mientras que el 6% presenta dolor moderado y el 2% dolor severo. Las posibles complicaciones por la toma de muestra y sus frecuencias observadas son las siguientes: dolor que requiere de la toma de analgésicos (31.8%), laceración en el útero (5.9%) y fiebre (2.9%); no se han reportado casos de perforación del útero. En caso de presentar las molestias mencionadas se podrá considerar la ingesta de un analgésico (ketorolaco 10 mg vía oral, cada 6 horas), el cual no será proporcionado en caso de ingresar al protocolo. Existe muy poca probabilidad de que persistan las molestias, sin embargo, en caso de persistir las molestias deberá acudir al servicio de urgencias del INPer y notificar que es participante de este protocolo para que se le sea notificado a la doctora Vanessa Morales Hernández o a la doctora Norma Paulina Pérez Ramírez a la extensión 248 ó 239.

Confidencialidad: Los pacientes sólo serán identificados por una clave asignada durante la toma de muestra, por lo que sus datos y la información obtenida en este estudio serán mantenidos en estricta confidencialidad. Cualquier información relacionada con usted y derivada del estudio será archivada de manera electrónica en una base de datos y de forma escrita en una bitácora de laboratorio destinada a este protocolo, en la Unidad de Investigación en Reproducción Humana, 3º y 4º piso de la Torre de Investigación. Únicamente el autor principal y los coautores participantes en este estudio tendrán acceso esta información. Los resultados derivados del estudio podrán ser presentados en congresos científicos, informes y/o publicaciones nacionales y/o internaciones.

Participación voluntaria/retiro: El aceptar participar en el estudio no implicará la administración de medicinas ni exámenes diferentes a los que recibe actualmente. La decisión de participar implica que tendrá un conocimiento completo de los riesgos y beneficios, los cuales se detallan en esta carta. Cualquier duda adicional, podrá ser aclarada por los investigadores responsables. Si no desea participar en el estudio, su tratamiento y atención no cambiará en calidad y podrá retirarse en el momento que lo desee. Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.

Procedencia del Financiamiento: El proyecto será financiado por el Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social (FOSISS) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y el Instituto Nacional de Perinatología IER.

Efectos secundarios: Ninguno.

Beneficios: usted no obtendrá ningún beneficio al participar en el estudio. El presente protocolo sólo persigue fines académicos y de investigación.

Atención médica: Si usted decide participar o no en el estudio, no cambiará en nada la atención médica que recibirá en el instituto.

Costos financieros: deberá cubrir los costos de la cirugía de acuerdo a las indicaciones de su médico.

Compensación: Usted no recibirá ningún pago por participar en el estudio ni tampoco recibirá modificación en el pago de los servicios que reciba como parte de su atención médica.

Destino de las muestras: las muestras obtenidas consistirán en fragmentos de útero. A partir de dichas muestras, se obtendrán ADN y ARN para realizar los estudios mencionados. Estos productos de las muestras se conservarán en el laboratorio de Genómica/Unidad de Investigación en Reproducción Humana del INPER y estarán a cargo del Dr. Edgar Ricardo Vázquez Martínez. Debido al tipo de estudios que se realizarán no será posible recuperar ninguna parte de la muestra. Las muestras se conservarán durante la vigencia del presente estudio (un periodo máximo de 2 años a partir del momento de la toma). Una vez concluido este periodo, las muestras se van a desechar en los envases adecuados y no serán utilizadas para ninguna otra investigación.

TEXTO DECLARATORIO

Es de mi conocimiento que los investigadores me han ofrecido aclarar cualquier duda o contestar cualquier pregunta, que al momento de firmar el presente, no hubiese expresado o que surja durante el desarrollo de la investigación.

Se me ha informado la justificación y objetivos de la investigación, procedimientos que van a usarse y su propósito con un lenguaje entendible para mí, así como las responsabilidades que adquiero al participar, molestias y riesgos esperados, beneficios que pueden obtenerse, que si existieran gastos adicionales, derivados de este estudio de investigación, estos serán absueltos por el presupuesto de la misma, la seguridad de que no se me identificará y se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con mi privacidad de acuerdo a la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de los Particulares, Capítulo I De los Principios de Protección de Datos Personales, Artículo 6, 7,8 y 9: Y aviso de privacidad institucional, libertad de retirar mi consentimiento en cualquier momento sin que por ello se creen prejuicios para continuar mi cuidado y tratamientos, que en caso de no aceptar participar en la investigación, no existirá ninguna penalidad, ni se verán afectados los derechos de atención médica presente o futura y la garantía de recibir respuesta a cualquier pregunta o duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados a la investigación.

Autorizo que los resultados derivados del estudio sean presentados en congresos científicos, informes y/o publicaciones nacionales y/o internaciones y mi nombre no será revelado, ya que solo será identificado por una clave asignada durante la toma de muestra.

Por lo anterior [SI] ó [NO] estoy de acuerdo en participar en la investigación arriba señalada firmando la declaración de Consentimiento Informado

Gracias por su Cooperación

Yo _____
Nombre y firma del participante

Para los fines que se estime conveniente, firmo la presente junto al investigador que me informó y dos testigos, conservando una copia de a) Consentimiento informado y b) Información proporcionada para obtener mi autorización.

Para dudas y aclaraciones sobre aspectos éticos de investigación deberá dirigirse con el Presidente del Comité de ética en investigación de este Instituto, con el Dr. Alejandro Martínez Juárez (Tel. 55209900 Ext. 316). Para dudas y aclaraciones sobre el proyecto de investigación deberá dirigirse con el investigador responsable, con el Dr. Edgar Ricardo Vázquez Martínez (Tel. 5520900, Ext. 513 ó 346)

Responsable o representante

Firma

Testigo

Nombre, dirección y relación

Firma

Testigo

Nombre, dirección y relación

Firma

Firma del Investigador
Responsable

Dr. Edgar Ricardo Vázquez Martínez