

PREMIO PROF. DR. ABRAHAM GUITELMAN –ACCESIT

“MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA ACCIÓN DE LA BIGUANIDA METFORMINA COMO TRATAMIENTO DEL SÍNDROME DEL OVARIO POLIQUÍSTICO”

*Evelin Mariel Elia*<sup>1,4</sup>, *Maria Emilia Solano*<sup>1,4</sup>, *Valeria Sander*<sup>1,4</sup>, *Carolina Luchetti*<sup>1,4</sup>,  
*Guillermo Di Girolamo*<sup>2,5</sup>, *Claudio Gonzalez*<sup>2,5</sup>, *Alicia Beatriz Motta*<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> *Licenciada en Biología, FCEN, UBA-* <sup>2</sup> *Médico, UBA-* <sup>3</sup> *Doctora en Química, FCEN, UBA-* <sup>4</sup> *Laboratorio de Fisiopatología Ovárica-CEFYBO-CONICET* <sup>5</sup> *Departamento de Farmacología- Facultad de Medicina*

**Palabras claves:** dehidroepiandrosterona / Síndrome del Ovario Poliquístico / quinasa activada por AMP / ciclooxigenasa / óxido nítrico

**Resumen**

El objetivo del presente estudio fue investigar los mecanismos moleculares mediante los cuales la N, N' dimetilbiguanida: Metformina (administrada en la dosis: 50 mg/100 g de peso disuelta 0.05 ml de agua vía oral mediante cánula) previene desórdenes ováricos provocados por la hiperandrogenización con dehidroepiandrosterona (DHEA) inyectada en ratones prepúberes de la cepa BALB/c. La administración de DHEA (sc, 6 mg/100 g de peso disuelta en 0.1 ml aceite de maíz) durante 20 días consecutivos recrea un modelo murino del Síndrome del Ovario Poliquístico (PCOS). Tanto trabajos previos de nuestro grupo de trabajo como aquéllos provenientes de la literatura indican que este modelo reproduce fehacientemente los aspectos principales de la patología quística humana. El tratamiento con DHEA durante 20 días consecutivos, aumentó el estrés oxidativo del ovario ya que incrementó la peroxidación lipídica (LPO) y disminuyó la actividad de catalasa (CAT) y los niveles de glutatión total (GSH) del ovario respecto de los controles. Asimismo, el tratamiento con DHEA disminuyó la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) y la producción de prostaglandina E (PGE). Cuando los animales se inyectaron con DHEA y conjuntamente se trataron en forma oral con metformina durante 20 días consecutivos, el contenido de GSH ovárico, la actividad de la NOS y la producción de PGE presentaron niveles iguales al grupo control. Sin embargo, la metformina no fue

capaz de normalizar la LPO o la actividad de CAT. En el estudio de los mecanismos moleculares involucrados vimos que la DHEA aumentó la expresión de las proteínas ováricas: que representan a la NOS inducible (iNOS), la ciclooxigenasa inducible (COX2) y de la forma fosforilada de la quinasa alfa dependiente de AMP (AMPK- $\alpha$ ) (Thr172). La Metformina (administrada en forma conjunta con la DHEA) revirtió los aumentos en la expresión de las proteínas iNOS y COX2 y se observó una sobreexpresión de la forma fosforilada de la quinasa alfa dependiente de AMP (AMPK- $\alpha$ ) (Thr172).

**Introducción**

El Síndrome del Ovario Poliquístico (PCOS) es una patología heterogénea caracterizada por hiperandrogenismo, hirsutismo, oligo o amenorrea y anovulación. Justamente, esta heterogeneidad conduce a la necesidad de establecer consenso para su diagnóstico. En la última reunión de Róterdam (2003) se estableció como diagnóstico de PCOS aquellas mujeres que presenten dos de los siguientes parámetros alterados: i) oligo- o anovulación, ii) hiperandrogenismo clínico o bioquímico o iii) ovarios poliquísticos<sup>1</sup>.

La presencia de PCOS se encuentra frecuentemente asociada con hiperinsulinemia, síndrome de insulina resistencia, riesgo cardiovascular incrementado y diabetes mellitus<sup>2-4</sup>.

Dado que ha sido difícil evaluar la etiología y desarrollo de PCOS en pacientes, los modelos animales han resultado ser una herramienta muy atractiva a la hora de estudiar la patología quística. Mahesh y Greenblatt<sup>5</sup> fueron los primeros en aislar dehidroepiandrosterona (DHEA) de ovarios de mujeres con PCOS. Más tarde Roy y colaboradores<sup>6</sup>

desarrollaron un modelo de PCOS inducido por inyección de DHEA. A partir de estos incipientes ensayos, numerosos grupos de trabajo han inducido ovarios poliquísticos mediante inyección diaria de dehidroepiandrosterona (DHEA) en roedores<sup>7-10</sup>. Este modelo experimental presenta un interesante paralelismo con las características salientes de la patología humana tales como hiperandrogenismo, alterada maduración folicular y anovulación<sup>7-8,11-12</sup>.

Las *especies reactivas del oxígeno* (ROS), son productos tóxicos derivados del oxígeno y son generados en todas las células aeróbicas. Están representados por el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ )<sup>13</sup>. Se define como *estrés oxidativo* al daño causado por acumulación de ROS en sistemas biológicos. Una de las consecuencias de la generación excesiva de ROS dentro del tejido ovárico es la pérdida de la funcionalidad ovárica<sup>14-16</sup>. Más aún, se ha establecido que el incremento del estado oxidativo en mujeres con PCOS sería el responsable del riesgo cardiovascular aumentado descrito en dicha patología<sup>4, 17,18</sup>. El óxido nítrico (NO) ha emergido como un mensajero intracelular que controla funciones fisiológicas y por lo tanto es esencial para el mantenimiento de la homeostasis<sup>19</sup>. Sin embargo, más tarde se vió que el NO también modulaba la funcionalidad ovárica<sup>15,20-21</sup>. Al igual que las ROS, la producción de especies reactivas del nitrógeno (RNOS) produce daño tisular, sin embargo las RNOS son agentes oxidantes mucho más potentes que las ROS<sup>22</sup>. La protección del estrés oxidativo en las células proviene de enzimas -catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) ó glutatión peroxidasa (GPx)- puede provenir de metabolitos (como el glutatión, GSH) y de vitaminas<sup>23</sup>. Es importante destacar que el balance oxidante-antioxidante de la célula está regulado en forma endocrina<sup>15,24</sup>.

Múltiples terapias han sido utilizadas en el tratamiento de PCOS (citrate de clomifeno, glitazonas, análogos de GnRH, etc). Las biguanidas, drogas primariamente usadas como anti-hiperglucemiantes en el tratamiento de diabetes, fueron luego utilizadas en el tratamiento de PCOS. En este sentido se ha visto que la Metformina es capaz de reducir el síndrome de insulino resistencia y los andrógenos circulantes y así restaurar la ovulación<sup>18,25-27</sup>. Sin embargo, se desconocen la totalidad de los mecanismos que utiliza la metformina en estas acciones. El conocimiento de los mismos permitiría hacer más efectivos los tratamientos en los que se utiliza combinación de distintas drogas, los cuales se han descrito ser más efectivos que cada una por separado.

En estudios previos de nuestro grupo de trabajo vimos que la hiperandrogenización de ratones prepúberes de la cepa BALB/c con DHEA induce la formación de quistes ováricos y la alteración de parámetros endocrinos como 17 beta estradiol sérico (E), progesterona sérica (P) y factor de necrosis tumoral alpha (TNF  $\alpha$ ) así como también la concentración de prostaglandina E (PGE) ovárica. Por otra parte, la hiperandrogenización produjo la modificación fenotípica de los linfocitos T que infiltran al ovario (incrementándose la expresión de T CD8+ (linfocitos T citotóxicos) y disminuyendo la expresión de los T CD4+). Asimismo se indujo un desbalance en el equilibrio oxidante-antioxidante ya que se incrementó el índice LPO y disminuyó la concentración ovárica de GSH<sup>9</sup>.

A continuación del citado trabajo hemos estudiado algunos de los aspectos de la acción de la metformina como tratamiento de los desórdenes endocrinos e inmunes provocados por la inyección con DHEA a ratones BALB/c, utilizando el mismo modelo murino de PCOS. En ese contexto demostramos que la metformina administrada conjuntamente con DHEA por 20 días a ratones prepúberes BALB/c previno los desórdenes endocrinos evidenciado en el grupo de ratones que sólo era inyectado con DHEA (concretamente sobre insulina sérica, E, P y PGE), y sobre las alteraciones inmunes (expresión fenotípica de linfocitos T que infiltran al ovario y TNF  $\alpha$ )<sup>10</sup>.

De acuerdo a nuestros antecedentes previos como de los bibliográficos, el objetivo del presente trabajo fue continuar con nuestras investigaciones sobre la acción de metformina como tratamiento de la hiperandrogenización con DHEA de ratones, enfocando los estudios en el rol de la biguanida sobre el estrés oxidativo ovárico. Dado que: i) el NO es un potente generador de especies oxidantes, y que se ha visto que metformina y NO son capaces de interactuar en otros sistemas<sup>28</sup> junto con ii) el papel del NO en la funcionalidad ovárica expuesto en párrafos anteriores, en el presente estudio hemos investigado la acción de metformina sobre la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS, enzima generadora de NO a partir de L-arginina). Por otra parte hemos evaluado la expresión de la proteína NOS inducible ovárica, de manera de poder discernir si el posible efecto de la metformina era sólo sobre la actividad de la enzima o si también está afectada la expresión de la enzima.

En vista que la dislipidemia es una alteración frecuentemente asociada a PCOS<sup>2-4</sup>, junto con el hecho que la PGE se encuentra modificada en mujeres con PCOS<sup>29</sup> y nuestros resultados

previos<sup>9</sup>, otro de los objetivos del presente trabajo fue cuantificar la eficacia de la metformina en la modulación de la síntesis de PGE ovárica. Con el objeto de cuantificar el mecanismo involucrado investigamos la expresión de la proteína inducible ciclooxigenasa COX (COX2), enzima limitante de la cascada de la síntesis de prostaglandinas.

En otros sistemas ha sido descrito que la metformina activa la quinasa dependiente de AMP alfa (AMPK-  $\alpha$ ). Mediante este mecanismo, la metformina disminuye la glucosa, aumenta la oxidación de ácidos grasos y promueve la captación de glucosa por los tejidos<sup>28,30-31</sup>. Más aún, la metformina activa la cascada de AMPK durante procesos de estrés donde el ATP está disminuido<sup>32-33</sup>. Recientemente, se ha demostrado que para activar la AMPK, la metformina utiliza como intermediarios obligatorios a las RNOS<sup>28</sup> y en ese contexto se ha descrito una relación directa entre AMPK-NO-metformina en células endoteliales de aortas bovinas<sup>34</sup>. Estas evidencias nos llevaron a estudiar si la cascada de AMPK estaba involucrada en la acción de metformina como tratamiento de PCOS inducida en ratones por inyección con DHEA.

## Materiales y métodos

### Modelo experimental

**Grupo DHEA:** Se utilizó el modelo murino de PCOS mediante la inyección sc diaria de DHEA (6 mg/100 g peso (BW), disuelta en 0.10 ml aceite de maíz) a ratones prepúberes (25 días de edad, de la cepa BALB/c) durante 20 días tal como fue utilizado en trabajos previos de nuestro laboratorio<sup>9</sup>.

**Grupo DHEA+Metformina:** además de DHEA, los animales recibieron en forma oral vía cánula metformina (50 mg/100 g BW en 0.05 ml de agua) ambos tratamientos durante 20 días. La dosis de metformina administrada fue equivalente a la utilizada en el tratamiento de mujeres con PCOS. Cabe aclarar que dado que la inducción de PCOS en ratones se produce sólo si la DHEA es administrada en forma continua, la única manera de estudiar los efectos de la metformina en un modelo murino es mediante la utilización de un grupo DHEA+metformina.

**Grupo control:** estaba formado por animales que recibían los vehículos vía sc y vía oral.

**Grupo Metformina:** los animales recibieron solo metformina vía oral.

Se utilizaron 30 animales por grupo, los mismos fueron mantenidos en condiciones de temperatura (22 °C) y de iluminación (14 h luz-10 h oscuri-

dad; luz a las 05:00 h) controladas. Los ratones tuvieron libre acceso a Purina y agua. Todos los procedimientos llevados a cabo fueron acordes con aquéllos descritos en la Guía del Cuidado Animal y Uso del CONICET, 1996. Luego de 20 días de tratamiento los animales se anestesiaron con éter y se sacrificaron por decapitación. Los ovarios fueron separados y divididos:

Quince fueron utilizados para determinar LPO, quince para CAT, quince para GSH, diez para actividad de la NOS y cinco para PGE. Para las técnicas de estrés oxidativo los ovarios fueron inmediatamente procesados; para las técnicas restantes se congelaron a -70 °C hasta su utilización.

Para el estudio de los mecanismos intracelulares (expresión proteica de COX2, iNOS y AMPK alfa, determinados por Western Blotting) se utilizaron cinco animales por grupo tratados tal como fue descrito arriba. Los tejidos obtenidos fueron inmediatamente procesados en buffer para Western Blotting y guardados a -20°C hasta su utilización. Todos los experimentos fueron repetidos 3 veces.

### Parámetros del estrés oxidativo

**Peroxidación Lipídica (LPO):** La cuantificación de malondialdeído (MDA) formado como producto de la ruptura de ácidos poliinsaturados se toma como índice de peroxidación lipídica. La técnica, previamente utilizada en nuestro laboratorio<sup>16</sup>, se basa en cuantificar el MDA formado ya que éste forma un reactivo de color cuando reacciona con una mezcla de tricloroacético-HCl (15% (w/v); 0.375% (w/v) y 0.25 M respectivamente). Por espectrometría se determina a 535 nm la concentración de MDA presente en la muestra que se compara con una curva de calibración con concentraciones conocidas de MDA. Los resultados se expresan como MDA formado / g tejido ovárico.

**Actividad de catalasa (CAT):** La enzima CAT cataliza la conversión de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a agua y oxígeno. La técnica se basa en que el peróxido de hidrógeno es capaz de absorber a 240 nm<sup>35</sup>, entonces se agrega a la muestra peróxido de hidrógeno y se analizan las absorciones durante 1 min y en intervalos de cada 10 seg. A medida que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se consume por actividad CAT, se registra disminución de las absorciones que se comparan luego con curva patrón de concentración conocida. Los resultados se expresan como actividad CAT/mg proteína.

**Contenido de glutatión (GSH):** la técnica<sup>15</sup> se basa en convertir el glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) por agregado

a las muestras de la enzima glutation reductasa. En presencia de NADPH, que será el agente reductor, el reactivo de Ellman (5,5-dithiobis-2 nitrobenzoic acid; Sigma and Co, USA) agregado al medio de incubación forma con el GSH un producto que es capaz de absorber a 412 nm. Se registran por espectrofotometría las absorciones durante 6 min (tiempo en que la reacción de formación del cromóforo es lineal) con intervalos de 30 seg. Se grafican las absorbancias en función del tiempo. Al comparar esta pendiente con la pendiente de una muestra patrón se obtiene la concentración de GSH de la muestra. Los resultados se expresaron como mmol GSH/mg proteína.

#### *Actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS)*

El método se basa en que la enzima NOS cataliza la producción equimolar de NO + L-citrulina, a partir de L-arginina<sup>15</sup>. Entonces se agrega L-[<sup>14</sup>C] arginina a las muestras y se cuantifica la producción de L-[<sup>14</sup>C] citrulina, lo que nos dará idea de la actividad de la NOS y de la producción de NO dado que la reacción es equimolar. Luego de la separación de L-citrulina utilizando una columna de cromatografía que posee una resina de intercambio iónico DOWEX AG50W-X8 (Na<sup>+</sup> form; Biorad, USA), se determina la reactividad utilizando un contador de centelleo de radioactividad beta. Los resultados se expresan como pmol /g. min.

#### *Radioinmunoensayo de prostaglandina E*

La cuantificación se realiza mediante la utilización de la técnica de radioinmunoensayo de PGE<sup>9</sup>. Se utiliza un anticuerpo específico para PGE (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) con una sensibilidad de 10 pg /tubo y una reactividad cruzada < 0.1 % con las otras PGs. La radioactividad se determinó con mediante contador de centelleo líquido beta. Los resultados se expresan como pg PGE/mg protein.

#### *Western Blotting*

Para la cuantificación de la expresión de las proteínas COX2, iNOS y AMPK se utilizó la técnica de Western Blotting. Las muestras se homogeneizan en presencia de inhibidores de proteasas y se siembran en geles de poliacrilamida, juntamente con marcadores de peso molecular que permitirán identificar las proteínas. Los Western Blots se cuantificaron por densitometría (Modelo GS-700, Imaging Densitometer, Bio-Rad). Los porcentajes de los geles utilizados para la separación de las proteínas fueron: 10% para COX2 y iNOS y 15% para AMPK) y se identificaron por

densitometría las bandas correspondientes a los pesos moleculares de: COX2 (72 kDa), iNOS (135 kDa) y AMPK (62 kDa).

#### *Concentración de proteínas*

Las proteínas se determinaron por el método de Bradford<sup>36</sup>.

#### *Análisis estadístico*

Se utilizó el Instat program (GraphPAD software, San Diego, CA, USA). El análisis de la varianza se realizó usando el test de Newman-Keuls que compara todos los grupos entre sí (ANOVA), se considera como significativo si P < 0.05. Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar.

## **Resultados**

#### ***Efecto de metformina en estrés oxidativo ovárico inducido por hiperandrogenización***

La hiperandrogenización con DHEA aumentó la LPO (Figura 1a) y disminuyó tanto CAT (Figura 1b) como contenido ovárico de GSH (Figura 1c). La metformina (que fue administrada conjuntamente con DHEA), no fue capaz de revertir el efecto que DHEA presentaba sobre LPO (Figura 1a) y CAT (Figura 1b). Sin embargo metformina administrada conjuntamente con DHEA, fue capaz de impedir la disminución de GSH (Figura 1c) que se veía en el grupo que era inyectado solo con DHEA.

#### ***Acción de la metformina en la actividad de la NOS***

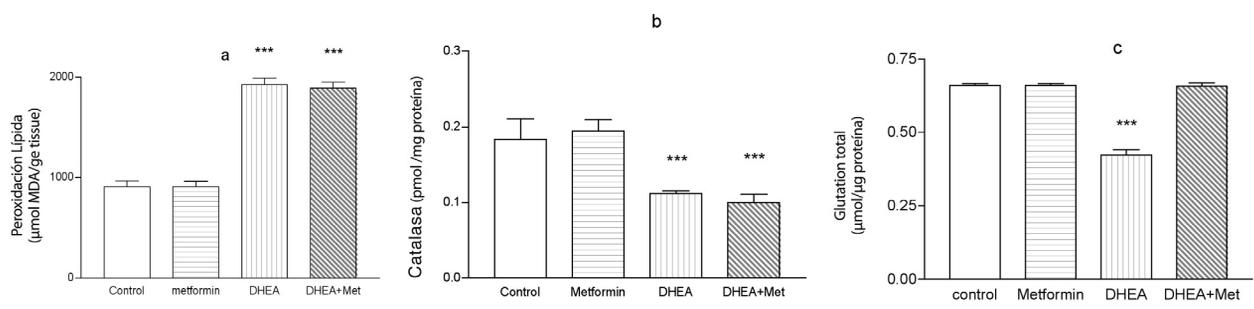
La hiperandrogenización con DHEA disminuyó la actividad de NOS ovárica (Figura 2). Cuando la metformina fue administrada con DHEA, la actividad de la NOS fue similar al grupo control (Figura 2).

#### ***Efecto de metformina en la producción de PGE ovárica***

Mientras que DHEA disminuyó los niveles de PGE ovárica, la metformina -administrada en forma conjunta con DHEA- fue capaz de revertir esta disminución (Figura 3).

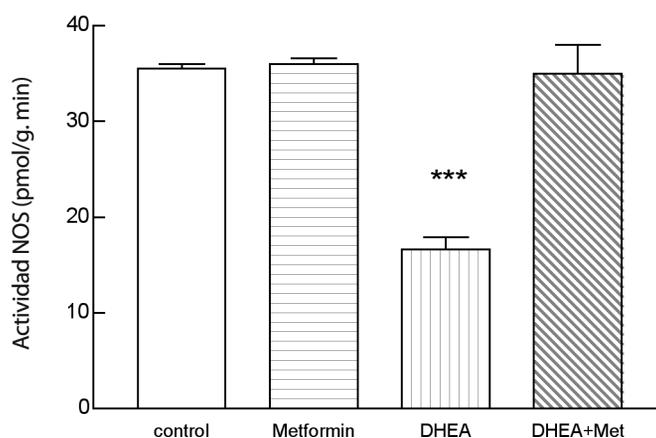
#### ***Rol de metformina en la modulación de la expresión de iNOS ovárica***

El Western Blotting para iNOS demostró que la DHEA incrementó la expresión de la proteína iNOS (Figura 4). Este efecto se vio parcialmente revertido en el grupo DHEA+Metformina (Figura 4).



(\*\*\* P < 0.001)

Figura 1. Efecto de la metformina en estrés oxidativo ovárico inducido por hiperandrogenización. (a) Índice de peroxidación lipídica, (b) Actividad de catalasa y (c) Concentración de glutatión total



(\*\*\* P < 0.001)

Figura 2. Acción de la metformina en la actividad de la óxido nítrico sintasa ovárica en un modelo de poliquistosis ovárica murino.

### **Rol de metformina en la regulación de la expresión de COX2 ovárica**

Como puede verse en la Figura 5, la DHEA indujo un aumento en la expresión de COX2. Cuando la metformina se administró en forma conjunta con DHEA, la expresión de la proteína COX2 fue similar a la del grupo control (Figura 5).

### **Activación de AMPK ovárica por metformina**

Con el objeto de evaluar si, como en otros sistemas, la metformina actúa en el ovario vía la activación del camino de la AMPK, estudiamos la expresión de AMPK- $\alpha$  (fosforilada en Thr172). Encontramos que la DHEA incrementó la expresión de la proteína AMPK activada (Figura 6). Cuando la metformina fue administrada junto con la DHEA, la activación (por fosforilación en Thr172) de AMPK fue significativamente mayor que aquella observada en el grupo DHEA (Figura

6: b vs c).

### **Discusión**

La Metformina es una droga reconocida por su acción antidiabética dada su capacidad de incremento de la utilización de glucosa por los tejidos. Considerando que al respecto, PCOS y diabetes comparten algunos patterns de alteración - como relación glucosa: insulina, metabolismo lipídico alterado, síndrome de insulina resistencia- no resulta ilógico imaginar que dicha droga comenzara a ser utilizada para el tratamiento de infertilidad de mujeres con PCOS<sup>25,37-38</sup>. Sin embargo, pocos estudios se han referido al mecanismo acción de esta biguanida.

Es por ello que el presente estudio fue dirigido a investigar algunos aspectos de los mecanismos de acción de la metformina. Hemos presentado datos que muestran que la DHEA aumentó el estrés oxidativo ovárico y disminuyó las defensas antioxidantes (contenido de GSH ovárico y activi-

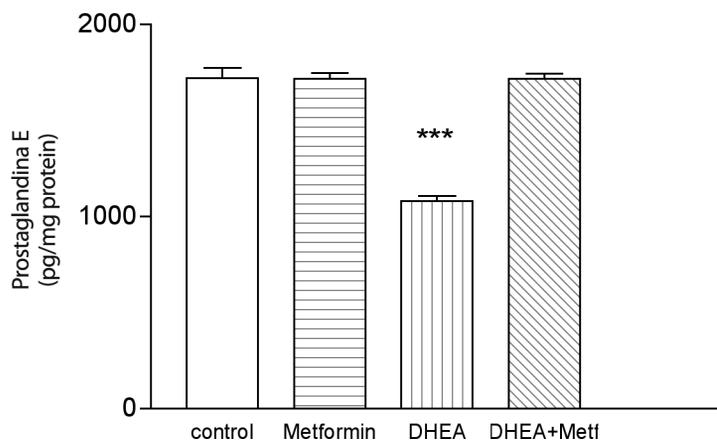
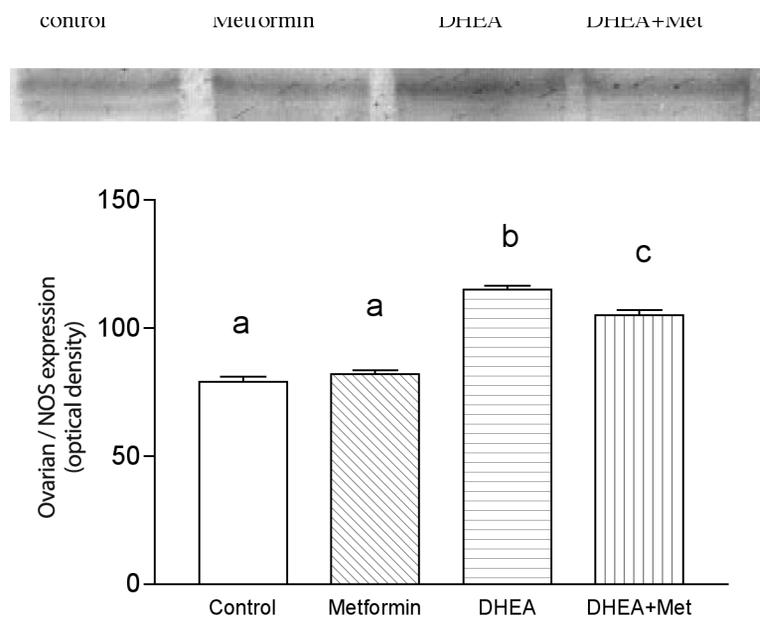
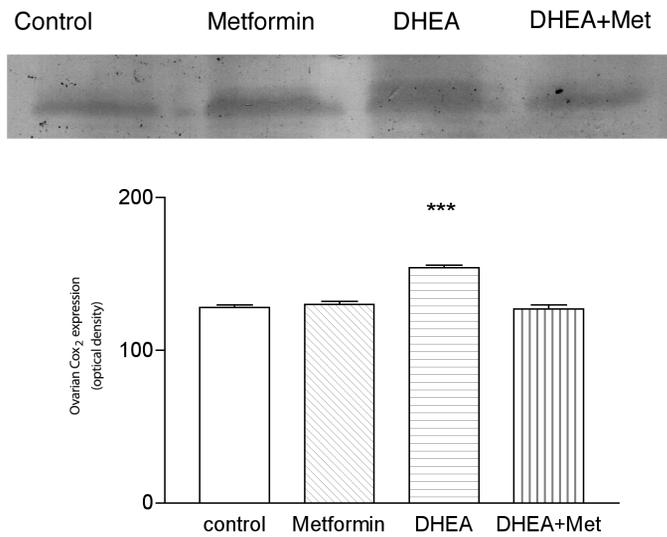


Figura 3. Efecto de la metformina en la producción de PGE ovárica en un modelo de poliquistosis ovárica murino



(a vs b  $P < 0.001$ , b vs c  $P < 0.05$ )

Figura 4. Rol de la metformina en la modulación de la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible ovárica en un modelo de poliquistosis ovárica murino



(\*\*\* P < 0.001)

Figura 5. Rol de la metformina en la modulación de la expresión de la ciclooxygenasa inducible ovárica en un modelo de poliquistosis ovárica murino

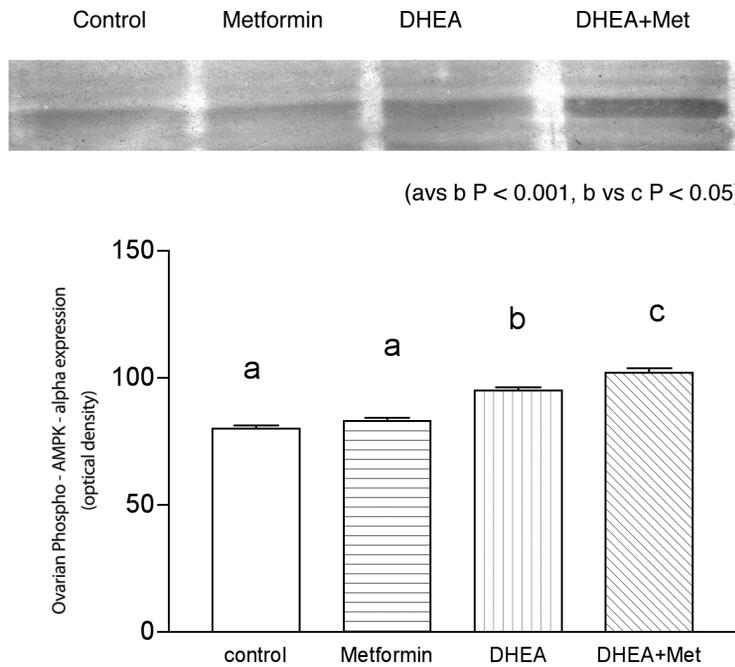


Figura 6. Activación por metformina de la expresión de la fosforilación de la quinasa ovárica dependiente de AMPc en un modelo de poliquistosis ovárica murino

dad de la CAT). La metformina, administrada en forma conjunta con DHEA, previno la disminución de GSH pero no pudo normalizar ni LPO ni CAT. Analicemos estos resultados, debemos señalar que existe controversia en la literatura respecto de la relación entre metformina y estrés. Veamos, si bien se ha demostrado que la metformina fue efectiva en el aumento de especies antioxidantes<sup>39</sup>, actividad antioxidante de glóbulos rojos de ratas con dieta de alta fructosa<sup>39-41</sup>, en la regulación antioxidante hepática de ratas<sup>42</sup> y en la disminución de la actividad de la xantina oxidasa en pacientes diabéticos tipo 2<sup>43-45</sup>. Pero por otro lado, la metformina no fue capaz de disminuir la incrementada LPO presente en pacientes no obesas con PCOS<sup>18</sup> y tampoco fue capaz de capturar especies reactivas del oxígeno como  $O_2\cdot$  y  $H_2O_2$  generadas en leucocitos estimulados<sup>46</sup>. Esta controversia en la acción de metformina puede entenderse si se analizan resultados que señalan que el tipo de ROS que genere un tejido depende del inductor de ROS<sup>46</sup>. Estos resultados nos permiten inferir que si el inductor de ROS produce mayormente  $O_2\cdot$  y  $H_2O_2$  entonces la metformina no va a ser capaz de modificar la LPO. Si por el contrario, la especie mayoritariamente producida es  $OH\cdot$ , entonces la metformina podrá disminuir LPO.

Estos hallazgos, junto con los resultados presentados en este trabajo, donde presentamos que la metformina no pudo modular ni CAT –enzima que neutraliza  $H_2O_2$ – ni LPO, nos lleva a postular que como efecto de la hiperandrogenización con DHEA, las dos especies reactivas del oxígeno mayoritariamente formadas por el ovario serían  $O_2\cdot$  y  $H_2O_2$ . Se están realizando estudio in vitro para corroborar esta hipótesis.

Por otra parte, estamos presentando que la hiperandrogenización produce una disminución de la actividad ovárica de NOS. Considerando que el NO es una especie presuntamente oxidante, *¿es éste un resultado no esperado?* Decimos que no lo es y veamos porque. Primero, debemos considerar que en resultados previos hemos demostrado una incrementada LPO con una disminuida actividad ovárica de NOS y un aumento del estrés oxidativo durante el proceso de luteólisis<sup>15</sup>. Segundo, debemos recordar que las RNOS –como el radical peroxinitrito;  $ONOO\cdot$  que se forma por combinación de NO y  $O_2\cdot$  es un agente pro-oxidante mucho más agresivo que el NO mismo<sup>15,47</sup>. Por otra parte, esta presencia incrementada de  $O_2\cdot$ , que luego produciría  $ONOO\cdot$ , podría indirectamente relacionarse y confirmar nuestra hipótesis presentada arriba sobre la LPO, donde proponíamos que la metformina no

era capaz de disminuir LPO porque la biguanida no puede capturar  $O_2\cdot$  y  $H_2O_2$  y, por lo tanto, estos serían las ROS mayoritariamente producida por los ovarios luego de la inyección de DHEA.

Cabe aclarar que la disminución de la actividad ovárica de NOS producida por DHEA se debería a la regulación negativa de NOS por un efecto directo de NO sobre la enzima, tal como ha sido previamente demostrado<sup>15,48</sup>. Hemos encontrado que la metformina administrada junto con DHEA normalizó la actividad de la NOS. Debemos aquí señalar que el mecanismo de interacción entre la metformina y el sistema NO/NOS fue descrito en la restauración de la reactividad microvascular en ratas diabéticas<sup>49</sup>, en células aórticas bovinas<sup>28</sup> y en células hepáticas<sup>50</sup>. Sin embargo, los resultados aquí presentados son la primera evidencia de la regulación del sistema NO/NOS ovárica por metformina.

En el estudio del mecanismo celular involucrado vimos que la DHEA aumentaba la expresión ovárica de la proteína iNOS sugiriendo, tal como fue recientemente descrito en arterias mesentéricas<sup>51</sup>, que el incremento de la expresión de iNOS sería un mecanismo compensatorio como consecuencia de la disminución de la actividad de la NOS.

A diferencia de las ROS, existe acuerdo en literatura respecto de la acción de metformina en la regulación de GSH. Ha sido demostrado que la metformina regula los niveles de GSH durante la maduración de oocitos in vitro<sup>52</sup>, en hígados de ratas diabéticas<sup>53</sup>, en islotes pancreáticos de pacientes diabéticos tipo 2<sup>54-55</sup>, en eritrocitos de pacientes diabéticos tipo 2<sup>44</sup>, y durante hepatotoxicidad inducida por tetracloruro de carbono en ratones<sup>56</sup>. Aquí otra vez debemos destacar que nuestros resultados representan la primera evidencia de la acción de metformina regulando el contenido de GSH ovárico.

Otro aspecto del mecanismo molecular abarcado en este estudio fue el de la producción de prostanoïdes. Ya sea por la acción de las PGs en la funcionalidad ovárica, por el efecto inmunomodulador de la PGE, debido a la alteración del metabolismo lipídico presente en PCOS, y por la íntima regulación que ha sido descrita entre la NOS y COX, decidimos estudiar si la metformina regulaba la alteración de DHEA en la producción de PGE ovárica. Vimos que la DHEA disminuía la producción de PGE ovárica y aumentaba la expresión de la proteína COX2 evaluada por Western Blotting y que, otra vez, esta relación entre actividad de la enzima-expresión de la proteína fue similar a aquello observado en el caso de NOS. O sea, vemos

aquí otra vez que, si bien la producción de PGE estaba disminuida por la hiperandrogenización, la expresión de la enzima que la produce (COX2) se encontraba aumentada. Esto se debe a que, como hemos señalado anteriormente, los sistemas NO y PGE comparten numerosos caminos de regulación<sup>57-59</sup>. De hecho, ha sido ampliamente demostrado que el NO se combina con el grupo hemo de la COX<sup>57</sup>. En el presente trabajo demostramos, por primera vez, que la metformina revierte el efecto de la hiperandrogenización en la producción de PGE por el ovario y la expresión de la enzima COX2.

Debemos detenernos aquí para aclarar que la estructura de la metformina le confiere a la droga la actividad de una molécula “aminoguanidílica”, y le permite entonces poder interactuar con el grupo hemo de ambas enzimas NOS y COX<sup>60</sup>.

Se ha visto que la metformina ejerce numerosas acciones por activación de la vía de la AMPK. Particularmente, se ha demostrado que la metformina suprime el exceso de andrógenos en PCOS vía AMPK<sup>61</sup>. La fosforilación en Thr-172 es un paso necesario dentro del dominio catalítico de la subunidad  $\alpha$ ) para que se produzca la activación de la AMPK<sup>62-63</sup>. Los resultados presentados aquí muestran que la hiperandrogenización con DHEA –recordemos que genera una condición de estrés oxidativo en el ovario- aumentó la fosforilación en Thr<sup>172</sup> AMPK y que con el tratamiento con metformina se vio sobre-expresión de la proteína activada AMPK  $\alpha$ ). Estos resultados podrían sugerir que tal como fue descrito en otros sistemas<sup>31,50,61</sup> la metformina actuaría en el ovario hiperandrogenizado por activación crónica mediante fosforilación en Thr<sup>172</sup> AMPK-  $\alpha$ ).

En síntesis, con el presente trabajo hemos demostrado por primera vez que la metformina es capaz de regular el contenido de GSH total, la actividad de la NOS y la producción de PGE, y que no fue efectiva para modular la LPO y CAT de ovarios hiperandrogenizados. Según los resultados expuestos, estas acciones involucrarían la expresión proteica de iNOS y COX2 y la fosforilación de AMPK  $\alpha$ ).

## Referencias

1. Azziz R. PCOS: a diagnostic challenge. *Reprod Biomed Online* 2004;8:644-8
2. Abbott DH, Dumesic DA, Franks S. Developmental origin of polycystic ovary syndrome- a hypothesis. *J Endocrinol* 2002;174:1-5
3. Asuncion M, Calvo RM, San Millan JL,

- Sancho J, Avila S, Escobar-Morreale HF. A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2434-8
4. Franks S. Polycystic ovary syndrome. *New Engl J Med* 1995;333:853-61
5. Mahesh VB, Greenblatt RB. Isolation of dehydroepiandrosterone and 17 $\alpha$ -hydroxy-pregnenolone from polycystic ovaries of the Stein-Leventhal syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1962;22:441-8
6. Roy S, Mahesh VB, Greenblatt RB. Effect of dehydroepiandrosterone and androstenedione on the reproductive organs of female rats; production of cystic changes in the ovary. *Nat* 1962;196:2-6
7. Lee GY, Croop JM, Anderson E. Multidrug resistance gene expression correlates with progesterone production in dehydroepiandrosterone-induced polycystic equine chorionic gonadotropin-stimulated ovaries of prepuberal rats. *Biol Reprod* 1998;58:330-7
8. Henmi H, Endo T, Nagasawa K, Hayashi T, Chida M, Akutagawa N, Iwasaki M, Kitajima Y, Kiya T, Nishikawa. Lysyl oxidase and MMP-2 expression in dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovary in rats. *Biol Reprod* 2001;64:157-62
9. Luchetti CG, Solano ME, Sander V, Barreiro-Arcos ML, Gonzalez C, Di Girolamo G, Chiochio S, Cremaschi G, Motta AB. Effects of dehydroepiandrosterone on ovarian cystogenesis and immune function. *J Reprod Immunol* 2004;64:59-74
10. Sander V, Luchetti CG, Solano ME, Elia E, Di Girolamo G, Gonzalez C, Motta AB. Role of the N,N'-dimethylbiguanide metformin in the treatment of female prepuberal ALB/c mice hyperandrogenized with dehydroepiandrosterone. *Reprod* 2006;131:591-602
11. Mahesh VB, Murphy LL, O'Conner JL. Selective modulation of FSH and LH secretion by steroids. *Adv Exp Med Biol* 1987;219:131-52
12. Anderson E, Lee MT, Lee G. Cystogenesis of the ovarian antral follicle of the rat: ultrastructural changes and hormonal profile following the administration of dehydroepiandrosterone. *The Anat Record* 1992;234:359-82
13. Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet* 1984;1:1396-7
14. Motta AB, Estevez A, Gimeno MAF. The

- involvement of nitric oxide in corpus luteum regression in the rat: feedback mechanism between prostaglandin F2 alpha and nitric oxide. *Mol Hum Reprod* 1999;5:1011-6
15. Motta AB, Estevez A, Tognetti T, Gimeno MAF, Motta AB. Dual effects of nitric oxide in functional and regressing rat corpus luteum. *Mol Hum Reprod* 2001;7:43-7
  16. Motta AB, Estevez A, Franchi AM, Perez-Martinez S, Farina M, Ribeiro ML, Lasserre A, Gimeno MF. Regulation of lipid peroxidation by nitric oxide and PGF2 alpha during luteal regression in rats. *Reprod* 2001;121:631-7
  17. Sabuncu T, Vural H, Harma M, Harma M. Oxidative stress in polycystic ovary syndrome and its contribution to the risk of cardiovascular disease. *Clin Biochem* 2001;34:407-13
  18. Yilmaz M, Biri A, Karakoc A, Toruner F, Bingol B, Cakir N, Tiras B, Ayvaz G, Arslan M. The effects of rosiglitazone and metformin on insulin resistance and serum androgen levels in obese and lean patients with polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest* 2005;28:1003-8
  19. Ignarro IJ. Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypert* 1990;16:477-83
  20. Zackrisson U, Mikuni M, Wallin A, Delbro D, Hedin L, Brannstrom M. Cell-specific localization of nitric oxide synthases (NOS) in the rat ovary during follicular development, ovulation and luteal formation. *Hum Reprod* 1996;11:2667-73
  21. Estevez A, Farina M, Franchi AM, Johnson C, Vega M, Motta AB. Interleukin-1beta up-regulates nitrite production: effects on ovarian function. *Nit Oxid* 2004;10:92-100
  22. Wink DA, Cook JA, Pacelli R, DeGraff W, Gamson J, Liebmann J, Krishna MC, Mitchell JB. The effect of various nitric oxide-donor agents on hydrogen peroxide-mediated toxicity: a direct correlation between nitric oxide formation and protection. *Arch Biochem Biophys* 1996;331:241-8
  23. Aten RF, Duarte KM, Berhman HR. Regulation of ovarian antioxidant vitamins reduced glutathione and lipid peroxidation by luteinizing hormone and prostaglandin F2 alpha. *Biol Reprod* 1992;46:401-7
  24. Sugino N, Takiguchi S, Kashida S, Takayama H, Yamagata Y, Nakamura Y, Kato H. Suppression of intracellular superoxide dismutase activity by antisense oligonucleotides causes inhibition of luteal cells. *Biol Reprod* 1999;61:1133-8
  25. Harbone L, Fleming R, Lyall H. Metformin or antiandrogen in the treatment of hirsutism in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4116-23
  26. Tang T, Glanville J, Hayden CJ, White D, Barth JH, Balen AH. Combined lifestyle modification and metformin in obese patients with polycystic ovary syndrome. A randomized, placebo-controlled, double-blind multicentre study. *Hum Reprod* 2006;21:80-9
  27. Diamanti-Kandarakis E, Paterakis T, Alexandraki K, Piperi C, Aessopos A, Katsikis I, Katsilambros N, Kretsas G, Panidis D. Indices of low-grade chronic inflammation in polycystic ovary syndrome and the beneficial effect of metformin. *Hum Reprod* 2006;3, In press
  28. Zou MH, Kirkpatrick SS, Davis BJ, Nelson JS, Wiles WG IV, Schlattner U, Neumann D, Brownlee M, Freeman MB, Goldmann H. Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo. Role of mitochondrial reactive nitrogen species. *J Biol Chem* 2004;279:43940-51
  29. Navarra P, Andreani CL, Lazzarin N, Pierro E, Mirtella A, Lanzone A, Mancuso S. Increased production and release of prostaglandin E2 by human granulosa cells from polycystic ovaries. *Prost* 1996;52:187-97
  30. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 2001;108:1167-74
  31. Fryer LGD, Parbu-Patel A, Carling D. The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *J Biol Chem* 2002;277:25226-32
  32. Hardie DG. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinol* 2003;144:5179-83
  33. Zang M, Zuccollo A, Hou X, Nagata D, Walsh K, Herscovitz H, Brecher P, Ruderman WB, Cohen RA. AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells. *J Biol Chem* 2004;279:47898-905
  34. Davis BJ, Xie Z, Viollet B, Zou MH. Activation of the AMP-activated kinase by antidiabetic drug metformin stimulates nitric oxide synthesis in vivo by promoting the association of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide

- synthase. *Diab* 2006;55:496-505
35. Chance B. Special methods: catalase. Ed por Glick R. Interscience. New York 1954;408-24
  36. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54
  37. Vandermolen DT, Ratts VS, Evans WS, Stovall DW, Kauma SW, Nestler JE. Metformin increases the ovulation rate and pregnancy rate from clomiphene citrate in patients with polycystic ovary syndrome who are resistant to clomiphene citrate alone. *Fertil Steril* 2001;75:310-5
  38. Weerakiet S, Srisombut C, Rojanasakul A, Panburana P, Thakkinstian A, Herabutya Y. Prevalence of gestational diabetes mellitus and pregnancy outcomes in Asian women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2004;19:134-41
  39. Ceriello A. Oxidative stress and glycemic regulation. *Metab* 2000;49:27-9
  40. Faure P, Rossini E, Wiernsperger N, Richard MJ, Favier A, Halimi S. An insulin sensitizer improves the free radical defense system potential and insulin sensitivity in high fructose-fed rats. *Diab* 1999;48:353-7
  41. Srividhya S, Ravichandran MK, Anuradha CV. Metformin attenuates blood lipid peroxidation and potentiates antioxidant defense in high fructose-fed rats. *J Biochem Mol Biol Biophys* 2002;6:379-85
  42. Ewis SA, Abdel-Rahman MS. Effect of metformin on glutathione and magnesium in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Appl Toxicol* 1995;15:387-90
  43. Tessier D, Maheux P, Khalil A, Fulop T. Effects of gliclazide versus metformin on the clinical profile and lipid peroxidation markers in type 2 diabetes. *Metab* 1999;48:897-903
  44. Pavlovic D, Kocic R, Kocic G, Jevtovic T, Radenkovic S, Mikic D, Stojanovic M, Djordjevic PB. Effect of four-week metformin treatment on plasma and erythrocyte antioxidative defense enzymes in newly diagnosed obese patients with type 2 diabetes. *Diab Obes Metab* 2000;2:251-6
  45. Cosic V, Antic S, Pesic M, Jovanovic O, Kundalic S, Djordjevic VB. Monotherapy with metformin: does it improve hypoxia in type 2 diabetic patients? *Clin Chem Lab Med* 2001;39:818-21
  46. Bonnefont-Rousselot D, Raji B, Walrand M, Peynet J, Vasson MP. An intracellular modulation of free radical production could contribute to the beneficial effects of metformin towards oxidative stress. *Metab* 2003;52:586-9
  47. Rosenberg PA, Li Y, Ali S, Back SA, Volpe JJ. Intracellular redox state determines whether nitric oxide is toxic or protective to rat oligodendrocytes in culture. *J Neurochem* 1999;73:476-84
  48. Rengasamy A, Johns RA. Regulation of nitric oxide synthase by nitric oxide. *Pharmacol* 1993;44:124-8
  49. Sartoretto JL, Melo GA, Carvalho MH, Nigro D, Passaglia RT, Scavone C, Cuman RK, Fortes ZB. Metformin treatment restores the altered microvascular reactivity in neonatal streptozotocin-induced diabetic rats increasing NOS activity, but not NOS expression. *Life Sci* 2005;77:2676-89
  50. Mc Carty, M. F. AMPK activation may suppress hepatic production of C-reactive protein by stimulating nitric oxide synthase. *Med Hypotheses* 2004;63:328-83
  51. Briones AM, Montoya N, Giraldo J. Ageing affects nitric oxide synthase, cyclooxygenase and oxidant stress enzymes expressions differently in mesenteric resistance arteries. *Auton Autocoid Pharmacol* 2005;25:155-62
  52. Lee MS, Kang SK, Lee BC, Hwang WS. The Beneficial Effects of Insulin and Metformin on In Vitro Developmental Potential of Porcine Oocytes and Embryos. *Biol Reprod* 2005;73:1264-8
  53. Yanardag R, Ozsoy-Sacan O, Bolkent S, Ozgey Y. Protective effects of metformin treatment on the liver injury of streptozotocin-diabetic rats. *Hum Exp Toxicol* 2005;24:129-35
  54. Guigas B, Detaille D, Chauvin C, Batandier C, De Oliveira F, Fontaine E, Leverve X. Metformin inhibits mitochondrial permeability transition and cell death: a pharmacological in vitro study. *Biochem J* 2004;382:877-84
  55. Marchetti P, Del Guerra S, Marselli L, Lupi R, Masini M, Pollera M, Bugliani M, Boggi U, Vistoli F, Mosca F, Del Prato S. Pancreatic islets from type 2 diabetic patients have functional defects and increased apoptosis that are ameliorated by metformin. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5535-41
  56. Poon MK, Chiu PY, Mak DH, Ko KM. Metformin protects against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice. *J Pharmacol Sci* 2003;93:501-4
  57. Salvemini M, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad*

Sci USA 1993;90:7240-4

58. Mollace V, Muscole C, Masini E, Cuzzocrea S, Salvemini D. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide donors. *Pharmacol Rev* 2005;57:217-52
59. Schrage WG, Dietz NM, Eisnach JH, Joyner MJ. Agonist-dependent variability of contributions of nitric oxide and prostaglandins in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2005;98:1251-7
60. Youssef S, Nguyen DT, Soulis T. Effect of diabetes and aminoguanidine therapy on renal advanced glycation end-product binding. *Kidney Int* 1999;55:907-16

Kidney Int 1999;55:907-16

61. Mc Carty MF. Chronic activation of AMPK-activated kinase as a strategy for slowing aging. *Med Hypotheses* 2004;63:334-9
62. Crute BE, Seefeld K, Gamble J. Functional domains of the alpha1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1998;273:35347-54
63. Stein SC, Woods A, Jones NA, Davison MD, Carling D. The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochem J* 2000;345:437-43