



Proteómica y síndrome de ovario poliquístico: ¿encontraremos aquí el eslabón perdido? Revisión de la bibliografía

RESUMEN

El síndrome de ovario poliquístico es la enfermedad ginecológica y endocrina más frecuente en mujeres en edad reproductiva. Es, además, una de las causas más comunes de hiperandrogenismo y anovulación que incrementan el riesgo de síndrome metabólico, diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad cardiovascular. A la fecha, su causa es incierta. Se dice que puede ser resultado de la interacción de variantes genéticas con factores ambientales que dependen ampliamente de la etnicidad. La proteómica permite estudiar la expresión de cientos o miles de proteínas para conocer el estado fisiológico de un tejido u órgano a nivel molecular e identificar biomarcadores específicos de enfermedad. Su aplicación en el síndrome de ovario poliquístico permite identificar las proteínas que participan en la patogénesis del síndrome y desarrollar técnicas diagnósticas precisas y enfoques específicos de tratamiento.

Palabras clave: síndrome de ovario poliquístico, proteómica, síndrome de ovario poliquístico y proteómica.

Israel Obed Carmona-Ruiz¹
Eric Saucedo de la Llata²
María Rosa Moraga-Sánchez³
María Luisa Hernández-Sánchez⁴
María Dolores Gutiérrez-Blázquez⁴
Alberto Romeu-Sarrió⁵

¹ Departamento científico Clínica Imar, Universidad Católica San Antonio de Murcia, España.

² Director.

³ Codirectora.

⁴ Unidad de Proteómica, CAI de Genómica y Proteómica. Universidad Complutense, Madrid, España.

⁵ Coordinador científico de la Clínica Imar.

Proteomics and PCOS: Is it here the missing link? Literature review

ABSTRACT

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is known as a common gynecologic and endocrinology disease with multiple short and long-term consequences. It is one of the most common causes for hyperandrogenism and anovulation, increases the risk for metabolic syndrome, type 2 diabetes and cardiovascular disease. Its etiology remains unclear. PCOS is thought to be the result of the interaction between predisposing genetic variants with environmental factors and strongly depends on ethnicity. Proteomics allows the study of several hundreds or thousands of proteins in order to reveal physiological state of a tissue or an organ at the molecular level and to identify disease-specific biomarkers. Its use on PCOS patients will permit us to identify molecules that are involved in the PCOS pathology so we can develop specific diagnostic and management approaches.

Key words: polycystic ovary syndrome, PCOS, proteomic; PCOS and proteomics.

Recibido: julio 2015

Aceptado: agosto 2015

Correspondencia

Dr. Israel Obed Carmona-Ruiz
Calle Miguel Hernández 3
30011 Murcia, España
israel.carmona@clinicaimar.com

Este artículo debe citarse como:

Carmona-Ruiz IO, Saucedo de la Llata E, Moraga-Sánchez MR, Hernández-Sánchez ML, Gutiérrez-Blázquez MD, Romeu-Sarrió A. Proteómica y síndrome de ovario poliquístico: ¿encontraremos aquí el eslabón perdido? Revisión de la bibliografía. Ginecol Obstet Mex 2015;83:614-626.



ANTECEDENTES

El síndrome de ovario poliquístico es la enfermedad ginecológica y endocrina más frecuente en mujeres en edad reproductiva.¹⁻⁴ Es, además, una de las causas más comunes de hiperandrogenismo (hirsutismo, acné) y anovulación (alteraciones menstruales e infertilidad)³ y de incremento del riesgo de síndrome metabólico, diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad cardiovascular.⁵ La prevalencia va de 4 a 16%, según diferentes autores.⁶⁻¹⁰

La patogénesis del síndrome de ovario poliquístico se desconoce. Puede ser resultado de la interacción de variantes genéticas protectoras (que proveen una ventaja para la supervivencia en condiciones de estrés y ayuno) de factores ambientales (estilo de vida, dieta y ejercicio) que dependen ampliamente de la etnicidad.¹¹

El desarrollo de nuevas tecnologías que permiten estudiar la expresión de cientos o miles de proteínas para revelar el estado fisiológico de un tejido u órgano a nivel molecular e identificar biomarcadores específicos de enfermedad se conoce como proteómica. Su uso o aplicación en el síndrome de ovario poliquístico permite identificar proteínas que participan en la patogénesis del síndrome y desarrollar técnicas diagnósticas precisas y enfoques específicos de tratamiento.¹¹

Etiopatogenia

En la última década se han publicado estudios que apoyan un papel de la resistencia a la insulina o la hiperinsulinemia compensatoria en la patogenia del síndrome de ovario poliquístico.^{12,13} La hiperinsulinemia ocurre en alrededor de 80% de las mujeres con síndrome de ovario poliquístico y obesidad central así como entre 30-40% de las mujeres sin sobrepeso diagnosticadas con el síndrome.^{14,15}

Está demostrado, además, que la resistencia a la insulina y la subsecuente hiperinsulinemia contribuyen directa e indirectamente al hiperandrogenismo.^{16,17} La insulina estimula directamente a las células de la teca para producir andrógenos e inhibir la síntesis de proteína fijadora de hormonas sexuales (SHBG), lo que conduce al incremento de las concentraciones circulantes de andrógenos libres. La resistencia a la insulina observada en pacientes con síndrome de ovario poliquístico predispone al inicio de diabetes mellitus 2, sobre todo cuando también coexiste obesidad y antecedentes de diabetes.¹⁸

Algunos grupos de investigación sugieren que el origen del síndrome de ovario poliquístico implica algún tipo de programación de los ejes metabólico-endocrino desde la vida fetal, sobre todo el metabolismo de los carbohidratos y la secreción adrenal.¹⁹⁻²² Así, la exposición intrauterina a condiciones de estrés puede afectar el fenotipo metabólico, hormonal y reproductivo al poner en un riesgo significativamente mayor de padecer síndrome de ovario poliquístico en la adolescencia.²³

Escobar-Morreale y San Millan²⁴ proponen un defecto primario en la esteroidogénesis que conduce a un exceso de andrógenos de grado variable. Si el defecto es muy severo, el resultado final es el síndrome de ovario poliquístico sin la necesidad de otro factor contribuyente. Si el defecto es leve, la obesidad y la resistencia a la insulina determinarán la aparición del síndrome de ovario poliquístico en la paciente.

Quizá lo más importante de la patogenia es la existencia de un círculo vicioso donde la resistencia a la insulina contribuye al hiperandrogenismo y éste, a su vez, a la obesidad central que favorece la resistencia a la insulina; así es como se cierra el círculo sin saber con certeza dónde inicia el problema.

Diagnóstico

Se han propuesto tres criterios diagnósticos importantes para identificar a las mujeres con síndrome de ovario poliquístico: 1) los criterios del National Institute of Health (NIH, Bethesda, Maryland, USA), en 1990;²⁵ 2) los criterios de la Conferencia de Consenso que tuvo lugar en 2003 en Rotterdam, entre expertos de la European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) y la American Society for Reproductive Medicine (ASRM);²⁶ y 3) los criterios de The Androgen Excess and PCOS Society, en 2006.²⁷ Cuadro 1

Hay ventajas y desventajas en cada uno de los tres criterios. Los criterios del NIH 1990 representan el núcleo de todas las pacientes con síndrome de ovario poliquístico. Los criterios de Rotterdam y de la AES amplían la definición aumentando los posibles fenotipos.^{28,29} Los criterios del NIH 1990 y de la AES 2006 definen una población de pacientes con mayor riesgo de resistencia a la insulina que la población general.^{28,30} Los criterios de Rotterdam 2003 definen un grupo más heterogéneo donde la incidencia de resistencia a la insulina es más baja que en los otros dos criterios.^{28,29,30}

Hace poco se recomendaron los criterios de Rotterdam como método diagnóstico por ser los más amplios y apropiados en un contexto

Cuadro 1. Criterios diagnósticos para síndrome de ovario poliquístico

Signos y síntomas*	NIH (1990)	Rotterdam (2003)	AES (2006)
Hiperandrogenismo+	R	NR	R
Oligo por anovulación	R	NR	NR
Ovarios poliquísticos		NR	NR

R: requerido.

NR: no requerido.

* Excluir otra patología.

+ Hirsutismo o hiperandrogenemia bioquímica.

global, sin olvidar la necesidad de identificar el fenotipo de cada paciente con síndrome de ovario poliquístico.^{31,32}

Tratamiento y perspectiva actual

Sin una causa definida, debate en los criterios diagnósticos y con un fenotipo tan variable, el tratamiento de pacientes con síndrome de ovario poliquístico ha terminado por enfocarse a los síntomas o problemas más graves y evidentes.

Las estrategias iniciales se basan en disminuir la resistencia a la insulina mediante la pérdida de peso, dieta y ejercicio; cuando esto falla, los sensibilizantes de la insulina pueden jugar un papel importante en el tratamiento.^{13,33,34}

Otra modalidad incluye los tratamientos de fertilidad para mujeres que desean procrear y el uso de anticonceptivos orales combinados para regular las alteraciones menstruales.³² Puede necesitarse la prescripción de antiandrógenos, dependiendo de la severidad del hiperandrogenismo o de la cirugía bariátrica para quienes tienen obesidad mórbida y ya se ha iniciado el síndrome metabólico.³²

Con lo anterior se deducen ciertos retos clínicos que Atiomo y su grupo³⁵ plantearon de manera sencilla en su revisión del 2009, algunos de ellos se revisaron recientemente.³²

Existe controversia en los criterios diagnósticos ideales y no hay un acuerdo acerca de la valoración según diferentes grupos de edad, como adolescentes o mujeres posmenopáusicas.³²

El diagnóstico de hirsutismo es subjetivo y varía según la raza. Las alteraciones bioquímicas de las concentraciones de andrógenos también son variables y pueden contrastarse con valores de mujeres sanas.^{32,35}



La interpretación de la morfología del ovario poliquístico por ecografía (POm) es subjetiva y depende de la experiencia del examinador.³² No todas las mujeres con síndrome de ovario poliquístico tienen todos los síntomas.³²

Al tratar el síndrome de ovario poliquístico por infertilidad, no todas las mujeres reaccionan igual a las diferentes opciones de tratamiento con clomifeno, gonadotropinas y electrocoagulación múltiple puntiforme del ovario.

De manera semejante, no todas las mujeres reaccionan favorablemente a las estrategias para bajar de peso.

Hoy día no es posible determinar con certeza quién padecerá diabetes tipo 2, cáncer endometrial o enfermedad cardiovascular.^{32,35}

La resolución de estos retos facilitaría el diagnóstico (sin importar la edad o etnicidad) y comprender la historia natural de la enfermedad. Por consiguiente, podrá indicarse el tratamiento adecuado sin la incertidumbre de su respuesta a las diferentes opciones disponibles.

Proteómica

Para hablar de información molecular es importante reconocer los diferentes pasos que ocurren desde la transcripción de genes hasta la síntesis de metabolitos.

Básicamente puede afirmarse que existen cuatro pasos importantes con sus respectivas áreas de estudio: *a)* genómica, el estudio de los genes en el ADN; *b)* transcriptómica, el estudio del ARN; *c)* proteómica, el estudio de las proteínas resultantes de la transcripción y *d)* metabolómica, el estudio de los metabolitos sintetizados por las células.

En los últimos años, la genómica se ha desarrollado de manera importante. Ha dado buenos resultados al identificar *locus* susceptibles para una amplia variedad de enfermedades humanas, incluidas: la diabetes mellitus tipo 2, obesidad, asma, alteraciones psiquiátricas y la fertilidad.³⁶⁻⁴⁰ Sin embargo, la falta de estudios amplios y la heterogeneidad existente en los fenotipos de pacientes con síndrome de ovario poliquístico hacen difícil la aplicación de la genómica en este síndrome.⁴¹

Es frecuente encontrar discrepancias entre el gen y la proteína expresada, algo que puede deberse a las modificaciones que ocurren posttraducción dentro de las mismas células por diferentes factores. Los cambios que suceden en la genética no siempre son representativos de los procesos que ocurren dentro de las células, porque las proteínas son las encargadas de ejercer sus funciones a través de complejas y variadas estructuras después de sufrir una serie de posibles modificaciones posttraduccionales e interacciones proteína-proteína.⁴²

Con base en el hecho de que las proteínas son las efectoras de la función celular, la tecnología en proteómica permitirá, en un momento determinado y bajo ciertas circunstancias, estudiar la expresión de unas u otras proteínas que provienen de tejidos específicos para así poder identificar biomarcadores que permitan el diagnóstico, pronóstico o estratificación de las enfermedades.

La proteómica es el estudio comprensivo del perfil cuantitativo y cualitativo de las proteínas existentes en muestras clínicas, tejidos o fluidos corporales.⁴³ El enfoque principal está en descubrir proteínas importantes y su papel en las vías celulares que se asocie con una enfermedad de interés, complementando así el conocimiento actual y dando un nuevo panorama para su tratamiento.⁴³

Proteómica: un breve resumen de la metodología

La proteómica clínica consiste en varios procesos experimentales que se resumen en la Figura 1 y se describen brevemente enseguida.

Selección de la muestra a analizar

Como primer paso para el estudio o la aplicación de la proteómica es necesario elegir la muestra a ser analizada. Se han utilizado diferentes tipos de muestras que van desde fluidos corporales (plasma, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido folicular, etc.) hasta tejidos (hígado, corazón, músculo, cerebro, tejido adiposo, etc.) y células. Cada tipo de muestra tendrá sus ventajas y limitaciones para el análisis proteico.

Separación de las proteínas

Para efectuar la identificación, caracterización o cuantificación de las proteínas es necesario extraerlas de la muestra biológica (extracción) y, en muchos casos, realizar un prefraccionamiento. Enseguida deben separarse las proteínas del extracto proteico. La técnica más común para este propósito, basada en gel, es la electroforesis monodimensional (SDS-PAGE) que separa las

proteínas según su masa molecular o la electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (2D-PAGE) que separa las proteínas según dos parámetros: la masa molecular y la carga. Una variación de esta última técnica, con ventajas en sensibilidad, precisión y cuantificación relativa de proteínas en muestras en diferentes condiciones, es la electroforesis diferencial en gel bidimensional (2-D-DIGE).

La cromatografía líquida es la otra técnica ampliamente utilizada para la separación de mezclas de proteínas y péptidos. Esta técnica es especialmente utilizada para la identificación de péptidos en muestras de alta complejidad.⁴³

Identificación de proteínas

Sin importar el método utilizado para la separación y cuantificación es preciso identificar las proteínas de una forma segura y concluyente. Esto se efectúa, casi siempre, por medio de espectrometría de masas.

La sensibilidad y precisión de los espectrómetros modernos permite el análisis de nanogramos de proteínas individuales o de sus péptidos derivados.

Los analizadores de masa más comúnmente utilizados en proteómica son el *time-of-flight* (TOF), el triple-cuádrupolo, la trampa de iones o combinaciones de ellos, como el TOF/TOF, el Q-TOF y la trampa híbrida *orbitrap* (LTQ-orbitrap), entre otros.⁴⁴

Los espectrómetros basados en *Orbitrap* se utilizan ampliamente en varios campos de la ciencia, como: metabolómica, medio ambiente, alimentación y análisis de seguridad. Esta tecnología provee de la más alta resolución y precisión para determinar la masa, reducir los tiempos de análisis y aumentar la cantidad y confiabilidad de los datos.

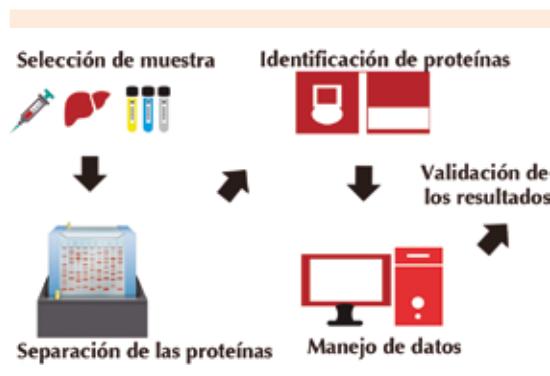


Figura 1. Procesos experimentales de la proteómica clínica.



Manejo de datos

El desarrollo de gran número de herramientas bioinformáticas en paralelo con los equipos de espectrometría de masas ha permitido el análisis de un gran volumen de datos para la identificación y cuantificación de miles de proteínas. Para la identificación hay diferentes programas de cómputo que actúan como motores de búsqueda, como *MASCOT*, *SEQUEST*, *XTandem*, Andrómeda, etc., que utilizan un algoritmo para comparar los datos observados experimentalmente (adquiridos con los espectrómetros de masas) con los datos *in-silico* obtenidos de digerir de forma teórica las secuencias de proteínas anotadas en las bases de datos disponibles y estimar si las coincidencias son suficientes como para que no se deban al azar y, por tanto, permitan identificar proteínas de forma estadísticamente significativa.

UniProt (Universal Protein Resource) es una base de datos de alta calidad y accesible de manera gratuita que proporciona la secuencia e información funcional de proteínas. Gran parte de su base de datos se ha obtenido de proyectos secuenciales del genoma.

De la misma manera, hay gran número de programas comerciales y libres para llevar a cabo la cuantificación relativa o absoluta de proteínas en diferentes condiciones, a partir del análisis de un determinado número de réplicas biológicas y técnicas.

Existen diferentes estrategias para la cuantificación de proteínas basada en espectrometría de masas para analizar proteomas (Domon and Aebersold, 2010), dos de las fundamentales son: descubrimiento de las proteínas que se expresan de forma diferencial en dos o más condiciones diferentes (*Discovery-based quantification*) y cuantificación dirigida (*targeted based quantification, MRM-quantification*) (Doerr, 2013; Picotti and Aebersold, 2012). El objetivo de la primera es

identificar y cuantificar el mayor número de proteínas para establecer las que están implicadas en un determinado proceso biológico. Esta estrategia se utiliza para la búsqueda de biomarcadores y en la segunda es cuantificar, de forma segura con gran sensibilidad y reproducibilidad, una o unas pocas proteínas de interés seleccionadas previamente con carácter diagnóstico o pronóstico.

Validación de las proteínas identificadas

El *Western blot* es la técnica más usada para validar los resultados mediante la detección de proteínas específicas en muestras de tejido o extractos. Otras técnicas utilizadas comprenden el *dot blot* y la detección de proteínas por inmunoensayo (ELISA).⁴⁴

Proteómica y síndrome de ovario poliquístico

Los estudios de proteómica para el síndrome de ovario poliquístico se han realizado en diferentes tejidos y fluidos corporales que incluyen: tejido ovárico, suero, tejido adiposo visceral, plasma y células de la granulosa del ovario.⁴⁴ El líquido folicular también se ha estudiado de manera extensa debido a su fácil accesibilidad en pacientes que llevan algún procedimiento de aspiración folicular luego de una estimulación ovárica controlada.⁴⁴

Como lo resumió de manera excelente Insenser y su grupo, en una revisión en 2013,¹¹ hay actualmente un gran número de moléculas que participan en diversos procesos biológicos y que se ha identificado pueden tener un papel en la patogenia del síndrome de ovario poliquístico.

Biomoléculas relacionadas con vías de energía metabólicas

Metabolismo de los carbohidratos

Se ha demostrado un incremento en la concentración de diversas proteínas en el tejido ovárico

y las células de la granulosa, como por ejemplo aconitato hidratasa, fructosa-bifosfato aldolasa, malato dehidrogenasa, isoenzimas M1/M2 de la piruvato cinasa y la transaldolasa.⁴² Por el contrario, la proteína UDP-glucosa 6 deshidrogenasa se encuentra disminuida y se cree que limita la disponibilidad intracelular de andrógenos.^{42,45} Se ha encontrado también un incremento del ácido láctico de pacientes no obesas con síndrome de ovario poliquístico que discrepa de una reducción que se observa en pacientes obesas, lo que puede indicar que no todos los tejidos de las pacientes no obesas con síndrome de ovario poliquístico son insulinorresistentes.⁴⁶

Metabolismo de los lípidos

Las mujeres con síndrome de ovario poliquístico se asocian, frecuentemente, con alteraciones en el perfil de los lípidos, como el incremento en los triglicéridos, colesterol y la concentración de LDL, además de reducción en las concentraciones de apolipoproteína A-1 (APOA1).⁴⁷⁻⁴⁹ La resistencia a la insulina, el exceso de andrógenos y la obesidad pueden contribuir a estas alteraciones.⁵⁰ La APOA1 es la principal proteína estructural de las partículas de HDL⁴⁴ y un estudio en metabolómica confirmó el incremento en las concentraciones de LDL con disminución del colesterol HDL.⁵¹ Además, la apolipoproteína C-1 está incrementada en mujeres con síndrome de ovario poliquístico, y es la encargada de inhibir el metabolismo de las lipoproteínas en el hígado, cuando no disminuyen se incrementa el riesgo cardiovascular.⁵²

La carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT 1) es la enzima clave en el transporte dependiente de carnitina a través de la membrana interna mitocondrial, su deficiencia disminuye el porcentaje de beta oxidación de ácidos grasos.⁵³ En el tejido ovárico de pacientes con síndrome de ovario poliquístico se observa un incremento en su concentración con el consecuente aumento en la beta oxidación de ácidos grasos.⁴²

La disminución de la disponibilidad de la proteína asociada con la membrana plasmática en adipocitos (APMAP) contribuye a las alteraciones en los mecanismos de defensa antioxidantas que son típicamente observados en pacientes con síndrome de ovario poliquístico.^{54,55}

El incremento en las concentraciones de glicerol y ácidos grasos libres que se observa en pacientes obesas con síndrome de ovario poliquístico sugiere un incremento en la lipólisis secundaria a una deficiencia en la acción de la insulina en el tejido adiposo.¹¹

Biomoléculas relacionadas con el metabolismo de las proteínas

Se ha encontrado una disminución de las concentraciones plasmáticas de diversos aminoácidos en pacientes con síndrome de ovario poliquístico, lo que sugiere disminución de la transaminación de leucina.⁴⁶ La resistencia periférica a la insulina puede ser la causa debido a que algunos tejidos, como el músculo, requieren una señal normal de la insulina para este proceso.¹¹

Se observa también un incremento en las concentraciones plasmáticas de homocisteína, factor de riesgo cardiovascular, preeclampsia y pérdida gestacional recurrente.^{56,57}

Biomoléculas relacionadas con el doblaje de proteínas

Las proteínas de choque térmico (HSPs) son una familia de moléculas que participa en el plegamiento de proteínas. Son de bajo peso molecular y pueden funcionar a temperaturas más altas que otras proteínas.⁴⁴ Además, la *Hsp10*, *Hsp27* y la *Hsp60* pueden contribuir a la inhibición de la apoptosis y al desarrollo y maduración del folículo.^{42,58} La *Hsp27* confiere resistencia al estrés oxidativo inhibiendo caspasas celulares o desactivando las especies reactivas derivadas



del oxígeno (ROS) dentro de la célula.⁵⁹ Estas proteínas están disminuidas en el tejido ovárico y las células de la granulosa de pacientes con síndrome de ovario poliquístico.^{42,58}

Proteínas relacionadas con la estructura del citoesqueleto

En mujeres con síndrome de ovario poliquístico se observa un incremento en la disponibilidad de varias proteínas del citoesqueleto, como la betatubulina, beta-centractina, complejo de proteína T, nucleósido difosfato cinasa B, precursor de la cadena alfa 2 de colágeno, laminina A/C y B2, vimentina, entre otras.^{42,58}

La actina juega también un papel importante al regular el tráfico mediado por la insulina del transportador de glucosa 4 en la membrana del adipocito. En pacientes con síndrome de ovario poliquístico se observa una disminución de su actividad y esto puede colaborar al transporte reducido de glucosa y a la resistencia a la insulina.⁵⁴

Biomoléculas relacionadas con la respuesta inmunológica, la inflamación y el metabolismo del hierro

La inflamación crónica de bajo grado puede ser un factor contribuyente a la patogénesis del síndrome de ovario poliquístico y ser el enlace faltante para asociar al síndrome de ovario poliquístico con las complicaciones metabólicas y cardiovasculares observadas en las pacientes.^{50,60}

La mayor parte de las proteínas implicadas son de fase aguda. Se habla que muchas de las alteraciones en estas proteínas pueden deberse a modificaciones post-traduccionales en enfermedades inflamatorias.⁶¹

El hierro es un metal pesado, capaz de actuar como molécula redox.⁴⁴ Su capacidad de trans-

ferir electrones le permite formar moléculas de radicales libres; por ello, un incremento en el hierro libre causaría estrés oxidativo dentro de las células con un incremento de los ROS.⁴⁴

La disponibilidad de transferrina (proteína de fase aguda) se encuentra aumentada en mujeres con síndrome de ovario poliquístico.⁶² Es importante notar que este incremento puede deberse al mecanismo compensatorio para la disponibilidad del hierro para la eritropoyesis, característico de las enfermedades crónicas.⁶² Las altas concentraciones de transferrina pueden inhibir la unión de FSH a las células de la granulosa y, en consecuencia, alterar el crecimiento y la maduración folicular.⁶³

La haptoglobina tiene propiedades antiinflamatorias y protege contra el estrés oxidativo al unirse a iones de hierro tóxicos después de la hemólisis intravascular. Se encuentra reducida en el plasma de mujeres con síndrome de ovario poliquístico.⁶²

Biomoléculas relacionadas con la regulación de la fibrinólisis y la trombosis

Con frecuencia se ven alteraciones en el sistema de coagulación en mujeres con síndrome de ovario poliquístico.⁶⁴⁻⁶⁶ Aunque los mecanismos no estén claros, estas alteraciones se le atribuyen a la hiperglucemia, resistencia a la insulina, agentes proinflamatorios y a la dislipidemia.⁶⁷ Se observa un incremento en las concentraciones de antitrombina III, fibrinógeno alfa y gamma, y anexina 5.^{42,54,58}

Biomoléculas relacionadas con el estrés oxidativo

El estrés oxidativo coexiste en muchas enfermedades relacionadas con la resistencia a la insulina, donde la hiperglucemia y el aumento de ácidos grasos libres generan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).^{55,68,69}

Algunas de las proteínas relacionadas con el estrés oxidativo que se encuentran incrementadas en el tejido ovárico, linfocitos T y tejido adiposo de pacientes con síndrome de ovario poliquístico son: glutatión s transferasa M2 y NG, dimetilaminohidrolasa NG-dimetilarginina 1 (DDAH1).⁴² La peroxirredoxina 2 se observa disminuida en el tejido adiposo visceral y en las células de la teca.⁵⁴

Biomoléculas relacionadas con el metabolismo del calcio

El calcio (Ca2+) es una molécula que participa en la regulación de diversas funciones celulares, sobre todo en el metabolismo energético entre el citosol y la mitocondria. Varios trabajos sugieren una asociación de las alteraciones del metabolismo del Ca2+ y la vitamina D.⁷⁰⁻⁷²

Las anexinas son proteínas reguladas por Ca2+ que se unen a fosfolípidos cargados negativamente y establecen interacciones específicas con otros lípidos. Participan en procesos celulares, como la migración celular, proliferación y apoptosis.⁷³ La disponibilidad de anexinas A6, A11 y A2 está disminuida en el tejido ovárico y en las células de la granulosa de pacientes con síndrome de ovario poliquístico.^{42,58}

Otro estudio de genómica también se ha asociado con genes relacionados con la señalización del calcio con el síndrome de ovario poliquístico.⁷⁴

DISCUSIÓN

Atiomo y su grupo³⁵ generaron la primera base de datos resultado de enumerar diversos estudios en proteómica de pacientes con síndrome de ovario poliquístico. Se han descrito 148 biomarcadores hasta la fecha y ya se conoce la función o vía implicada en 100 de ellos.

El problema con estos resultados es que no hay conclusiones ciertas que puedan derivarse de

los estudios, debido a su diseño. Por ejemplo, no puede determinarse si la diferencia en la expresión de una proteína en una paciente con síndrome de ovario poliquístico *versus* una paciente control se debe, en realidad, al síndrome de ovario poliquístico o simplemente como consecuencia de la asociación del síndrome con otra afección. Otros puntos débiles son la heterogeneidad que ha habido en cuanto a muestras biológicas estudiadas (suero, tejido ovárico, líquido folicular) y el tamaño de los estudios (3-30 pacientes).

Creemos que son necesarios más estudios controlados con diferentes tipos de población, donde se corrobore y valide la base de datos existente. Es de suma importancia determinar si en verdad existen diferencias raciales, como lo han descrito varios autores⁷⁵⁻⁷⁸ porque, como lo mencion Wang y colaboradores,⁷⁵ las diferencias clínicas, hormonales y metabólicas entre diferentes grupos étnicos deben considerarse para el diagnóstico y tratamiento.

También se ha mencionado cómo los fenotipos del síndrome de ovario poliquístico tienen diferente pronóstico a corto y largo plazo en las complicaciones y riesgos metabólicos;⁷⁴⁻⁸⁴ por tanto, el segundo paso será que esas pacientes estudiadas y diagnosticadas con el síndrome se clasifiquen en uno de los cuatro fenotipos reconocidos y se valore y determinen las diferencias que puede haber entre ellos en términos de proteómica. Esto podría aclarar la variación de la presencia en el mismo tipo de población y el porqué unas mujeres cambian de un fenotipo a otro durante su vida.

CONCLUSIÓN

El síndrome de ovario poliquístico se describió hace 80 años y, a pesar de los avances médicos, sigue sin poderse determinar el origen de esta enfermedad. La proteómica ha abierto puertas a



las alteraciones observadas a nivel molecular, lo que conduce a un segundo paso que consiste en relacionar estos cambios con la clínica y tratar de resolver las dudas acerca de la etiopatogenia del síndrome. Creemos, firmemente, que en la proteómica está el eslabón perdido que puede ayudar a facilitar el diagnóstico preciso y seleccionar un tratamiento específico.

Agradecimientos

A Silvia Gaona Chávez por su constante y desinteresado apoyo para la realización de este artículo.

REFERENCIAS

1. Azziz R, Marin C, Hoq L, Badamgarav E, Song P. Health care-related economic burden of the polycystic ovary syndrome during the reproductive life span. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(8):4650-8.
2. Carmina E, Lobo RA. Polycystic ovary syndrome (PCOS): arguably the most common endocrinopathy is associated with significant morbidity in women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(6):1897-9.
3. Carmina E, Rosato F, Janni A, Rizzo M, Longo RA. Extensive clinical experience: relative prevalence of different androgen excess disorders in 950 women referred because of clinical hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(1):2-6.
4. Essah PA, Nestler JE. The metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;29(3):270-80.
5. Amsterdam EA-SrPCWG. Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS). *Human Reproduction*. 2012;27(1):14-24.
6. Knochenhauer ES, Key TJ, Kahsar-Miller M, Waggoner W, Boots LR, Azziz R. Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(9):3078-82.
7. 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(7):2434-8.
8. Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(6):2745-9.
9. Lauritsen MP, Bentzen JG, Pinborg A, Loft A, Forman JL, Thuesen LL, et al. The prevalence of polycystic ovary syndrome in a normal population according to the Rotterdam criteria versus revised criteria including anti-Müllerian hormone. *Human Reproduction*. 2014.
10. Michelmore KF, Balen AH, Dunger DB, Vessey MP. Polycystic ovaries and associated clinical and biochemical features in young women. *Clinical endocrinology*. 1999;51(6):779-86.
11. Insenser M, Montes-Nieto R, Murri M, Escobar-Morreale HF. Proteomic and metabolomic approaches to the study of polycystic ovary syndrome. *Molecular and cellular endocrinology*. 2013;370(1-2):65-77.
12. Nestler JE. Role of hyperinsulinemia in the pathogenesis of the polycystic ovary syndrome, and its clinical implications. *Seminars in reproductive endocrinology*. 1997;15(2):111-22.
13. Baillargeon JP, Iuorno MJ, Nestler JE. Insulin sensitizers for polycystic ovary syndrome. *Clinical obstetrics and gynecology*. 2003;46(2):325-40.
14. Genazzani AD, Battaglia C, Malavasi B, Strucchi C, Tortolani F, Gamba O. Metformin administration modulates and restores luteinizing hormone spontaneous episodic secretion and ovarian function in nonobese patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2004;81(1):114-9.
15. Ciampelli M, Fulghesu AM, Cucinelli F, Pavone V, Ronsivalle E, Guido M, et al. Impact of insulin and body mass index on metabolic and endocrine variables in polycystic ovary syndrome. *Metabolism: clinical and experimental*. 1999;48(2):167-72.
16. Unfer V, Carlomagno G, Dante G, Facchinetto F. Effects of myo-inositol in women with PCOS: a systematic review of randomized controlled trials. *Gynecological endocrinology the official journal of the international Society og Gynecological Endocrinology*. 2012;28(7):509-15.
17. Dunaif A. Insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2006;86 Suppl 1:S13-4.
18. Pasquali R, Pelusi C, Ragazzini C, Hasanaj R, Gambineri A. Glucose tolerance, insulin secretion and insulin sensitivity in polycystic ovary syndrome. *Journal of the pancreas*. 2002;3(1):1-7.
19. Xita N, Tsatsoulis A. Review: fetal programming of polycystic ovary syndrome by androgen excess: evidence from experimental, clinical, and genetic association studies. *Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(5):1660-6.
20. Dumescic DA, Richards JS. Ontogeny of the ovary in polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2013;100(1):23-38.
21. Franks S, Berga SL. Does PCOS have developmental origins? *Fertil Steril*. 2012;97(1):2-6.
22. Welt CK, Carmina E. Clinical review: Lifecycle of polycystic ovary syndrome (PCOS): from in utero to menopause. *Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(12):4629-38.
23. de Zegher F, Lopez-Bermejo A, Ibanez L. Adipose tissue expandability and the early origins of PCOS. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2009;20(9):418-23.

24. Escobar-Morreale HF, San Millan JL. Abdominal adiposity and the polycystic ovary syndrome. Trends in endocrinology and metabolism: TEM. 2007;18(7):266-72.
25. Zawadski J, Dunaif A. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome. Towards a rational approach. In: Dunaif A, Givens J, Haseltine F, Merriam G, editors. Polycystic ovary syndrome Current issues in Endocrinology and Metabolism. 4. Boston: Blackwell Scientific; 1992. p. 377 - 84.
26. Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. Hum Reprod. 2004;19:41 - 7.
27. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale H, Futterweit W, et al. Androgen Excess Society. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. J Clin Endocrinol Metab 2006;91:4237 - 45.
28. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. Clin Endocrinol Metab. 2006;91(11):4237-45.
29. Broekmans FJ, Knauff EA, Valkenburg O, Laven JS, Eijkemans MJ, Fauser BC. PCOS according to the Rotterdam consensus criteria: Change in prevalence among WHO-II anovulation and association with metabolic factors. BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology. 2006;113(10):1210-7.
30. Yildiz BO, Bozdag G, Yapici Z, Esinler I, Yarali H. Prevalence, phenotype and cardiometabolic risk of polycystic ovary syndrome under different diagnostic criteria. Human reproduction. 2012;27(10):3067-73.
31. Evidence-based Methodology Workshop on Polycystic Ovary Syndrome December 3–5, 2012 01/03/2014. Available from: http://prevention.nih.gov/workshops/2012/pcos/docs/PCOS_Final_Statement.pdf.
32. Conway G, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Franks S, Gambineri A, et al. The polycystic ovary syndrome: a position statement from the European Society of Endocrinology. European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies. 2014;171(4):P1-29.
33. Genazzani AD, Lanzoni C, Ricchieri F, Baraldi E, Casarosa E, Jasonni VM. Metformin administration is more effective when non-obese patients with polycystic ovary syndrome show both hyperandrogenism and hyperinsulinemia. Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology. 2007;23(3):146-52.
34. Pasquali R, Gambineri A. Insulin-sensitizing agents in polycystic ovary syndrome. European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies. 2006;154(6):763-75.
35. Atiomo WU, Khalid S, Ziauddin A, Tooth D, Layfield R. Framework for a systems approach to proteomic biomarker profiling in polycystic ovary syndrome. Expert review of proteomics. 2009;6(5):469-99.
36. Billings LK, Florez JC. The genetics of type 2 diabetes: what have we learned from GWAS? Annals of the New York Academy of Sciences. 2010;1212:59-77.
37. Kosova G, Scott NM, Niederberger C, Prins GS, Ober C. Genome-wide association study identifies candidate genes for male fertility traits in humans. American journal of human genetics. 2012;90(6):950-61.
38. Swarr DT, Hakonarson H. Unraveling the complex genetic underpinnings of asthma and allergic disorders. Current opinion in allergy and clinical immunology. 2010;10(5):434-42.
39. Van Winkel R, Esquivel G, Kenis G, Wicher M, Collip D, Peerbooms O, et al. REVIEW: Genome-wide findings in schizophrenia and the role of gene-environment interplay. CNS neuroscience & therapeutics. 2010;16(5):e185-92.
40. McCarthy MI. Genomics, type 2 diabetes, and obesity. The New England journal of medicine. 2010;363(24):2339-50.
41. Kosova G, Urbanek M. Genetics of the polycystic ovary syndrome. Molecular and cellular endocrinology. 2013;373(1-2):29-38.
42. Ma X, Fan L, Meng Y, Hou Z, Mao YD, Wang W, et al. Proteomic analysis of human ovaries from normal and polycystic ovarian syndrome. Molecular human reproduction. 2007;13(8):527-35.
43. Insenser M, Escobar-Morreale HF. Application of proteomics to the study of polycystic ovary syndrome. Journal of endocrinological investigation. 2011;34(11):869-75.
44. Gupta S, Ghulmiyyah J, Sharma R, Halabi J, Agarwal A. Power of proteomics in linking oxidative stress and female infertility. BioMed research international. 2014;2014:916212.
45. Wei Q, Galbenus R, Raza A, Cerny RL, Simpson MA. Androgen-stimulated UDP-glucose dehydrogenase expression limits prostate androgen availability without impacting hyaluronan levels. Cancer research. 2009;69(6):2332-9.
46. Escobar-Morreale HF. Iron metabolism and the polycystic ovary syndrome. Trends in endocrinology and metabolism: TEM. 2012;23(10):509-15.
47. Holte J, Bergh T, Berne C, Lithell H. Serum lipoprotein lipid profile in women with the polycystic ovary syndrome: relation to anthropometric, endocrine and metabolic variables. Clinical endocrinology. 1994;41(4):463-71.
48. Legro RS, Blanche P, Krauss RM, Lobo RA. Alterations in low-density lipoprotein and high-density lipoprotein subclasses among Hispanic women with polycystic ovary syndrome: influence of insulin and genetic factors. Fertil Steril. 1999;72(6):990-5.
49. Valkenburg O, Steegers-Theunissen RP, Smedts HP, Dallinga-Thie GM, Fauser BC, Westerveld EH, et al. A more atherogenic serum lipoprotein profile is present in women with polycystic ovary syndrome: a case-control study. Clin Endocrinol Metab. 2008;93(2):470-6.



50. Wild RA, Carmina E, Diamanti-Kandarakis E, Dokras A, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. Assessment of cardiovascular risk and prevention of cardiovascular disease in women with the polycystic ovary syndrome: a consensus statement by the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome (AE-PCOS) Society. *Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(5):2038-49.
51. Sun L, Hu W, Liu Q, Hao Q, Sun B, Zhang Q, et al. Metabonomics reveals plasma metabolic changes and inflammatory marker in polycystic ovary syndrome patients. *J Proteome Res.* 2012;11(5):2937-46.
52. Brewer HB, Jr. Hypertriglyceridemia: changes in the plasma lipoproteins associated with an increased risk of cardiovascular disease. *The American journal of cardiology.* 1999;83(9B):3F-12F.
53. McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *European journal of biochemistry / FEBS.* 1997;244(1):1-14.
54. Corton M, Botella-Carretero JI, Lopez JA, Camafeita E, San Millan JL, Escobar-Morreale HF, et al. Proteomic analysis of human omental adipose tissue in the polycystic ovary syndrome using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Human reproduction.* 2008;23(3):651-61.
55. Murri M, Luque-Ramirez M, Insenser M, Ojeda-Ojeda M, Escobar-Morreale HF. Circulating markers of oxidative stress and polycystic ovary syndrome (PCOS): a systematic review and meta-analysis. *Human reproduction update.* 2013;19(3):268-88.
56. Schachter M, Raziel A, Friedler S, Strassburger D, Bern O, Ron-El R. Insulin resistance in patients with polycystic ovary syndrome is associated with elevated plasma homocysteine. *Human reproduction.* 2003;18(4):721-7.
57. Wijeyaratne CN, Niranthanarakumar K, Balen AH, Barth JH, Sheriff R, Belchetz PE. Plasma homocysteine in polycystic ovary syndrome: does it correlate with insulin resistance and ethnicity? *Clinical endocrinology.* 2004;60(5):560-7.
58. Choi DH, Lee WS, Won M, Park M, Park HO, Kim E, et al. The apolipoprotein A-I level is downregulated in the granulosa cells of patients with polycystic ovary syndrome and affects steroidogenesis. *Journal of proteome research.* 2010;9(9):4329-36.
59. Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, Kotlyarov A, Lutsch G, Ducasse C, et al. Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *The Journal of biological chemistry.* 1999;274(27):18947-56.
60. Escobar-Morreale HF, Luque-Ramirez M, San Millan JL. The molecular-genetic basis of functional hyperandrogenism and the polycystic ovary syndrome. *Endocrine reviews.* 2005;26(2):251-82.
61. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *The New England journal of medicine.* 1999;340(6):448-54.
62. Insenser M, Martinez-Garcia MA, Montes R, San-Millan JL, Escobar-Morreale HF. Proteomic analysis of plasma in the polycystic ovary syndrome identifies novel markers involved in iron metabolism, acute-phase response, and inflammation. *Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(8):3863-70.
63. Kawano Y, Narahara H, Miyamura K, Mifune K, Miyakawa I. Inhibitory effect of transferrin on progesterone production in the granulosa cell of humans in vivo and porcine granulosa cell in vitro. *Gynecologic and obstetric investigation.* 1995;40(1):1-4.
64. Gonzalez F, Kirwan JP, Rote NS, Minium J. Elevated circulating levels of tissue factor in polycystic ovary syndrome. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis.* 2013;19(1):66-72.
65. Lindholm A, Bixo M, Eliasson M, Hudecova M, Arnadottir R, Holte J, et al. Tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor 1 in obese and lean patients with polycystic ovary syndrome. *Gynecological endocrinology: the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology.* 2010;26(10):743-8.
66. Yildiz BO, Haznedaroglu IC, Kirazli S, Bayraktar M. Global fibrinolytic capacity is decreased in polycystic ovary syndrome, suggesting a prothrombotic state. *Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(8):3871-5.
67. Manneras-Holm L, Baghaei F, Holm G, Janson PO, Ohlsson C, Lonn M, et al. Coagulation and fibrinolytic disturbances in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(4):1068-76.
68. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes.* 2003;52(1):1-8.
69. Gonzalez F, Nair KS, Daniels JK, Basal E, Schimke JM, Blair HE. Hyperandrogenism sensitizes leukocytes to hyperglycemia to promote oxidative stress in lean reproductive-age women. *Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(8):2836-43.
70. Ott J, Wattar L, Kurz C, Seemann R, Huber JC, Mayerhofer K, et al. Parameters for calcium metabolism in women with polycystic ovary syndrome who undergo clomiphene citrate stimulation: a prospective cohort study. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies.* 2012;166(5):897-902.
71. Ranjzad F, Mahban A, Shemirani AI, Mahmoudi T, Vahedi M, Nikzamir A, et al. Influence of gene variants related to calcium homeostasis on biochemical parameters of women with polycystic ovary syndrome. *Journal of assisted reproduction and genetics.* 2011;28(3):225-32.
72. Thys-Jacobs S, Donovan D, Papadopoulos A, Sarrel P, Bilezikian JP. Vitamin D and calcium dysregulation in the polycystic ovarian syndrome. *Steroids.* 1999;64(6):430-5.
73. Monastyrskaya K, Babiychuk EB, Draeger A. The annexins: spatial and temporal coordination of signaling events during cellular stress. *Cellular and molecular life sciences: CMLS.* 2009;66(16):2623-42.

74. Shi Y, Zhao H, Shi Y, Cao Y, Yang D, Li Z, et al. Genome-wide association study identifies eight new risk loci for polycystic ovary syndrome. *Nature genetics*. 2012;44(9):1020-5.
75. Wang S, Alvero R. Racial and ethnic differences in physiology and clinical symptoms of polycystic ovary syndrome. *Seminars in reproductive medicine*. 2013;31(5):365-9.
76. Ladson G, Dodson WC, Sweet SD, Archibong AE, Kunselman AR, Demers LM, et al. Racial influence on the polycystic ovary syndrome phenotype: a black and white case-control study. *Fertil Steril*. 2011;96(1):224-9 e2.
77. Legro RS, Myers ER, Barnhart HX, Carson SA, Diamond MP, Carr BR, et al. The Pregnancy in Polycystic Ovary Syndrome study: baseline characteristics of the randomized cohort including racial effects. *Fertil Steril*. 2006;86(4):914-33.
78. Hillman JK, Johnson LN, Limaye M, Feldman RA, Sammel M, Dokras A. Black women with polycystic ovary syndrome (PCOS) have increased risk for metabolic syndrome and cardiovascular disease compared with white women with PCOS [corrected]. *Fertil Steril*. 2014;101(2):530-5.
79. Dilbaz B, Cinar M, Ozkaya E, Tonyali NV, Dilbaz S. Health related quality of life among different PCOS phenotypes of infertile women. *Journal of the Turkish German Gynecological Association*. 2012;13(4):247-52.
80. Jones H, Sprung VS, Pugh CJ, Daousi C, Irwin A, Aziz N, et al. Polycystic ovary syndrome with hyperandrogenism is characterized by an increased risk of hepatic steatosis compared to nonhyperandrogenic PCOS phenotypes and healthy controls, independent of obesity and insulin resistance. *Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(10):3709-16.
81. Kar S. Anthropometric, clinical, and metabolic comparisons of the four Rotterdam PCOS phenotypes: A prospective study of PCOS women. *Journal of human reproductive sciences*. 2013;6(3):194-200.
82. Palomba S, Falbo A, Chiossi G, Tolino A, Tucci L, La Sala GB, et al. Early trophoblast invasion and placentation in women with different PCOS phenotypes. *Reproductive biomedicine online*. 2014;29(3):370-81.
83. Shroff R, Syrop CH, Davis W, Van Voorhis BJ, Dokras A. Risk of metabolic complications in the new PCOS phenotypes based on the Rotterdam criteria. *Fertil Steril*. 2007;88(5):1389-95.
84. Vaggopoulos V, Trakakis E, Chrelias C, Panagopoulos P, Basios G, Makridima S, et al. Comparing classic and newer phenotypes in Greek PCOS women: the prevalence of metabolic syndrome and their association with insulin resistance. *J Endocrinol Invest*. 2013;36(7):478-84.