

## Tesis de Posgrado

# Regulación de la síntesis de ADN en células de la granulosa de rata cultivadas en medio definido

Bley, Miguel Andrés

1995

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias  
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Bley, Miguel Andrés. (1995). Regulación de la síntesis de ADN en células de la granulosa de rata cultivadas en medio definido. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2759\\_Bley.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2759_Bley.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Bley, Miguel Andrés. "Regulación de la síntesis de ADN en células de la granulosa de rata cultivadas en medio definido". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2759\\_Bley.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2759_Bley.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**REGULACION DE LA SINTESIS DE ADN EN  
CELULAS DE LA GRANULOSA DE RATA  
CULTIVADAS EN MEDIO DEFINIDO**

**Autor: Lic. Miguel A. Bley**

**Director: Dr. José Lino S. Barañao**

**Tesis presentada para optar al título de  
Doctor en Ciencias Químicas**

**1995**

*Handwritten:*  
Folio 2  
2759  
Bley

**INSTITUTO DE MEDICINA Y BIOLOGIA EXPERIMENTAL**  
Vta. de Obligado 2490 - Buenos Aires, Argentina

*A Caro,*

*Lucía, Nathalie y Manuela*

## AGRADEZCO

A Lino, especialmente.

A Julio.

A Pato.

A Silvia.

A Tomás.

A Omar.

A Eduardo.

A Leonardo.

A Saul y a Daniel.

A Pantoja, a Yolanda y a Hilda.

A Marcelo y a Ricardo.

A Mary y a María Laura.

A Ale.

A Guille.

A los Segura: a Marce, a Fabián, a Andrés, a Rubén y a Jorge.

A los Baldi: a Silvia, a Alejandro, a Nestor, a Ethel y a Karina.

A los Tezones: a Jorge, a Pablo y Patricias.

A las Patis: a Leonora.

A los Tesones: a Sully, a Paula y a Hernán.

A Isabel.

A Albertito, a Viviana, a Mercedes, a Alvaro y a Omar.

A Facundo.

A Mespi.

A Rahel, a Heinz, a Elisa y a Louis. A Caro, a Lucía, a Nathalie y a Manuela, a quienes dedico esta tesis.

A todos aquellos que contribuyeron de un modo u otro a que esta tesis hoy sea una realidad.

## ABREVIATURAS

(Bu) <sub>2</sub> AMPc	dibutilil adenosín monofosfato cíclico
[ <sup>3</sup> H]- timidina	timidina tritiada
ADN	ácido desoxirribinucleico
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
cpm	cuentas por minuto
DES	dietilestilbestrol
DHT	17β-hidroxi-5α-androstan-3-ona
D-MEM	medio Eagle modificado Dulbecco
ED <sub>50</sub>	dosis efectiva 50
EGF	factor de crecimiento epidérmico
EGTA	ácido etilén-glicol-bis(β-aminoetil éter)tetraacético
ES	error estandar
FGF	factor de crecimiento de fibroblastos
FRP	proteínas regulatorias foliculares
FSH	hormona folículo estimulante
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)1-piperazin etansulfónico
IGF-BP	proteína ligadora de IGF
IGF-I	factor de crecimiento simil insulina de tipo I
IGF-II	factor de crecimiento simil insulina de tipo II
KD	kilodalton
LH	hormona luteinizante
MAP quinasa	proteína quinasa activada por mitógeno
MCTI	medio condicionado por células tecales/intersticiales
MIX	3-isobutil-1-metil xantina
MPA	acetato de medroxi progesterona

oFSH-16	FSH ovina estandar 16 (NIDDK)
oFSH-17	FSH ovina estandar 17 (NIDDK)
OMI	inhibidor de la maduración del ovocito
PAF	factor activador de plaquetas
PBS	buffer fosfato salino
PMSG	gonadotrofina sérica de yegua preñada
PPO	2,5-difenil oxazol
T <sub>4</sub>	3,5,3'5'-tetraiodotironina
TCA	ácido tricloroacético
TGF $\alpha$	factor de crecimiento transformante de tipo $\alpha$
TGF $\beta$	factor de crecimiento transformante de tipo $\beta$
TSH	hormona tiroide estimulante
UV	ultravioleta

***INDICE***

<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
Sinopsis histórica.....	2
Desarrollo y selección folicular.....	5
Regulación hormonal intraovárica.....	8
Crecimiento folicular: gonadotrofinas y estrógenos.....	12
Reguladores paracrinos y autocrinos.....	14
Factores mitogénicos y de crecimiento.....	17
Insulina e IGF-I.....	17
EGF y TGF $\alpha$ .....	21
TGF $\beta$ y factores relacionados.....	23
El modelo experimental.....	25
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>29</b>
Animales.....	30
Tratamiento con DES.....	30
Preparación de colágeno.....	30
Aislamiento y cultivo de células ováricas.....	31
Obtención de células de la granulosa.....	31
Purificación por centrifugación sobre colchón de Percol.....	33
Obtención de subpoblaciones de células de la granulosa.....	34
Obtención de células tecaes/intersticiales.....	35
Medios condicionados por células tecaes/intersticiales.....	35
Medidas de síntesis de la ADN.....	36
Incorporación de [ $^3\text{H}$ ].....	36

Indice de marcación de núcleos.....	37
Análisis estadístico.....	38
<b>CAPITULO 1.....</b>	<b>39</b>
Los estrógenos y el crecimiento folicular.....	40
Resultados.....	42
Efecto del tratamiento con estrógenos <i>in vivo</i> sobre el número de células de la granulosa ováricas.....	42
Efecto del tratamiento con estrógenos sobre la síntesis de ADN de las células de la granulosa estimulada por insulina.....	42
Efecto del tiempo de tratamiento con estrógenos <i>in vivo</i> sobre la inducción de la respuesta a insulina.....	47
El medio condicionado por células tecales/intersticiales (MCTI) estimula la síntesis de ADN de las células de la granulosa y el estradiol potencia su efecto.....	47
La purificación de las células de la granulosa modifica su respuesta a estradiol.....	53
Efecto del tratamiento estrogénico <i>in vivo</i> sobre la respuesta al MCTI ....	55
El MCTI y la insulina estimulan la proliferación de las células de la granulosa.....	55
Conclusiones.....	59
<b>CAPITULO 2.....</b>	<b>64</b>
Las gonadotrofinas y el crecimiento folicular.....	65

Resultados.....	67
La insulina y el IGF-I estimulan la síntesis de ADN y su efecto se ve amplificado por MIX.....	67
Acción de AMPc.....	69
Acción de FSH.....	72
La densidad celular afecta la interacción entre FSH e IGF-I.....	75
Conclusiones.....	78
<b>CAPITULO 3</b> .....	85
Acción concertada de gonadotrofinas y esteroides.....	86
Resultados.....	87
Interacción entre FSH y estradiol: Curvas de tiempo.....	87
Interacción entre FSH y otros esteroides sexuales.....	89
Efecto de andrógenos aromatizables.....	89
Efecto de andrógenos 5 $\alpha$ -reducidos.....	89
Efecto de progestágenos.....	93
Interacción de FSH con andrógenos: bloqueo de receptores.....	93
Acción de AMPc.....	97
Similitud de la respuesta a hormonas proteicas y esteroides.....	97
Respuesta de diferentes subpoblaciones de células de la granulosa.....	98
Conclusiones.....	103
<b>CONCLUSION FINAL</b> .....	109
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	112

# ***INTRODUCCION***

## **SINOPSIS HISTORICA**

La función primaria del folículo ovárico de mamíferos es la liberación de un ovocito capaz de ser fertilizado. Este proceso involucra el crecimiento y la maduración del folículo, al igual que el crecimiento, la ovulación y la división meiótica del ovocito.

La descripción del folículo ovárico, inicialmente confundido con el propio ovocito, fue hecha en 1672 por Regnier de Graaf (1). La designación de los folículos preovulatorios maduros como folículos de Graaf deriva pues, del nombre de su descubridor. No fue hasta 155 años después, en 1827, que Karl Ernst von Baer descubrió que el huevo de los mamíferos, a diferencia del huevo de las aves o de los anfibios, constituía una muy pequeña parte de toda la estructura folicular (1). Estudios histológicos identificaron tres tipos celulares principales: el ovocito, la membrana granulosa y la teca.

A comienzos de este siglo tanto las gónadas como la hipófisis fueron reconocidas como órganos de secreción interna (1). De este modo, el sistema reproductor fue identificado como un sistema endocrino en el cual hormonas secretadas por un tejido son transportadas por la sangre ejerciendo su acción sobre un órgano blanco distante y modificando su actividad. Los efectos de la hipofisectomía y de la ovariectomía condujeron al concepto de eje hipofisario-gonadal, controlado por un mecanismo de regulación por retroalimentación o "feedback" (2,3).

La presencia de actividades hormonales en el suero, la orina y extractos de ovario e hipófisis estimularon a numerosos investigadores a aislar, purificar y caracterizar sus entidades moleculares (2,3). Basados en sus efectos sobre la actividad folicular, las hormonas gonadotróficas producidas por la hipófisis se denominaron hormona foliculo-estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH). Las primeras hormonas esteroideas, derivadas del colesterol, fueron llamadas estradiol y progesterona (4-6).

Investigadores de los años '60 y '70 armados con hormonas purificadas e isótopos radiactivos se abocaron a la cuantificación directa de estas hormonas en fluidos biológicos, aprovechando el desarrollo de las técnicas de radioinmunoensayo. De esta manera, fueron capaces de medir directamente las hormonas en el suero y así determinar que la ovulación de los folículos de Graaf maduros está inmediatamente precedida por picos de concentración sérica de FSH y de LH (7-10). Otros estudios revelaron que la liberación de las gonadotrofinas no sólo está regulada por mecanismos de "feedback" positivo y negativo, involucrando la acción de hormonas esteroideas ováricas sobre el eje hipotálamo-hipofisario (11), sino que también está modificada por los ritmos circadianos y estacionales (10-14). Sin embargo, la medición de gonadotrofinas en el suero no revelaba los sitios de acción, ni los mecanismos por los cuales estas hormonas actúan sobre el folículo ovárico para estimular su maduración.

Ensayos de unión específica realizados utilizando gonadotrofinas radioiodinadas en ovario y estradiol tritiado en útero proveyeron las primeras evidencias de la presencia de componentes presentes en las células blanco capaces de retener selectivamente a estas hormonas. El término "receptor" irrumpió en la escena del endocrinólogo para describir los sitios de unión específica de las hormonas y los

estudios revelaron la presencia, en la membrana plasmática, de receptores de las gonadotrofinas. Se observó que la FSH y la LH ejercen su acción principalmente estimulando la actividad de adenilato ciclasa y consiguientemente la producción de AMPc. Luego se demostró que las hormonas proteicas pueden ser internalizadas por la célula blanco, implicando nuevos posibles mecanismos de acción hormonal sobre la función celular. También los receptores de las hormonas esteroideas, estrogénicas y androgénicas, fueron identificados en células ováricas.

Hoy conocemos en buena medida sus mecanismos de regulación y las técnicas bioquímicas y de biología molecular han permitido su aislamiento, purificación, clonado y secuenciamiento. Sin embargo, si bien los mecanismos por los cuales las hormonas esteroideas regulan la actividad genómica han sido revelados en gran medida, las proteínas y macromoléculas específicas controladas por la acción de estrógenos y andrógenos en el ovario han sido identificadas en forma muy parcial.

## **DESARROLLO Y SELECCION FOLICULAR**

Las gónadas se desarrollan a partir de la parte ventral craneal del mesonefros. Durante el desarrollo temprano de la gonada femenina una cohorte de células *germinales* primordiales en activa proliferación migra hacia el epitelio celómico y el tejido mesenquimático que cubre el mesonefros (15,16). Durante un intervalo previo al nacimiento y por medio de señales aún no conocidas, la actividad mitótica cesa y las células germinales entran en la profase de la primera división meiótica. Estos ovocitos primarios permanecen arrestados en la profase meiótica hasta que, o bien degeneran (aproximadamente el 99% de ellos), o bien son liberados en la ovulación (15). De este modo, el ovario postnatal de los mamíferos contiene una gran población de folículos que no proliferan.

En un estadio posterior de la diferenciación de la gonada, aproximadamente cuando los ovocitos entran en la meiosis, las células de la granulosa, provenientes de la rete ovarii y del epitelio superficial se organizan alrededor de los ovocitos primarios (16). Las unidades resultantes forman una población de folículos pequeños que residen en el ovario hasta que cierta señal dispara su crecimiento. El crecimiento de cada folículo comienza, aparentemente, con un aumento de tamaño del ovocito primario, aún en profase meiótica, con la proliferación de las células de la granulosa que rodean al ovocito, y con la organización de las células de la teca que formarán la teca externa (15).

La edad en la que se inicia el crecimiento folicular depende de la especie. En mamíferos grandes (oveja, vaca, mono, humano) ocurre durante la vida fetal; en mamíferos más pequeños (hamster, ratón, rata, hurón, conejo) ocurre durante el

período perinatal (15). Los factores hormonales y/o locales que regulan estos eventos tempranos no son conocidos. Sin embargo, una vez que comienza, el crecimiento folicular continúa a lo largo de toda la vida fértil, independientemente del estado fisiológico del animal y de las fases del ciclo estral (17); aún durante la preñez (18) y en animales hipofisectomizados (19).

El número de folículos que comenzarán a crecer cada día varía a lo largo de la vida y parecería estar ligado al número de folículos presentes en la población de folículos que aún no han iniciado su crecimiento (folículos arrestados) (20). Cuanto más grande sea esta población, mayor es el número de folículos que comenzarán a crecer. Con la edad, y a medida que los folículos abandonan la población de folículos arrestados, el número de estos folículos disminuye drásticamente y finalmente se agota. Esta reducción se asocia con el número de los folículos que comienzan a crecer y eventualmente ovulan (15,16). Por ejemplo, el ovario de ratón contiene aproximadamente 11.000 ovocitos en el momento de nacer (16). A los 30 días de edad han desaparecido unos 5.800. Del resto, la mayoría degenera y otros comienzan a crecer abandonando así la población de folículos arrestados. Entre los 30 y los 60 días unos 800 pequeños folículos comienzan a crecer, y entre los 570 y los 600 días solo 30 folículos inician su crecimiento, pero el tamaño de la población de folículos arrestados no parece ser la única condición que controla el número de folículos que comienzan a crecer. Factores hormonales también estarían regulando este proceso.

Los resultados de estudios realizados tratando ratones *in vivo* con PMSG (21) y con explantes de ovarios de ratón y hamster mantenidos en cultivo en presencia de FSH (22), indican que en los primeros cinco días posteriores al nacimiento, el tratamiento aumenta el número de folículos que proliferan.

Por otro lado, la administración de esteroides o suero inmune anti-FSH o LH disminuye los niveles circulantes de gonadotrofinas e inhibe el crecimiento folicular reduciendo el número de folículos antrales pequeños en ratas inmaduras (23).

Además, el fluido folicular de folículos maduros inyectado en ratones neonatos reduce marcadamente la iniciación del crecimiento folicular (15), indicando que existen otros factores que estarían regulando el número de folículos que comienzan a crecer.

Del total de folículos presentes inicialmente en el ovario, sólo unos pocos alcanzan los estadios finales de la maduración. En la rata adulta la mayoría de los folículos que inician su crecimiento, crecen continuamente hasta el estadio de pequeños folículos antrales y luego degeneran (24).

Los folículos en crecimiento están expuestos a tres o más picos de gonadotrofinas consecutivos. Se ha propuesto que los picos de gonadotrofinas del ciclo que precede a la ovulación seleccionan de la población de folículos preantrales a aquellos que ovularán en el proestro del ciclo siguiente (25-27).

El proceso hormonal que determina cuáles folículos finalmente ovularán involucra, aparentemente, mecanismos de retroalimentación entre secreciones ováricas e hipofisarias, que actúan sobre un continuo de folículos en crecimiento, en diferentes estadios de desarrollo y caracterizados por una sensibilidad específica a los factores actuantes (11,25,28,29,30).

## REGULACION HORMONAL INTRAOVARICA

A comienzos de este siglo se detectaron esteroides con actividad estrogénica en el fluido folicular (4,5). Inmediatamente se planteó la pregunta sobre qué tipo *celular* era responsable de la biosíntesis de los estrógenos en el ovario.

Los primeros estudios, hechos en rata y en humanos, involucraron cuatro tejidos: la membrana granulosa, la teca interna, las células intersticiales y el cuerpo lúteo (31).

Sobre la base de observaciones indirectas, tales como el gran desarrollo de la membrana de células de la teca, acompañada de una elevada actividad estrogénica del ovario, la teca fue considerada por la mayoría, como la fuente principal de estrógenos foliculares (31).

Los estudios de Falck, a fines de los '50 (31), ofrecieron la primera evidencia de que la biosíntesis ovárica de estrógenos requiere de la interacción de al menos dos tipos celulares. Falck aisló células de la granulosa, de la teca, intersticiales y luteales y las autotransplantó, solas y combinándolas, a la cámara ocular de ratas ovariectomizadas. Evaluó la producción de estrógenos examinando la apariencia histológica del tejido vaginal que fue cotransplantado en las proximidades de las células ováricas.

Los resultados indicaron que sólo había actividad estrogénica cuando se cotransplantaban células tecaes o intersticiales con células de la granulosa o luteales, o al transplantar folículos intactos.

Falck concluyó que era necesaria una interacción entre células tecales o intersticiales con células de la granulosa o luteales para la biosíntesis de estrógenos. Si bien no postuló un mecanismo, sugirió la existencia de un sistema *en el* que las células de la granulosa (o luteales) podrían estar contribuyendo a la producción de estrógenos por parte de las células de la teca, sin atreverse a contradecir el dogma predominante.

Algunos años más tarde, estudios con células de la granulosa en cultivo (32-39) dieron las primeras evidencias bioquímicas directas de que las células de la granulosa convierten testosterona y androstenodiona en estradiol, pero no son capaces de sintetizar andrógenos a partir de pregnenolona o progesterona en todas las especies estudiadas, con la aparente excepción de los bovinos (40).

De este modo quedó establecido que las células de la granulosa poseen un activo sistema de aromatización y por lo tanto, con sustratos adecuados, son capaces de completar la biosíntesis de estrógenos.

La evidencia de que las células de la teca son la principal fuente de andrógenos se obtuvo de estudios realizados en conejo (41), rata (42), oveja (38) y humano (43).

La demostración de que anticuerpos antitestosterona, infundidos en la arteria ovárica de la oveja, inhiben la producción de estrógenos estimulada por LH, proveyó una prueba *in vivo* que apoyaba la teoría de las "dos células" (44).

La hipótesis original propuesta por Falck (31), luego modificada por Bjersing y Carstensen (34,45) y Armstrong y Dorrington (32), establece que los andrógenos producidos y liberados por un tipo celular (las células de la teca) difunden para ser aromatizados a estradiol por otro tipo celular (las células de la granulosa).

Los estudios con células ováricas *in vitro* permitieron profundizar el conocimiento de la regulación hormonal de la esteroidogénesis. Se demostró que la FSH, en presencia de testosterona, estimula la producción de estradiol por las células de la granulosa, sugiriendo un efecto gonadotrópico sobre la actividad aromatasa (35,46). Estas observaciones se vieron reforzadas por resultados obtenidos *in vivo*, según los cuales, ratas inmaduras hipofisectomizadas, tratadas con FSH, aumentaban el contenido intraovárico de estradiol en presencia de testosterona, pero no lo hacían en presencia de un andrógeno no aromatizable como la 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT) (33).

Otros estudios mostraron que la testosterona o la DHT *per se* aumentan la producción de progesterona de células de la granulosa *in vitro*, aisladas de folículos preantrales de ratas inmaduras, tratadas *in vivo* con estrógenos (47,48).

El efecto androgénico pudo suprimirse en presencia de un antiandrógeno, como de acetato de ciproterona, que compite con los andrógenos por la unión a sus receptores (48). Esta observación indicaría que la estimulación androgénica de la producción de progesterona por las células de la granulosa es un evento mediado por receptor. Estos estudios constituyeron la primera demostración de la interacción entre las hormonas esteroideas y las gonadotrofinas sobre la regulación de la esteroidogénesis de las células de la granulosa.

La evidencia bioquímica de que dos tipos celulares (las células de la granulosa y las de la teca) son necesarios para la producción de estradiol, estableció una base celular y molecular para explicar los efectos sinérgicos de LH y FSH sobre la estimulación del crecimiento de los folículos preovulatorios.

Los folículos preovulatorios parecen necesitar un aumento de la síntesis de estradiol para su crecimiento, que dependería del aumento de la sensibilidad de las células tecales a LH y del aumento de la producción de andrógenos derivados de ellas. De este modo las células tecales contribuirían de un modo fundamental a las condiciones que posibilitan el crecimiento folicular.

La cuantificación de los sitios de unión específica presentes en células ováricas aisladas permitió formular el concepto de que la capacidad de respuesta de los folículos ováricos no sólo depende de la variación de las concentraciones séricas de gonadotrofinas, sino también de cambios del contenido celular de sitios de unión a estas hormonas.

Ya que los distintos folículos en el ovario en un momento dado parecen tener una sensibilidad diferencial a las gonadotrofinas, el estado de maduración del folículo y el grado de diferenciación de sus células determinarían cuáles serán los folículos seleccionados para ovular.

## CRECIMIENTO FOLICULAR: GONADOTROFINAS Y ESTROGENOS

En las décadas de 1930 y 1940 quedó establecido que el estradiol aumenta la respuesta ovárica a las gonadotrofinas *in vivo* (49-51). En los '60 se demostró una *acción directa* del estradiol y la localización de la unión del estradiol en el ovario (52). A comienzo de los '70, se reveló la localización intraovárica específica de la FSH por autorradiografía (53). En esa época Goldemberg y col. reexaminaron la función de los estrógenos y demostraron que el tratamiento prolongado de ratas hipofisectomizadas con un estrógeno sintético, el dietilestilbestrol (DES), aumenta la incorporación ovárica de FSH tritiada *in vivo* (54,55).

La identificación y cuantificación de la unión del estradiol al núcleo de las células de la granulosa fortaleció la evidencia de que las células de la granulosa son un blanco intraovárico de los estrógenos (56).

Se observó que el estradiol incrementa la proliferación de las células de la granulosa *in vivo* (55,57). Este efecto fue medido como contenido de ADN de células de la granulosa aisladas y como porcentaje de células marcadas observadas por autorradiografía después de administrar [<sup>3</sup>H]-timidina *in vivo* (57). Sin embargo, aún en presencia continua de estradiol, la proliferación de las células de la granulosa no es sostenida, pues el índice de marcación disminuye y el contenido de ADN se estabiliza (57).

Se examinó la interacción entre FSH y estradiol sobre la proliferación de las células de la granulosa, tratando secuencialmente ratas hipofisectomizadas con estradiol y con FSH. Al administrar FSH a ratas tratadas con estradiol se observó un nuevo ciclo de actividad proliferativa. Sin embargo esta fase proliferativa

tampoco se sostuvo (57). De esta manera, cada hormona, actuando probablemente a través de mecanismos intracelulares diferentes, presenta una capacidad específica pero limitada de producir una respuesta proliferativa en las células de la granulosa.

Se han reportado numerosos factores aislados del suero que presentan una marcada actividad proliferativa sobre las células de la granulosa en cultivo (58), pero no hay duda de que se requiere la estimulación de diferentes hormonas específicas en los distintos estadios de desarrollo para permitir el crecimiento folicular.

## REGULADORES PARACRINOS Y AUTOCRINOS

Los estadios más tempranos del crecimiento folicular son aparentemente independientes de las gonadotrofinas circulantes (59). Por ello, se asume que la *iniciación* del crecimiento folicular está regulada por factores ováricos autocrinos y paracrinis. Aún después de la formación del antro, cuando el desarrollo folicular depende de las gonadotrofinas y de los estrógenos, es poco probable que todos los aspectos del crecimiento y la selección folicular dependan exclusivamente de estas hormonas.

Según Sharpe (60) la definición de hormona intragonadal implica:

- a) Producción de la hormona dentro de la gónada.
- b) Receptores de la hormona presentes en la gónada.
- c) Acción biológica dentro de la gónada.

Idealmente, sólo aquellas moléculas que cumplan los tres criterios pueden considerarse hormonas intragonadales. Sin embargo, hasta el presente, la mayoría de las hormonas no esteroideas consideradas reguladores paracrinis o autocrinis de la función ovárica no resisten una evaluación rigurosa según estos tres criterios.

En la mayoría de los casos, estas hormonas no han sido químicamente caracterizadas y, por lo tanto, no se han podido realizar estudios de unión a receptores ni se ha obtenido evidencia certera de su producción local. Más aún, su función gonadal se ha deducido en unos pocos casos de modelos *in vivo* y en la mayoría de los casos de modelos *in vitro*, que no necesariamente representan

la situación fisiológica. Localmente, son producidos en muy pequeñas cantidades y en algunos casos están sujetos a una rápida degradación. Aparentemente actuarían en conjunción con las gonadotrofinas y esteroides, asumiendo una función moduladora. De esta manera su acción dependería estrechamente del estado fisiológico o endocrino del ovario.

Comparados con las gonadotrofinas y esteroides, que podrían considerarse como "macroreguladores" de la función ovárica, los factores paracrinos y autocrinos estarían involucrados en lo que podríamos llamar la "sintonía fina" del sistema regulatorio. Estos factores, que son encontrados en el ovario sin evidencias de tener un origen extraovárico y que ejercen un efecto biológico demostrado en el ovario *in situ* o *in vitro*, o en preparaciones de células ováricas *in vitro*, pertenecen a un grupo heterogéneo de sustancias: aminas, péptidos, esteroides, eicosanoides. Algunas están químicamente caracterizadas y son producidas también fuera del ovario. Por ejemplo a este grupo pertenecen los esteroides, eicosanoides (prostaglandinas, hidroperóxidos), factor activador de plaquetas (PAF), oxitocina, vasopresina y péptidos derivados de la proopiomelanocortina.

Otro grupo está constituido por los factores ováricos que ejercen una respuesta biológica en el tejido ovárico, pero que aún se encuentran en proceso de caracterización y purificación, como las proteínas regulatorias foliculares (FRP); el inhibidor de la maduración del ovocito (OMI), los inhibidores de la unión de LH y FSH (LH-BI;FSH-BI), el inhibidor de la luteinización (LI) y el estimulador de la luteinización (LS) (61). Debido a que aún no se conoce su naturaleza química, algunos de estos factores podrían resultar similares o idénticos a otras moléculas ya caracterizadas, y algunas actividades diferentes podrían corresponder a la misma molécula.

Dadas sus características biológicas, la purificación de estos factores se está llevando a cabo muy lentamente debido en parte a la naturaleza intrínseca de los mismos y en parte a la ausencia de procedimientos de purificación sensibles y de ensayos de monitoreo adecuados. Además, la ausencia de preparaciones y ensayos estandarizados dificultan enormemente la comparación de los resultados de diferentes grupos de investigación. Por otro lado, las fuentes de estos posibles factores reguladores intraováricos (fluido folicular, extractos ováricos y medios condicionados de cultivos de células) son complejas y variables según de las condiciones fisiológicas y endocrinas, imponiendo una alta exigencia al método de purificación.

Debido a estas dificultades, la investigación de estos factores ha experimentado un avance relativamente lento, en comparación con el creciente número de factores de crecimiento, caracterizados en otros sistemas celulares.

## FACTORES MITOGENICOS Y DE CRECIMIENTO

En los últimos años, gran cantidad de esfuerzos se han orientado hacia la investigación de actividades mitogénicas ováricas, diferentes de las de las gonadotrofinas y los esteroides y se ha descrito la acción de numerosos factores de crecimiento polipeptídicos sobre células ováricas *in vivo* e *in vitro*.

### Insulina e IGF

La insulina regula un amplio espectro de procesos metabólicos *in vivo*, a través de mecanismos aún no totalmente dilucidados. Además de sus conocidos efectos sobre el metabolismo, la insulina estimula el crecimiento y la proliferación de diversos tipos celulares *in vitro* y hay evidencias que sugieren que la insulina es un importante regulador del crecimiento *in vivo* (62).

A comienzos de los años 20, Gey describió efectos positivos de la insulina sobre la proliferación de fibroblastos, constituyendo la primera observación de la acción mitogénica de esta hormona *in vitro* (62). Desde entonces, la insulina ha sido utilizada en la mayoría de los sistemas para suplementar o reemplazar al suero, con el fin de optimizar el crecimiento celular en cultivos prolongados (63,64).

La insulina interactúa sinérgicamente con otras hormonas y factores de crecimiento como FGF, EGF, ésteres de forbol, etc., estimulando la progresión a través del ciclo celular de células que han sido arrestadas en fase G<sub>0</sub> del ciclo por privación de suero o de nutrientes esenciales como los fosfatos (62).

La insulina y el IGF-I son estructuralmente similares: las posiciones 1 a 29 de la molécula de IGF-I son homólogas a las de la subunidad  $\beta$  de la insulina; las posiciones 42 a 62 son homólogas a las de la subunidad  $\alpha$  y la estructuras tridimensionales de ambos péptidos son virtualmente idénticas (65,66). Sendos receptores presentan también una gran homología mutua (67): ambos son heterotetrámeros, que constan de dos subunidades  $\alpha$  (de 130KD) y dos subunidades  $\beta$  (de 90KD). Las subunidades  $\alpha$  contienen el sitio de unión a la hormona, mientras que las subunidades  $\beta$  sufren autofosforilación en residuos tirosina (actividad de tirosina quinasa).

La insulina se une a los receptores de IGF-I, aunque con una afinidad menor que la que tiene por su propio receptor y no parece tener una afinidad significativa por los receptores de IGF-II (62). Si bien la insulina es estructuralmente similar al IGF-II, sus receptores no lo son.

En ciertos tipos celulares, como por ejemplo fibroblastos de epitelio humano, los efectos mitogénicos de la insulina parecen estar mediados, principalmente por su interacción de baja afinidad con receptores de IGF-I. En hepatocitos, células de hepatoma, de tumores mamarios y de tumores adrenocorticales, la acción mitogénica de la insulina estaría mediada por la interacción con sus propios receptores de alta afinidad. El mecanismo por el cual la unión de insulina a sus receptores y la activación de la actividad de tirosina quinasa controlan las reacciones de fosforilación y desfosforilación de proteínas y el modo en que estos eventos estimulan el pasaje de las células a través de la fase S del ciclo celular, aún no han sido totalmente establecidos (62).

Los primeros trabajos que estudian el efecto de insulina sobre cultivos de células de la granulosa en medio definido fueron realizados por Channing y col. y demuestran que la insulina modifica la morfología y la viabilidad de los cultivos de células de la granulosa porcinas (68).

Savion y col. demostraron que la insulina y el IGF-I estimulan la proliferación de las células de la granulosa bovinas en cultivo (69).

May y Schomberg demostraron que si bien la insulina no tiene un efecto sobre el crecimiento en la fase temprana del cultivo, estimula dramáticamente la proliferación y el mantenimiento de la monocapa de las células de la granulosa porcinas en una fase tardía. Asimismo observaron un efecto diferencial dependiente de la densidad de plaqueo (70).

Debido a que las células de la granulosa tienen un contacto limitado con la circulación, la hipótesis de que la insulina o el IGF-I afectan la diferenciación y la proliferación de las células ováricas adquirió relevancia fisiológica al demostrarse que estos péptidos tienen acceso a las células de la granulosa *in vivo*.

Diamond y col. demostraron la presencia de insulina en fluido folicular humano y una correlación positiva entre su concentración y los niveles de progesterona detectados (71).

Hammond y col. demostraron que las células de la granulosa porcinas producen IGF-I e IGF-BPs *in vitro*, sugiriendo que el ovario produce IGF-I *in vivo* (72). Esta posibilidad se vió apoyada por el hecho de que los niveles de IGF-I en el

fluido folicular de folículos preovulatorios son significativamente mayores que los presentes en suero o en folículos inmaduros (72).

Hay gran cantidad de información que sugiere la existencia de un sistema IGF *intraovárico* en el que el ovario es un sitio de producción, recepción y acción del IGF-I (65), y en este sentido este factor es, de todos los descritos hasta ahora, el que mejor se ajusta a los criterios que definen a una hormona intragonadal (60).

Se ha establecido claramente en varias especies, que el ovario es un sitio de expresión de IGF-I (73-78). De todos los órganos de rata adulta examinados, el ovario presenta el mayor nivel de expresión de IGF-I después del útero y del hígado (78).

Estudios de localización celular, en células murinas (79) y porcinas (72,80-82), indican que las células de la granulosa serían las principales involucradas en la expresión de IGF-I. Estas células poseen además sitios receptores de alta afinidad y baja capacidad para IGF-I (83,84). Si bien las células tecales/ intersticiales no expresan IGF-I, estudios recientes revelan que éstas células poseen receptores específicos para IGF-I y por lo tanto serían blanco del IGF-I producido por las células de la granulosa (61,85).

Además de ligandos y receptores en el ovario, la acción hormonal del IGF-I estaría sujeta a modulación a través de la elaboración local de proteínas ligadoras, que constituyen un grupo heterogéneo de al menos seis proteínas diferentes, de bajo peso molecular, que unen IGF-I (pero no insulina) (86,87).

Si bien la función exacta de estas proteínas es aún motivo de estudio, hay consenso sobre su función en el transporte de IGF-I y en su biodisponibilidad (72,80,88,89).

Estas observaciones sugieren que el IGF-I estaría involucrado en el desarrollo coordinado del folículo ovárico comunicando los diferentes compartimientos celulares.

A pesar de toda la información existente involucrando al IGF-I en la función ovárica, hasta el momento no hay evidencias incontrovertibles que indiquen que el IGF-I sea indispensable para la función ovárica, si bien gran cantidad de información de naturaleza indirecta sugiere fuertemente esta posibilidad. De todos modos, se requerirá más trabajo antes de que podamos sacar conclusiones inequívocas sobre la relevancia de los IGFs en la fisiología ovárica. En realidad, las limitaciones impuestas por los procedimientos experimentales actuales nos impiden avanzar mucho más en este sentido. Probablemente, aproximaciones experimentales más sofisticadas, como por ejemplo la tecnología transgénica, que permitan una ablación selectiva de los IGF a nivel del ovario, nos provean mayor información sobre la función reproductiva de estos factores.

### **EGF y TGF $\alpha$**

Originalmente extraído de glándulas submaxilares murinas (90) el EGF está íntimamente relacionado con el TGF $\alpha$ . El EGF maduro es una cadena polipeptídica de 53 aminoácidos con tres puentes disulfuro internos. El TGF $\alpha$  es

una cadena polipeptídica relacionada con el EGF, de 50 aminoácidos, aislada por primera vez de cultivos de diferentes células tumorales (91).

El TGF $\alpha$  humano tiene un 40% de homología con el EGF humano. Ambos péptidos reconocen el mismo receptor celular y producen una respuesta estimuladora del crecimiento, similar en todos los modelos estudiados (92).

Los estudios iniciales de Gospodarowicz y col. demostraron la actividad mitogénica de EGF en células de la granulosa bovinas, porcinas, de conejo y humanas *in vitro* (58,93). Contrastando con estos resultados, las células de la granulosa de ratas intactas o hipofisectomizadas tratadas con estrógenos y las células luteales bovinas no proliferan en presencia de EGF o FGF *in vitro* (58).

Estas acciones aparentemente dispares del EGF sobre la proliferación de las células de la granulosa pueden estar relacionadas a diferencias en el estadio de diferenciación de las células o a la necesidad de factores de crecimiento adicionales. De este modo, diferentes factores potencian la acción mitogénica del EGF, como por ejemplo el TGF $\beta$  (94), el PDGF y la  $\alpha$ -fetoproteína (95).

La acción mitogénica de EGF/TGF $\alpha$  no se limita sólo a las células de la granulosa. Las células de la teca bovinas incrementan la incorporación de [ $^3$ H]-timidina como respuesta a TGF $\alpha$  a las 24 h y el número de células aumenta durante 4 días de cultivo (96).

Se ha demostrado la presencia de receptores para EGF/TGF $\alpha$  en células de la granulosa bovinas, ovinas y murinas (97) y en células de la teca bovinas (98).

En la rata, se ha localizado TGF $\alpha$  exclusivamente en células tecales/intersticiales (99), sugiriendo una acción paracrina sobre las células de la granulosa. Sin embargo, en hamster se ha localizado actividad similar EGF, por técnicas inmunocitoquímicas, tanto en células de la granulosa como en células tecales. Por lo tanto, el origen de la actividad folicular de EGF/TGF $\alpha$  en diferentes especies de mamíferos y en distintos estadios de diferenciación permanece aún sin definir.

### **TGF $\beta$ y factores relacionados**

Los TGF $\beta$ s son péptidos polifuncionales que afectan la migración celular, la proliferación y la elaboración de la matriz extracelular. Hay hasta el momento tres TGF $\beta$  que han sido clonados y secuenciados y que presentan una homología de 70-80%. Todos comparten actividades biológicas similares, aunque no idénticas.

Existen otras proteínas pertenecientes a la familia de los TGF $\beta$ . Entre ellas podemos mencionar la hormona anti-Mulleriana (AMH) (100), inhibinas (101), activinas (102), todas involucradas en la regulación de la reproducción.

Se ha descrito que el TGF $\beta$  afecta la proliferación de las células foliculares. Estimula la proliferación de las células de la granulosa murinas (103,104) y porcinas (105), pero suprime la acción estimuladora del TGF $\alpha$  en células tecales bovinas (96).

Se ha demostrado la producción de TGF $\beta$  en células de la granulosa (106) y en células tecales/intersticiales (104,107,108), como así también en células luteales pequeñas y en el ovocito (109).

*Bendell* y *Dorrington* han sugerido que la proliferación de las células de la granulosa inducida por estrógenos estaría mediada por la producción de TGF $\beta$ , asignando una acción paracrina y autocrina de este factor en la regulación ovárica(110).

Estos y otros factores han sido ampliamente ensayados en distintos sistemas de células ováricas. Si bien la mayoría de los trabajos han enfocado sus efectos promotores del crecimiento celular, estos factores también modulan la diferenciación celular y esta acción puede estar desacoplada de los efectos sobre la proliferación.

En contraste con los efectos establecidos de los factores de crecimiento peptídicos sobre la proliferación de las células de la granulosa *in vitro*, la acción de las gonadotrofinas y de los estrógenos, conocidas como las principales hormonas tróficas involucradas en el control del crecimiento folicular *in vivo* ha sido difícil de demostrar en células de la granulosa *in vitro*.

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un sistema de células de la granulosa de rata cultivadas en medio libre de suero, que nos ha permitido demostrar los efectos de FSH y de los esteroides sexuales sobre estas células *in vitro* y su interacción con factores de crecimiento como la insulina/IGF-I y con factores producidos por otros tipos celulares ováricos.

## EL MODELO EXPERIMENTAL

Con la introducción de diferentes metodologías de la biología celular a la investigación endocrinológica, en particular las técnicas de cultivo de tejidos, numerosos laboratorios han estudiado la maduración de las células de la granulosa *in vitro* y han dilucidado el control hormonal de su diferenciación. Sin embargo, los mecanismos de regulación de la proliferación de estas células han sido comparativamente menos estudiados.

Bjersing y Carstensen (45) fueron los primeros en aislar células de la granulosa de folículos porcinos y realizar una incubación de poco tiempo para demostrar la capacidad esteroidogénica de estas células *in vitro*. Después de este primer experimento, células de la granulosa de numerosas especies fueron cultivadas en medios de cultivo con suero, manteniendo su capacidad de producir progesterona y de luteinizarse *in vitro*.

Desde entonces ha ido en aumento la utilización de sistemas de cultivo de células aisladas y de tejidos, como un medio directo de estudiar la regulación ovárica, en la medida en que diferentes marcadores de la diferenciación celular podían mantenerse *in vitro*.

Células de la granulosa de numerosas especies se han utilizado para estudiar aspectos como la biosíntesis de esteroides, la regulación de los receptores de las gonadotrofinas, la comunicación intercelular, la proliferación celular y más recientemente la regulación de la expresión de diversos genes involucrados en estos procesos.

Muchos de estos estudios se han realizado en medios suplementados con suero, que provee nutrientes específicos, factores de crecimiento y hormonas que facilitan la adhesión celular, el mantenimiento y el crecimiento *in vitro*. Sin embargo, no hay que olvidar que las células de la granulosa están separadas de los vasos sanguíneos y de las células de la teca por una membrana basal que rodea al folículo y que es relativamente impermeable a numerosos factores presentes en la circulación.

El suero contiene una multiplicidad de sustancias que pueden interferir con las funciones fisiológicas de las células de la granulosa, pero afortunadamente hoy podemos reemplazarlo por suplementos definidos que, adicionados al medio de cultivo, permiten el mantenimiento y crecimiento de las células. De este modo se ponen en evidencia relaciones y respuestas insospechadas, que permanecían enmascaradas por la presencia de suero.

Así pudo demostrarse, utilizando sistemas de cultivo libres de suero, que el EGF, el FGF, la insulina, la transferrina, la fibronectina, la hidrocortisona, la FSH, la LH, T4 y cortisol intervienen tanto en la proliferación de líneas de células ováricas de rata, como en el mantenimiento de las propiedades diferenciadas de cultivos primarios de células de la granulosa de rata y porcinas (69).

Los experimentos presentados en esta tesis, fueron realizados utilizando cultivos primarios de células de la granulosa, obtenidas por punción de folículos preantrales de ratas inmaduras tratadas con estrógenos. Las células fueron cultivadas sobre una matriz de colágeno y mantenidas en medio definido, libre de suero, en presencia de diferentes factores.

Este modelo experimental presenta varias ventajas:

- 1) El tratamiento con estrógenos *in vivo* induce la formación de folículos preantrales y provee una gran cantidad de células, relativamente homogéneas, en el mismo estadio de desarrollo.
- 2) El aislamiento de las células no requiere tratamiento enzimático (colagenasa o enzimas proteolíticas), por lo que se preserva la integridad de las membranas, evitando posibles cambios en la respuesta celular a hormonas.
- 3) La utilización de medios libres de suero para el cultivo de las células nos permite estudiar el efecto de hormonas circulantes y de factores presentes en el suero.
- 4) El cultivo de las células sobre matriz de colágeno modifica la adherencia de las células al sustrato y entre sí y las sensibiliza a factores agregados al cultivo.
- 5) Los cultivos primarios de células de la granulosa, a diferencia de las líneas celulares de células ováricas, retienen la respuesta hormonal y funciones fisiológicas observadas *in vivo*.

Si bien los cultivos de células resultan un medio conveniente y reproducible de estudiar la regulación hormonal de la diferenciación y crecimiento de las células de la granulosa, el método tiene varias limitaciones:

1) Los métodos *in vitro* no tienen en cuenta los posibles cambios en la vascularización y la microcirculación, que es importante para el suministro de hormonas a los diferentes folículos *in vivo*.

2) El cultivo de células de la granulosa aisladas no permite evaluar la interacción con los demás componentes celulares presentes en el folículo (células tecaes/intersticiales, complejo ovocito-células del cumulus). Las células de la teca proveen los precursores para la esteroidogénesis de las células de la granulosa, pero además pueden secretar factores que promueven la diferenciación y crecimiento de las mismas.

Si bien es cierto que cuando se trata de relacionar respuestas hormonales de células en cultivo con niveles más elevados de organización fisiológica, las dudas sobre los posibles artefactos del sistema subyacen, no podemos negar la importancia que ha tenido el desarrollo de las técnicas de cultivos celulares como base del conocimiento que hoy tenemos sobre los diversos aspectos relacionados con los mecanismos de la regulación ovárica.

## ***MATERIALES Y METODOS***

## **ANIMALES**

Se utilizaron ratas hembras de destete (21-22 días) de la cepa Sprague-Dawley en todos los experimentos. Se mantuvieron los animales a una temperatura constante de 25°C, bajo un régimen de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, en grupos de 8-9 animales lactantes, en presencia de una hembra puérpera. Después del destete recibieron alimento balanceado y agua *ad libitum* y se sacrificaron por dislocación cervical, al cabo de 3-4 días de tratamiento con dietilestilbestrol (DES).

## **TRATAMIENTO CON DES**

Se anestesiaron los animales con eter etílico (Merck, Argentina) y se les practicó una incisión en la base de la nuca. Se introdujo un implante subcutáneo de silástico conteniendo 20% en peso de DES (5mg) por animal. La sutura se realizó con agrafes de cirugía o con un adhesivo anaeróbico.

## **PREPARACION DE COLAGENO**

El colágeno se preparó a partir de colas de ratas adultas intactas de la cepa Sprague-Dawley, de acuerdo a la técnica de Bornstein (111). Se pelaron las colas y se sumergieron en etanol (96°, Sorialco, Argentina) durante 2 horas a -20°C. Luego se extrajeron cuidadosamente las fibras de colágeno con pinza y bisturí, dejándolas libres de tejido muscular. Se cortaron en trozos de 3-4cm y se

colocaron en una placa de Petri de vidrio, bajo una lámpara UV (NIS, GL-4 Germicidal, 4W) durante 48 horas. Una vez esterilizado, el colágeno se transfirió a un tubo de plástico de 15ml (Falcon) y se pesó. Luego se suspendió en 300ml por gramo de peso, de una dilución 1:1000 de ácido acético glacial (Mallinkrodt) en agua. Se agitó suavemente la suspensión durante 48-72 horas a 4°C. Se transfirió a tubos de polipropileno (Sorvall) de 50ml y se centrifugó en una centrífuga refrigerada (Sorvall RC-5B) durante 30 minutos a 10.000 rpm (rotor SS-34, Sorvall Instruments, USA). Finalmente se decantó la solución de colágeno en un frasco de vidrio de 500ml y se almacenó alicuotada en tubos de plástico de 50ml (Falcon) a 4°C. Las diferentes preparaciones de colágeno realizadas durante el transcurso de esta tesis se normalizaron a igual absorbancia a 280nm, correspondiente a una concentración de proteínas de 100 µg/ml. La solución resultó estable a 4°C durante unos 6-8 meses, al cabo de los cuales se reemplazó por una nueva preparación.

## **AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CELULAS OVARICAS**

### **Obtención de células de la granulosa:**

Las células de la granulosa se obtuvieron según el método de Campbell (112) con algunas modificaciones. Se sacrificaron los animales y se disecaron los ovarios cuidadosamente, recogiéndolos en un vial previamente autoclavado, conteniendo 10 ml de buffer PBS. Luego se enjuagaron dos veces con medio de incubación (D-MEM (Gibco, n°430-2100EA):F-12 (Gibco, n°430-1700EA) (1:1), HEPES 10 mM (Sigma, USA), pH ajustado a 7,4 con unas gotas de HCL(c), bajo

campana de flujo laminar (EdgeGard Hood, USA). Los ovarios se transfirieron a una placa de plástico de 35mm (Falcon, USA) desprovistos del tejido graso remanente y se punzaron varias veces con un par de agujas hipodérmicas. Luego se transfirieron a un tubo de plástico de 50ml (Falcon) y se incubaron en 5ml de medio D-MEM:F-12 (1:1), EGTA 6,8mM (Sigma), HEPES 10mM, a 37°C durante 15 minutos, con agitación suave cada 5 minutos. Se aspiró el medio y se incubaron los ovarios en 5ml de medio D-MEM:F-12 (1:1), sacarosa 0,5M (Sigma), HEPES 10mM, a 37°C durante 5 minutos. Luego se agregaron dos volúmenes de medio de incubación y una vez sedimentados los ovarios, se descartó el sobrenadante. Los ovarios se depositaron sobre dos mallas de nylon (Nytex 50) y se presionaron a través de ellas, enjuagando varias veces con medio de incubación. Las células en suspensión (unos 25ml) se recogieron en dos tubos de plástico de 15ml (Falcon) y se centrifugaron durante 10 minutos a 1000 rpm (200 x g centrifuga International IEC, modelo CS). Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 9ml de medio de incubación, pasándolas varias veces por una pipeta de plástico de 10ml (Falcon). Luego se centrifugaron nuevamente durante 10 minutos a 1000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 5ml de medio de incubación. Se tomó una alícuota de la suspensión en un vial de polietileno (Polistor Argentina, n° 72), para determinar la viabilidad de las células. Se tiñieron durante 10 minutos, con una solución de Azul de Trypan (Sigma) en agua (0,4% final) y se contaron con un hemocitómetro (Neubauer).

La suspensión de células (5ml) se diluyó hasta alcanzar una concentración de  $10^6$  células vivas por ml, con medio de cultivo (D-MEM:F-12 (Gibco, 1:1), bicarbonato de sodio 2,2 g/l (Carlo Erba), gentamicina 40µg/ml (Schering-Plough). Después de resuspender las células con una pipeta de plástico de 5ml

(Falcon), se sembraron en placas de plástico (Nunclon Microwell F96, Nunc, Denmark), recubiertas con colágeno de cola de rata, a una densidad de  $3 \times 10^5$  células por  $\text{cm}^2$ . Luego se incubaron durante 90-120 minutos en una estufa gaseada (5%  $\text{CO}_2$ , Forma Scientific) a  $37^\circ\text{C}$  y una vez adheridas las células viables al sustrato, se aspiró el medio de siembra para eliminar las células muertas. Se agregaron finalmente los tratamientos, en medio de cultivo fresco.

### **Purificación por centrifugación sobre colchón de Percoll:**

Se preparó una solución isotónica de Percoll (Pharmacia) al 40% en solución salina (densidad 1,040g/ml), agregando 1ml de solución fisiológica 10x (NaCl 1,5M), 5ml de agua estéril y 4ml de solución de Percoll puro (densidad 1,130 g/ml) en un tubo de plástico de 15ml (Falcon).

La suspensión de células (unos 25ml) obtenida al presionar los ovarios a través de las mallas de nylon se resuspendió en 1ml de medio de incubación, pasándola varias veces por una pipeta de plástico de 1ml (Falcon). Se depositó sobre 3ml del colchón de Percoll y se centrifugó durante 20 minutos a 1500 rpm (centrífuga International IEC, modelo CS), según la técnica descrita por Magoffin y Erickson (113). Se aspiró la banda de células del tope del colchón con una pipeta de 1ml y se transfirió a un tubo de plástico de 15ml, conteniendo 9ml de medio de incubación. Las células se pasaron varias veces por una pipeta de plástico de 10ml (Falcon) y luego se centrifugaron nuevamente durante 10 minutos a 1000 rpm (200xg). Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 5ml de medio de incubación, procediendo a continuación según la técnica ya

descripta. Se pudo comprobar, por observación al microscopio óptico, que la preparación obtenida estaba prácticamente libre de células tecales/intersticiales.

### **Obtención de subpoblaciones de células de la granulosa.**

Se preparó un gradiente continuo de Percoll (Pharmacia) estéril en una cámara de flujo laminar (EdgeGard Hood, USA), utilizando un armador de gradientes conteniendo soluciones de Percoll al 15% y al 45% en solución salina (NaCl 0,15M). Mediante una bomba peristáltica (LKB, Micropetrex) se armó el gradiente en un tubo de plástico de 15 ml (Falcon), a una velocidad de 20 gotas por minuto. Se determinó la linealidad del gradiente midiendo el índice de refracción de alícuotas de 1 ml a medida que se armaba el gradiente, mediante un refractómetro. Una vez armado el gradiente se depositaron las células de la granulosa aisladas de ratas tratadas con DES durante 3 días y se centrifugaron durante 30 minutos a 1500 rpm en una centrifuga International IEC, modelo CS. Las cinco fracciones resultantes fueron recolectadas mediante un tubo capilar estéril desde el fondo del tubo, utilizando la bomba peristáltica y separadas en sendos tubos. La densidad de las fracciones se calculó utilizando los respectivos índices de refracción. Se determinó la viabilidad celular y se sembraron  $1 \times 10^5$  células por celda, en una placa de plástico. Las células fueron mantenidas con diferentes tratamientos para luego determinar la incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-timidina.

### **Obtención de células tecales/intersticiales**

El tejido ovárico remanente de la obtención de las células de la granulosa se digirió durante 30 minutos, a 37°C, en medio D-MEM:F-12 (1:1), HEPES 10mM, colagenasa 3mg/ml (Sigma), albúmina sérica bovina 1mg/ml (Sigma) y Desoxirribonucleasa I 10µg/ml (Sigma), a pH 7,4 (0,1ml por ovario), con suave agitación en un baño termostatzado (Vicking,USA). El tejido disgregado se pasó numerosas veces por una pipeta de plástico de 1ml (Falcon) primero sin y luego con una punta de pipeta automática (BioRad, Type BR-35) en su extremo. Se filtró la suspensión de células a través de una malla de nylon (Nytex 50) y se centrifugó a 200 x g durante 10 minutos. Se resuspendió el pellet en 1ml de medio de cultivo y se transfirió una alícuota de células en suspensión a un vial de polietileno (Polistor), para determinar su viabilidad. Las células se sembraron en placas de plástico Multiwell (Nunc), recubiertas con colágeno de cola de rata, a una densidad de  $3 \times 10^5$  células por  $\text{cm}^2$ . Se incubaron durante 24 horas en estufa gaseada (5% CO<sub>2</sub>, Forma Scientific) a 37°C, aspirando el medio de siembra al cabo de la incubación. Se agregaron finalmente los tratamientos, en medio de cultivo fresco.

### **Preparación de medios condicionados por células tecales/intersticiales**

Se cultivaron células tecales/intersticiales durante 7-9 días en estufa gaseada (5% CO<sub>2</sub>, Forma Scientific) a 37°C, en presencia o en ausencia de estradiol 1µg/ml (Sigma). El medio de cultivo se reemplazó cada 2-3 días por medio fresco y se recogieron y alicuotaron los medios condicionados. No se observaron diferencias

evidentes entre el número de células de los cultivos tratados con estradiol y los cultivos controles. Una alícuota se mantuvo a 4°C para ensayar su actividad sobre los cultivos de células de la granulosa y las restantes se almacenaron a -20°C. Los medios condicionados solo se congelaron y descongelaron una vez y se descartaron aquellos que no mostraron actividad *in vitro*.

## **MEDIDAS DE LA SINTESIS DE ADN**

### **Incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina:**

Las células de la granulosa se sometieron a distintos tratamientos, cultivándolas durante diferentes tiempos, al cabo de los cuales se marcaron con [<sup>3</sup>H]-timidina (10Ci/mmol, American Radiolabeled Chemicals Inc., USA). Las curvas de tiempo se realizaron cultivando las células durante 96h con los distintos tratamientos (1x10<sup>5</sup> células por cultivo, en 0,1ml de medio, por triplicado), marcando cada 12h con [<sup>3</sup>H]-timidina (0,4 μCi por cultivo) y cosechando las células al cabo de cada pulso. El medio de cultivo no fue cambiado a lo largo del experimento. En todos los experimentos restantes, los cultivos de células se incubaron durante 24h con [<sup>3</sup>H]-timidina (0,4 μCi por cultivo), después de preincubar las células durante 24h (1x10<sup>5</sup> por cultivo en 0,1ml de medio, por triplicado) con los distintos tratamientos. Se cosecharon las células a las 48h posteriores al plaqueo con un cosechador de células múltiple (Cell harvester, Nunc). Se aspiró el medio de cultivo y se realizaron seis lavados sucesivos con agua desionizada para romper las células y liberar su contenido. Al aspirar la suspensión acuosa, el ADN quedó retenido por filtros de fibra de vidrio (Whatmann GF-C) y se fijó mediante dos enjuagues finales con etanol. Se

recogieron los filtros en tubos de polietileno (Polistor) y se secaron al aire. Luego se agregaron 3ml de solución centelleante preparada con PPO, 6 g/l (NEN, USA) en tolueno (Dorwill, Argentina) y la radiactividad se midió con un contador de centelleo líquido (Beckmann LS1801, USA), con una eficiencia del 50%.

### **Indice de marcación de núcleos.**

Con el objeto de determinar el porcentaje de células de la granulosa que sintetizan ADN *in vitro*, las células se marcaron con [<sup>3</sup>H]-timidina y se autorradiografiaron para determinar el índice de marcación de núcleos. Los cultivos de células se incubaron durante 24h con [<sup>3</sup>H]-timidina (0,3 μCi por cultivo), después de preincubarlas durante 24h en placas de plástico (35mm de diámetro, 10<sup>6</sup> células por placa en 2ml, por duplicado), con los distintos tratamientos. Se interrumpió la incubación a las 48h posteriores al plaqueo y se fijaron las células mediante dos lavados en frío (0-4°C) con PBS, dos lavados con TCA 5% (Merck) y dos lavados con etanol (Sorialco). Luego se procesaron las células para ser autorradiografiadas y se determinó el porcentaje de células marcadas radiactivamente por conteo al microscopio óptico de unas 500 células por placa (114).

## **ANALISIS ESTADISTICO**

Los resultados fueron expresados como cpm por celda, promedio  $\pm$  ES de cultivos realizados por triplicado ( $n=3$ ). Las comparaciones estadísticas de los resultados fueron realizadas utilizando el análisis de la varianza de una vía y el test de comparaciones múltiples de Scheffe (115) o el test de Chi cuadrado (para los ensayos de determinación del índice de marcación de nucleos). El ajuste de las curvas dosis-respuesta y la determinación de la  $ED_{50}$  fueron realizados mediante el programa ALLFIT basado en una ecuación logística de cuatro parámetros (116).

## ***CAPITULO 1***

## LOS ESTROGENOS Y EL CRECIMIENTO FOLICULAR

Los estrógenos constituyen un poderoso estímulo para la proliferación de las células de la granulosa de rata *in vivo* (49,117,55,57). Sin embargo, el mecanismo por el cual éstos ejercen su acción mitogénica aún no ha sido dilucidado.

Diferentes hipótesis han sido formuladas para explicar el efecto mitogénico de los estrógenos sobre diferentes tipos celulares y se ha propuesto un efecto directo del estradiol sobre la síntesis de ADN de las células efectoras (118).

En general se considera que los estrógenos son incapaces de estimular la proliferación de las células de la granulosa *in vitro*. En consecuencia, es más probable una acción indirecta de los estrógenos, a través de la regulación de la síntesis y/o liberación de factores de crecimiento intraováricos (80,119,104,98).

Alternativamente, los estrógenos podrían sensibilizar a las células de la granulosa a la acción mitogénica de otros factores de crecimiento normalmente presentes en el medio folicular, o bien, bloquear la acción de inhibidores del crecimiento celular (120).

Hasta el momento no ha sido posible verificar estas últimas hipótesis debido a la carencia de un sistema adecuado para el estudio de la proliferación de las células de la granulosa.

En esta tesis se describe un sistema que permite la evaluación de reguladores potenciales del crecimiento de las células de la granulosa basada en la medición

de la incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-timidina a células de la granulosa de rata cultivadas bajo condiciones definidas.

La incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-timidina es de fácil medición y cuando los resultados son validados por métodos independientes como la determinación del contenido de ADN o del número de células, constituye una buena estimación de la proliferación celular (119,98).

Utilizando este sistema se ha estudiado el efecto de los estrógenos sobre la respuesta de las células de la granulosa de rata al estímulo con insulina y hemos encontrado cierta evidencia de que el estradiol podría interactuar con un factor derivado de las células tecaes/intersticiales que estimula la proliferación de las células de la granulosa.

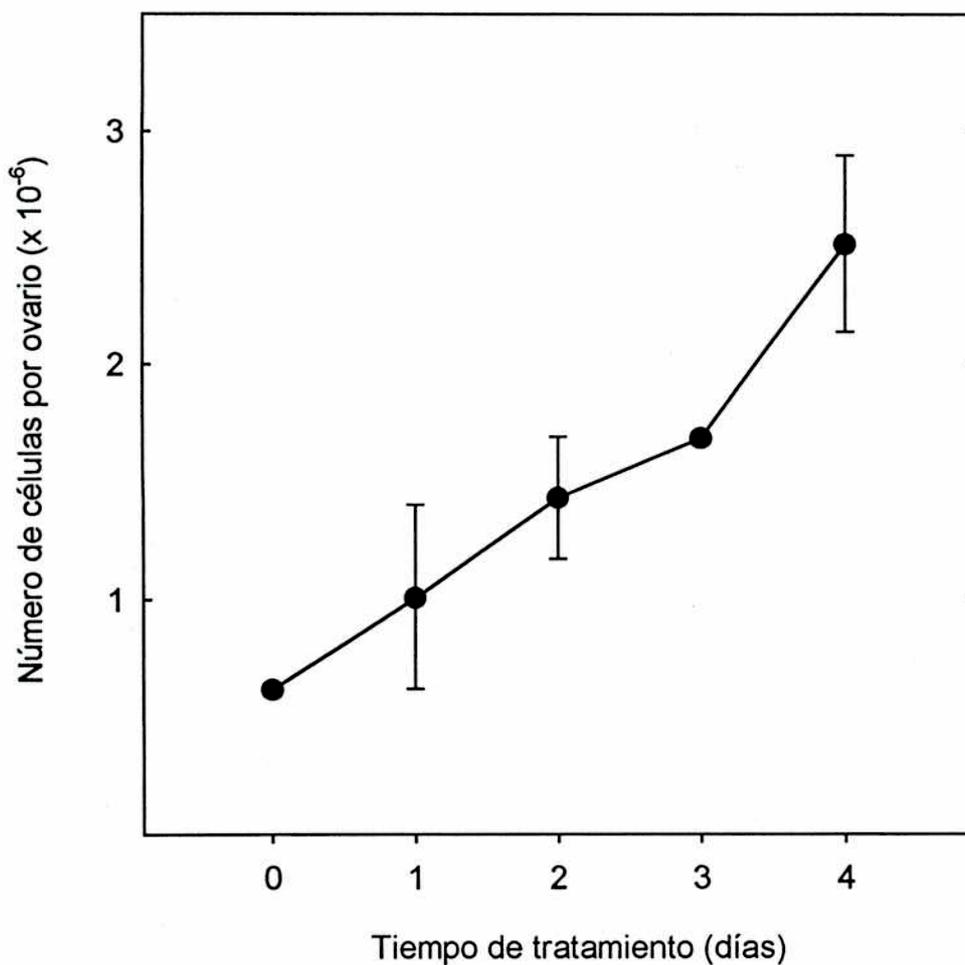
## **RESULTADOS**

### **Efecto del tratamiento con estrógenos *in vivo* sobre el número de células de la granulosa ováricas.**

La figura 1.1 muestra el efecto del tratamiento de los animales con estrógenos en función del tiempo. Ratas inmaduras de 21 días de edad fueron implantadas diariamente durante cuatro días con implantes de silástico que contenían 5mg de DES. El efecto del DES sobre el crecimiento ovárico fue dependiente del tiempo de tratamiento y hubo un incremento del número de células de la granulosa viables recuperadas por ovario (cuatro días de tratamiento aumentaron en más de cuatro veces el número de células recuperadas, comparadas con el grupo control).

### **Efecto del tratamiento con estrógenos sobre la síntesis de ADN de las células de la granulosa estimulada por insulina.**

Con el objeto de determinar si el tratamiento con estrógenos alteraba la respuesta a insulina de las células de la granulosa, se aislaron las células de animales tratados y sin tratar con DES y se cultivaron en presencia o ausencia de insulina. La síntesis de ADN se evaluó mediante la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina durante periodos consecutivos de 12 horas, sin cambiar los medios de cultivo durante el experimento. Como puede observarse en la figura 1.2, las células de la granulosa aisladas de animales sin tratar mostraron una incorporación comparativamente baja durante todo el período de cultivo. En presencia de insulina sólo se observó una leve estimulación ( $p < 0,05$ ).



### Figura 1.1

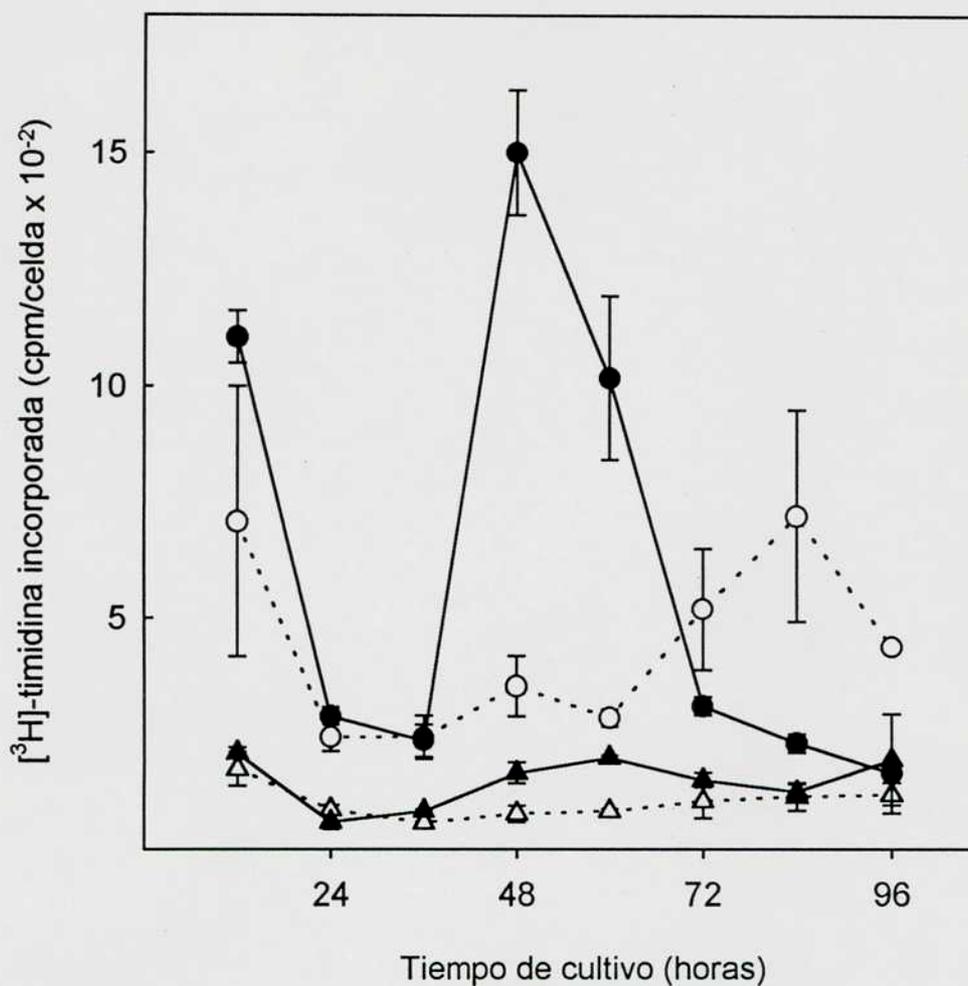
Efecto del tratamiento con estrógenos *in vivo* sobre el número de células de la granulosa ováricas.

Lotes de 4 animales de 21 días de edad fueron implantados con implantes de silástico conteniendo 5 mg de DES durante 4 días consecutivos. Se determinó el número de células de la granulosa viables incubando con azul de tripán al 0,4%. Los resultados representan los promedios  $\pm$  ES de dos experimentos diferentes.

entre las 36 y las 72 horas de cultivo. En cambio, las células aisladas de animales tratados con DES durante tres días mostraron una alta incorporación durante el período inicial posterior al plaqueo, tanto en presencia como en ausencia de insulina. Este comportamiento probablemente refleje el fin de un ciclo de replicación de ADN inducido por el tratamiento con estrógenos. En presencia de insulina la incorporación de timidina aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) a las 48 y 60 horas y luego descendió a los valores basales, en cambio en ausencia de hormona el incremento se observó a las 84 y a las 96 horas alcanzando valores máximos comparativamente menores (3 veces contra 6 alcanzado en presencia de insulina,  $p < 0,05$ ).

Entre las 24 y las 60 horas posteriores al plaqueo, la máxima respuesta en términos de incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-timidina se observó con concentraciones de insulina entre 800 y 1600 ng/ml (figura 1.3). Se seleccionó una dosis de 1  $\mu\text{g/ml}$  para todos los experimentos subsiguientes.

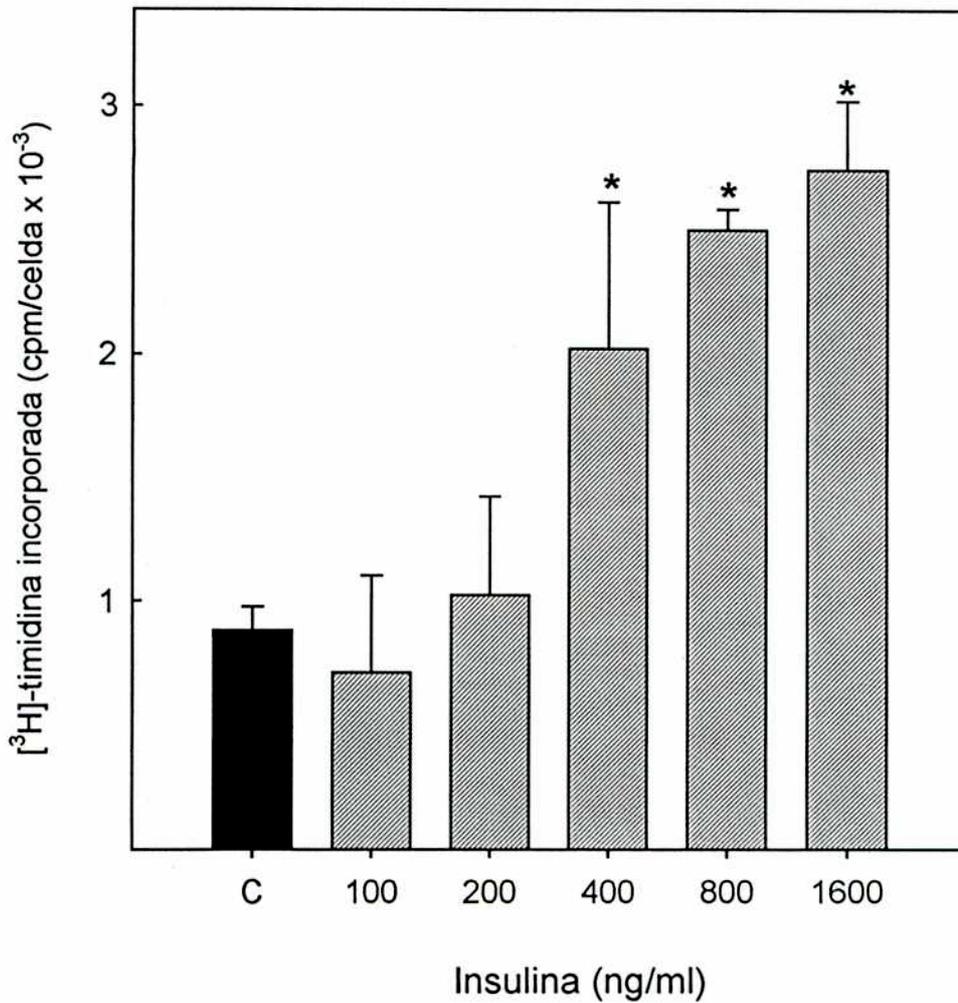
La baja tasa de incorporación observada aún en los cultivos tratados con insulina indica que solo una pequeña proporción de las células está involucrada en una activa síntesis de ADN. Por lo tanto, para obtener mediciones confiables de la síntesis de ADN es necesario medir la incorporación durante períodos relativamente largos, evitando, de este modo, resultados confusos debidos a ligeras variaciones de la curva de tiempo entre diferentes preparaciones.



**Figura 1.2**

**Efecto del tratamiento con estrógenos *in vivo* sobre la síntesis de ADN de las células de la granulosa estimulada por insulina.**

Las células de la granulosa fueron aisladas de animales tratados (●,○) y sin tratar (▲,△) con DES (implantes con 5 mg) durante 3 días. Las células ( $1 \times 10^5$  por celda) fueron cultivadas en presencia (●,▲) o ausencia (○, △) de insulina ( $1 \mu\text{g/ml}$ ). Se determinó la incorporación de timidina tritiada durante períodos consecutivos de 12 horas. Los resultados fueron expresados en cpm por celda  $\pm$  ES, ( $n=3$ ) y corresponden a un experimento representativo de tres experimentos diferentes.



**Figura 1.3**

**Efecto de insulina sobre la síntesis de ADN de las células de la granulosa.**

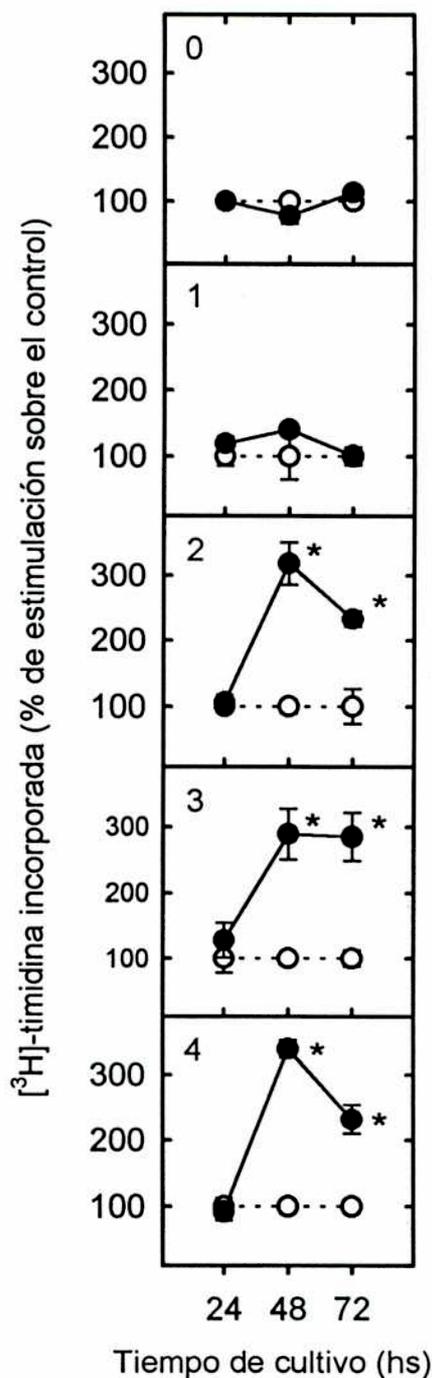
Las células de la granulosa ( $1 \times 10^5$  por celda), aisladas de animales tratados con implantes de DES (5 mg) durante 3 días, fueron cultivadas en presencia de concentraciones crecientes de insulina (barras rayadas). Se determinó la timidina tritiada incorporada entre las 24 y las 60 horas de cultivo. Los resultados fueron expresados en cpm por celda promedio  $\pm$  ES, (n=3). Los valores con asteriscos fueron significativamente diferentes ( $p < 0,05$ , ANOVA y test de Scheffe de comparaciones múltiples) al del grupo control sin tratar (barra llena).

## **Efecto del tiempo de tratamiento con estrógenos *in vivo* sobre la inducción de la respuesta a insulina.**

Para determinar la duración del tratamiento estrogénico necesario para observar el efecto de insulina, las células de la granulosa fueron aisladas de animales tratados con DES por diferentes períodos y luego cultivadas en presencia o ausencia de insulina. Se evaluó la síntesis de ADN mediante la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina durante 72 horas en períodos consecutivos de 24 horas. No se cambiaron los medios de cultivo durante el experimento. Como puede verse en la figura 1.4, se observó una respuesta significativa ( $p < 0,05$ ) a insulina recién después del primer día de tratamiento y la respuesta máxima se alcanzó después de 2 a 4 días de tratamiento con DES.

**El medio condicionado de células tecaes/intersticiales (MCTI) estimula la síntesis de ADN de las células de la granulosa y el estradiol potencia su efecto.**

Investigaciones recientes han demostrado que las células tecaes/intersticiales secretan factores mitogénicos (119,98,121). Se decidió entonces, comprobar si el estradiol es capaz de inducir la síntesis y/o liberación de mitógenos por estas



**Figura 1.4**

**Efecto del tiempo de tratamiento con estrógenos *in vivo* sobre la inducción de la respuesta a insulina.** Animales de 21 días de edad fueron implantados con implantes de DES (5mg), durante 4 días consecutivos (paneles 1 a 4) y operadas sin implantes (panel 0). Las células de la granulosa aisladas fueron cultivadas en presencia (círculos llenos) y en ausencia (círculos vacíos) de insulina (1µg/ml por celda) durante 72 horas. Se determinó la incorporación de timidina tritiada durante períodos consecutivos de 24 horas. Los resultados fueron expresados como cocientes entre los valores de cpm por celda correspondientes a cultivos tratados con insulina y a cultivos sin tratar (cocientes promedio  $\pm$  ES, n=3). Los asteriscos indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ , ANOVA) respecto de los controles.

células. La figura 1.5 muestra el efecto del MCTI sobre la síntesis de ADN de las células de la granulosa. El MCTI recogido el día 9 de cultivos control produjo un aumento dosis-dependiente de la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina, medida entre la 24 y las 48 horas posteriores al plaqueo. Este efecto fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) con MCTI proveniente de cultivos tratados con estradiol.

Cuando el MCTI se obtuvo de cultivos tratados con diferentes dosis de estradiol, se observó un incremento dosis-dependiente en la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina a células de la granulosa. La ED<sub>50</sub> para estradiol fue de 20 ng/ml (datos no mostrados).

El mayor efecto estimulador del MCTI proveniente de cultivos tratados con estradiol puede deberse a una amplificación de la acción mitogénica del factor derivado de las células tecales/intersticiales debida al esteroide.

Como puede verse en la tabla 1.1 el agregado de estradiol a los cultivos de células de la granulosa amplifica el efecto del MCTI proveniente de cultivos no tratados con estradiol.

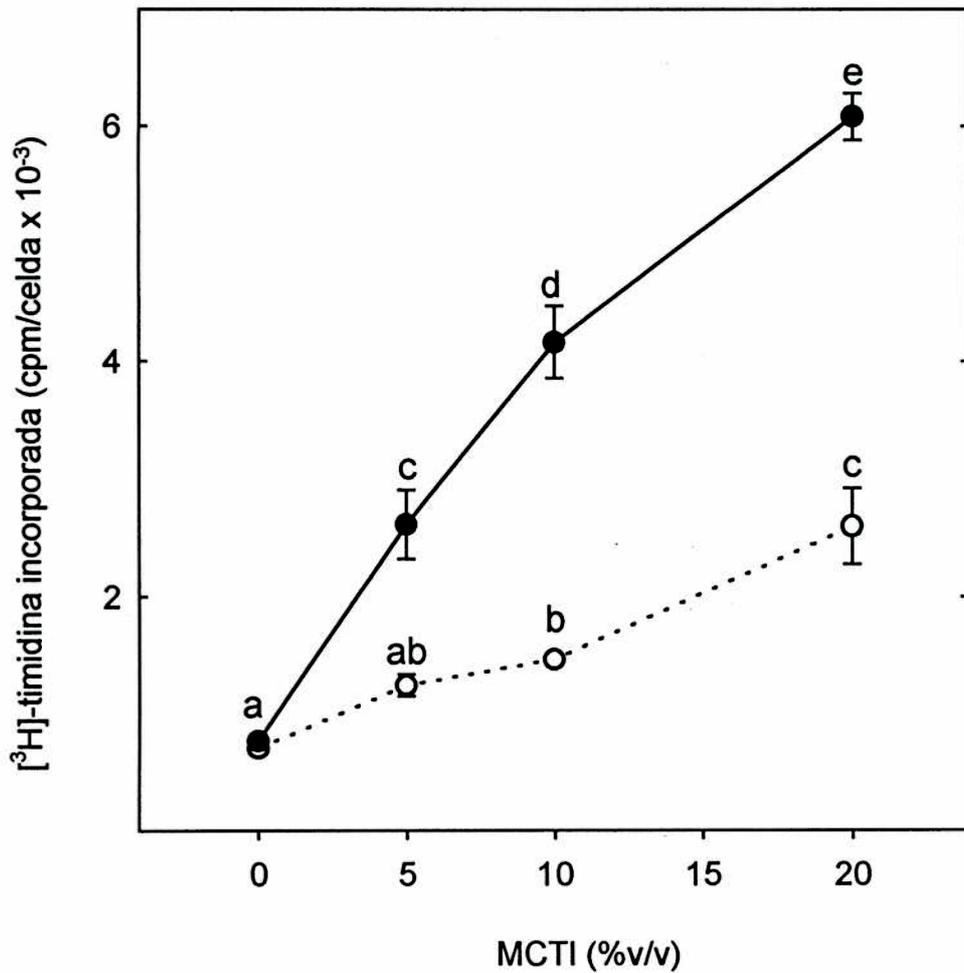
En la mayoría de los experimentos realizados, la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina a las células de la granulosa en presencia de estradiol (0,1-1 µg/ml) no fue diferente de la incorporación a los grupos sin tratamiento. Sin embargo, observamos cierta variabilidad en los resultados, pues en algunos preparados la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina fue levemente mayor en presencia de estradiol (datos no mostrados).

Por cuanto estos preparados presentaban acúmulos de células y trozos de tejido ovárico observables al microscopio óptico, supusimos que células tecaes/intersticiales contaminantes del cultivo podrían estar mediando el efecto de estradiol. Por lo tanto, se decidió incorporar un paso de purificación al protocolo de obtención de las células de la granulosa, con el objeto de determinar si esta variabilidad de la respuesta a estradiol se debía a la presencia de otro tipo de celular en los cultivos.

Se procedió a centrifugar la suspensión de células, obtenida al presionar los ovarios a través de las mallas de nylon, sobre un colchón de Percoll, de acuerdo a la técnica descrita por Magoffin y Erickson (113).

Los autores aplicaron esta técnica para purificar células tecaes/intersticiales, basándose en la mayor densidad de este tipo celular, respecto a la de otras células ováricas. Obtuvieron de este modo preparados de células tecaes/intersticiales, libres de células de la granulosa.

Aplicando el mismo principio, obtuvimos preparados de células de la granulosa, libres de células tecaes/intersticiales, tal como se describe en los Materiales y Métodos.



**Figura 1.5**

**Efecto de medios condicionados por células tecales/intersticiales sobre la síntesis de ADN de células de la granulosa.**

Las células de la granulosa aisladas de animales tratados con implantes de DES (5 mg) durante 3 días, fueron cultivadas ( $1 \times 10^5$  por celda) en presencia de concentraciones crecientes de medios condicionados por células tecales/intersticiales tratadas con estradiol ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) (●) y sin tratar (○). Se determinó la timidina tritiada incorporada entre las 24 y las 48 horas de cultivo. Los resultados fueron expresados en cpm promedio  $\pm$  ES,  $n=3$ . Los valores que comparten la misma letra no fueron significativamente diferentes ( $p > 0,05$ , por ANOVA y test de Scheffé de comparaciones múltiples).

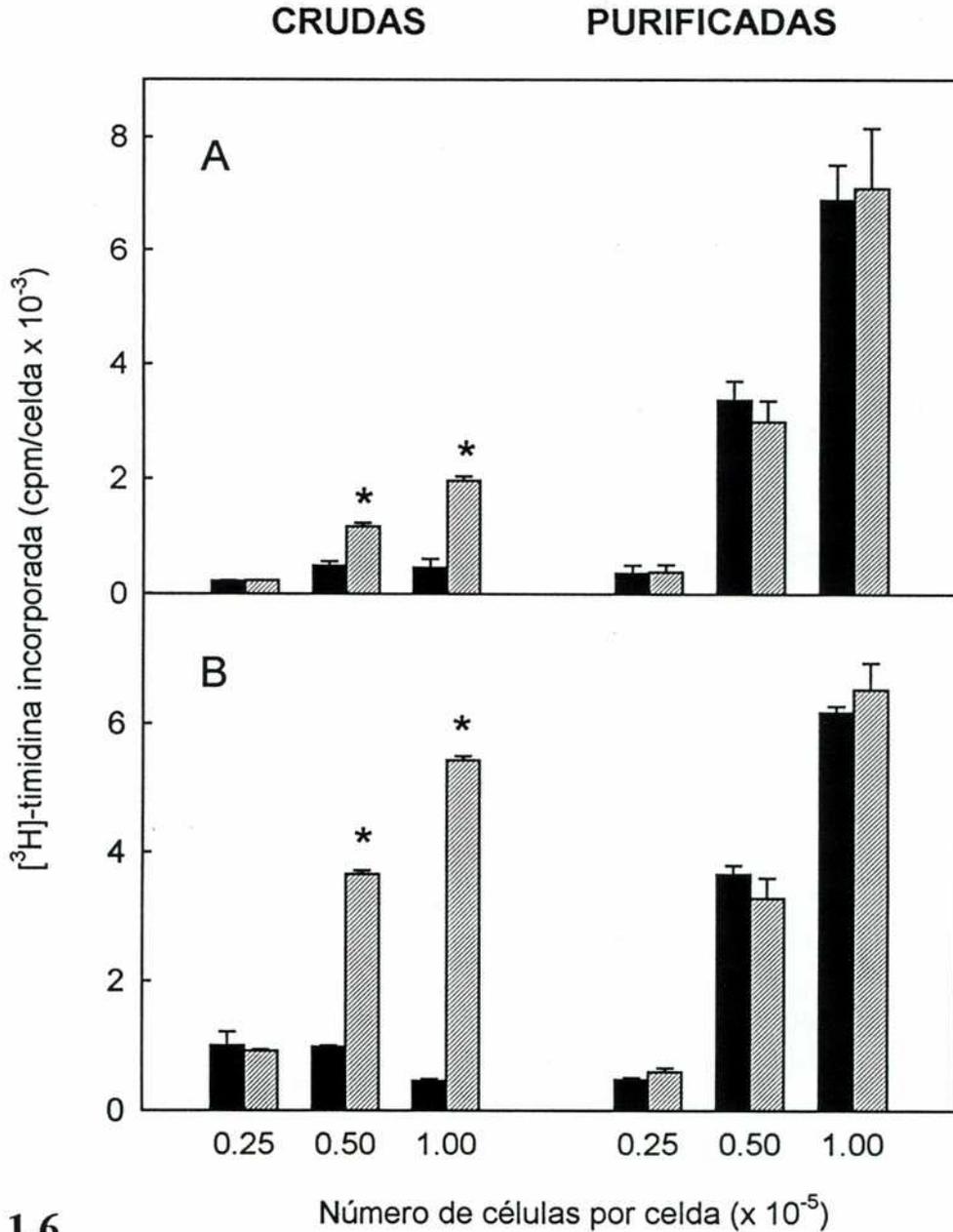
Tratamiento	$[^3\text{H}]$ -timidina incorporada (cpm/celda)
C	97 ± 19 <sup>a</sup>
E	164 ± 27 <sup>a</sup>
MCTI-C	702 ± 85 <sup>b</sup>
MCTI-C + E	1331 ± 45 <sup>c</sup>
MCTI-E	1181 ± 256 <sup>c</sup>

**Tabla 1.1:** Interacción entre el MCTI y el estradiol en la estimulación de la síntesis de ADN de las células de la granulosa.

Las células de la granulosa fueron cultivadas en ausencia (C) y presencia de 100 ng/ml de estradiol (E), en presencia de 20% v/v de: medio condicionado por células tecales/intersticiales sin tratar (MCTI-C), medio condicionado por células tecales/intersticiales tratadas con estradiol (MCTI-E) y medio condicionado de células tecales/intersticiales sin tratar más 100 ng/ml de estradiol (MCTI-C +E). Se determinó la timidina tritiada incorporada entre las 24 y las 48 horas de cultivo. Los resultados fueron expresados en cpm promedio ± ES, n=3. Los valores que comparten la misma letra no fueron significativamente diferentes ( $p > 0,05$ , por ANOVA y test de Scheffé de comparaciones múltiples).

## **La purificación de las células de la granulosa modifica su respuesta a estradiol.**

Se cultivaron células de la granulosa purificadas y sin purificar por centrifugación sobre un colchón de Percoll en ausencia y en presencia de estradiol, a diferentes densidades de plaqueo. Se evaluó la síntesis de ADN midiendo la [<sup>3</sup>H]-timidina incorporada en dos períodos consecutivos de 24 horas, concluyendo el experimento a las 72 horas de cultivo. Las células tratadas estuvieron en presencia de estradiol durante todo el período de incubación y el medio de cultivo no fue renovado durante el experimento. Como puede verse en la figura 1.6, hubo una marcada estimulación de la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina como respuesta al estradiol agregado a cultivos de células de la granulosa sin purificar, plaqueados a alta densidad (10<sup>5</sup> células por celda). El efecto de estradiol dejó de verse a densidades menores o al purificar la preparación de células de la granulosa antes del plaqueo. Ambos efectos pueden explicarse asumiendo que el efecto de estradiol requiere la presencia de células tecaes/intersticiales. Los resultados fueron similares en los cultivos marcados entre 48 y 72 horas, no observándose diferencias entre cultivos de células purificadas tratados y sin tratar. En los cultivos de células sin purificar la estimulación de la síntesis de ADN en presencia de estradiol fue mayor que la observada entre las 24 y 48 horas de incubación y nuevamente se evidenció una dependencia de la densidad de plaqueo. La incorporación basal fue mayor en los cultivos de células purificadas que en los de células sin purificar, pero este efecto no se repitió en todos experimentos realizados y pareció ser dependiente de las condiciones de preparación de las células.



**Figura 1.6**

**Efecto del estradiol sobre la síntesis de ADN de células de la granulosa *in vitro*.**

Las células de la granulosa fueron aisladas de animales tratados con implantes de DES (5mg) durante 3 días. Se cultivaron las células crudas (sin purificar) y purificadas por centrifugación sobre un colchón de Percoll según la técnica descrita en los Materiales y Métodos, en presencia (barras ralladas) y en ausencia (barras llenas) de estradiol (1µg/ml), a diferentes densidades de plaqueo durante 72 horas. Se determinó la timidina tritiada incorporada entre las 24 y las 48 horas de cultivo (panel A) y entre las 48 y 72 horas de cultivo (panel B). Los resultados fueron expresados en cpm promedio por celda  $\pm$  ES, n=3. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ , por ANOVA) respecto de los cultivos controles (en ausencia de estradiol).

## **Efecto del tratamiento estrogénico *in vivo* sobre la respuesta al MCTI.**

Con el fin de determinar si las células de la granulosa no expuestas a los estrógenos *in vivo* son capaces de responder al MCTI, se cultivaron células aisladas de animales tratados y sin tratar con DES en presencia de concentraciones crecientes de MCTI provenientes de cultivos de células tecales/intersticiales tratados con estradiol. En la Figura 1.7 podemos observar que, si bien la incorporación máxima de [<sup>3</sup>H]-timidina observada fue mayor en los cultivos de células aisladas de animales tratados con DES que en los cultivos de células aisladas de animales sin tratar, estas últimas exhibieron una sensibilidad similar a la estimulación por el MCTI.

## **El MCTI y la insulina estimulan la proliferación de las células de la granulosa.**

Si bien la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina es comúnmente considerada como una medida de la síntesis de ADN, también se acepta que en ciertos casos, variaciones de la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina no reflejan necesariamente la proliferación celular (122). Con el objeto de evaluar si los aumentos en la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina estaban asociados a cambios en el número de células, las células de la granulosa fueron cultivadas durante 9 días en presencia de MCTI obtenido de células tecales/intersticiales tratadas y sin tratar con estradiol y de insulina. Al cabo de este período las células fueron fijadas y teñidas.

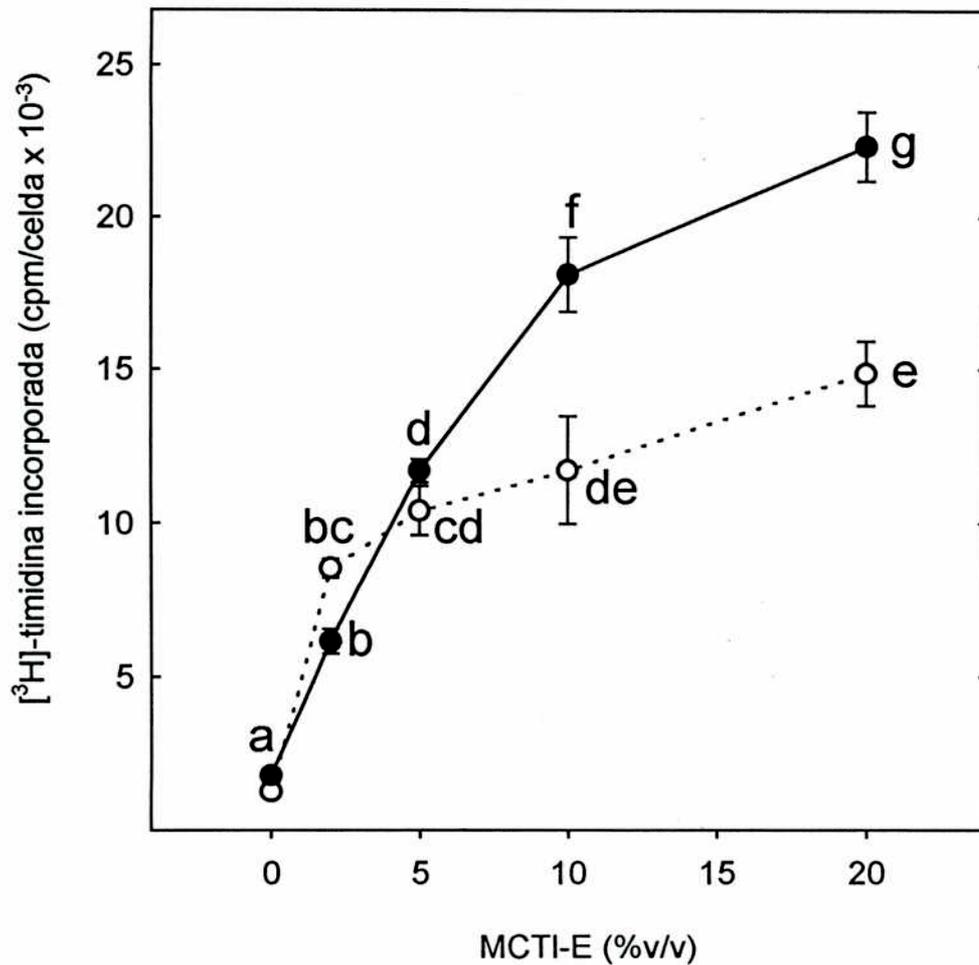
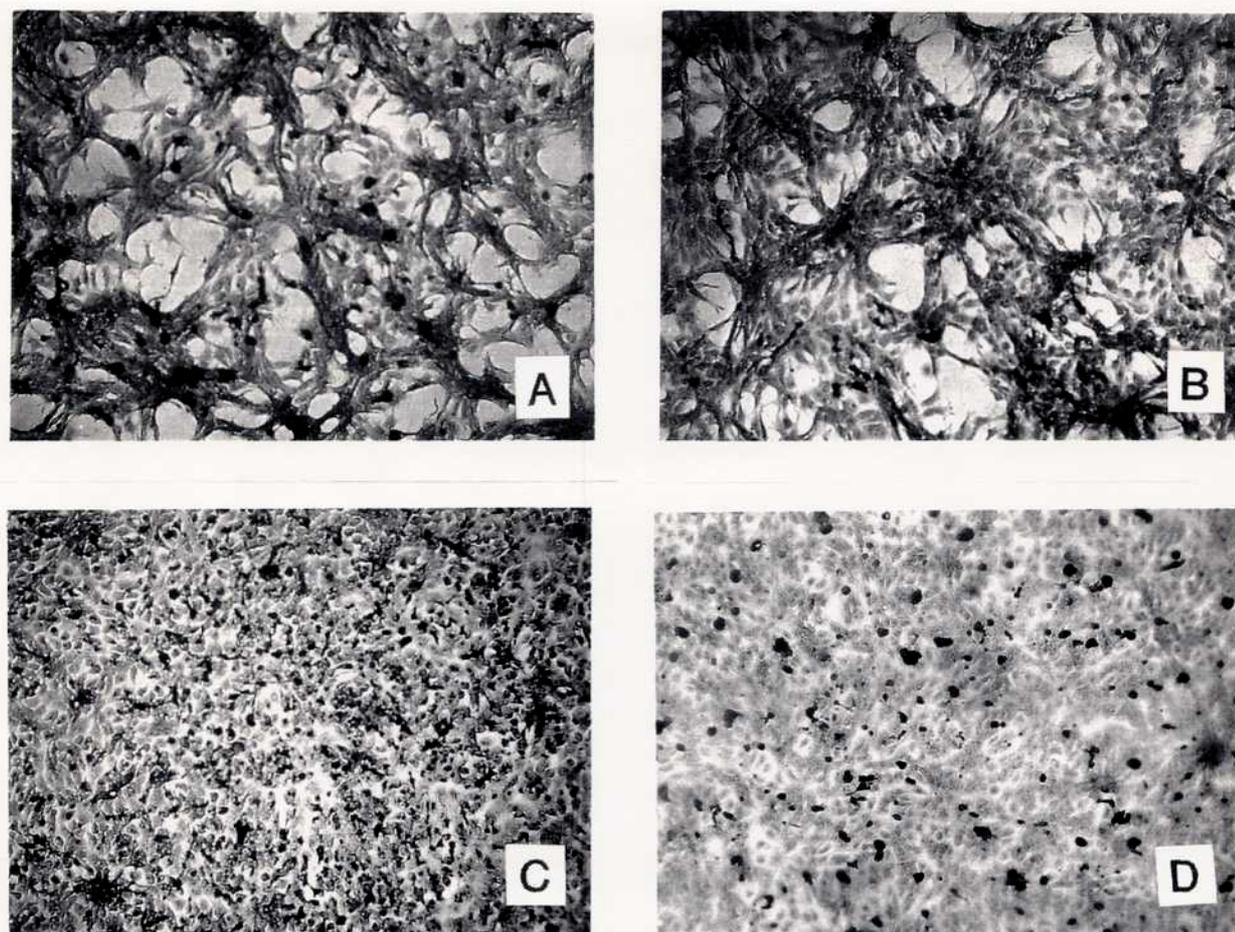


Figura 1.7

**Influencia del tratamiento con estrógenos *in vivo* sobre la respuesta de las células de la granulosa al medio condicionado por células tecales/intersticiales.**

Las células de la granulosa fueron aisladas de animales tratados con implantes de DES durante 4 días (●) y de animales control (○) y cultivadas en presencia de concentraciones crecientes de medio condicionado por células tecales/intersticiales tratadas con estradiol (MCTI-E). Se determinó la timidina tritiada incorporada entre las 24 y las 60 horas. Los resultados fueron expresados en cpm promedio  $\pm$  ES, n=3. Los valores que comparten la misma letra no fueron significativamente diferentes ( $p > 0,05$ , por ANOVA y test de Scheffe de comparaciones múltiples).

La apariencia morfológica de los cultivos puede apreciarse en la figura 1.8. Las densidades finales fueron evaluadas por conteo de tres campos no superpuestos de diferentes cultivos correspondientes a cada grupo experimental. Solo la insulina y el MCTI proveniente de células tratadas con estradiol produjeron un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) en el número final de células, CONTROL:  $206 \pm 26$ ; MCTI-C(20%v/v):  $234 \pm 19$ ; MCTI-E(20%v/v):  $405 \pm 20$ ; insulina ( $1 \mu\text{g/ml}$ ):  $307 \pm 30$  células por campo. No se observaron cambios significativos en el número de células durante las primeras 48 horas de cultivo con ninguno de los tratamientos. Por esta razón, resulta equivalente expresar los cambios observados en la incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-timidina como cpm incorporadas por millón de células o por celda.



### Figura 1.8

**Efecto del medio condicionado por células tecales/intersticiales e insulina sobre la proliferación de las células de la granulosa.**

Las células de la granulosa fueron aisladas de animales tratados con implantes de DES durante 3 días y cultivadas durante 9 días en presencia de: (A): sin tratamiento; (B): medio condicionado por células tecales/intersticiales control sin tratar (20% v/v); (C): medio condicionado por células tecales/intersticiales tratadas con  $1\mu\text{g/ml}$  de estradiol (20% v/v) y (D): insulina ( $1\mu\text{g/ml}$ ). Tinción con Giemsa, x200.

## CONCLUSIONES

Hace décadas es sabido que los estrógenos aumentan el peso ovárico de ratas hipofisectomizadas y aumentan la respuesta a las gonadotrofinas (49,117). Este último efecto ha sido reproducido con éxito *in vitro*, utilizando sistemas de cultivo definidos de células de la granulosa de diferentes especies (64). Por el contrario, hay muy pocas evidencias experimentales de la acción mitogénica de los estrógenos sobre células de la granulosa en cultivo (123,124).

Los tratamientos con estrógenos han sido ampliamente utilizados en ratas inmaduras, para aumentar el rendimiento de células de la granulosa (64). Sin embargo, las células de la granulosa de rata parecen ser resistentes a la estimulación de la división celular *in vitro* (93,125). Hemos observado que cuando las células de la granulosa de rata, obtenidas de animales tratados con DES, son cultivadas en medio DMEM:F12, sobre placas cubiertas con colágeno, la síntesis de ADN puede ser estimulada por insulina.

Este efecto, sin embargo, no ha podido observarse en cultivos de células de la granulosa aisladas de animales no tratados. Esto sugiere que la exposición a estrógenos *in vivo* podría modular la respuesta posterior de las células de la granulosa en cultivo. Los efectos de la insulina sobre la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina por células de la granulosa obtenidas de ratas tratadas con DES, concuerdan con una reducción del período previo a la entrada en fase S (fase lag) y con un aumento global del número de células que comienzan la síntesis de ADN.

La respuesta a insulina fue observada sólo después de 24 a 48 horas de tratamiento con estrógenos *in vivo*. Dado que solo un pequeño aumento del número de células recuperadas por ovario fue observado después de 48 horas de tratamiento con DES, no podemos distinguir si los estrógenos ejercen su efecto sobre una subpoblación preexistente de células de la granulosa o si una nueva generación de células que responden a la insulina aparece como consecuencia de la estimulación estrogénica. Por otro lado, como este trabajo se ha llevado a cabo con animales intactos, no pueden descartarse efectos mediados por cambios en las hormonas hipofisarias debidos al tratamiento con estrógenos.

Más aún, cuando agregamos DES a los cultivos de células de la granulosa aisladas de animales inmaduros no tratados, no hemos podido observar una amplificación de la estimulación de la síntesis de ADN mediada por insulina (126). De esta manera, la respuesta incrementada a insulina no parece deberse a una acción directa de los estrógenos sobre las células de la granulosa.

Otro posible mecanismo para la acción mitogénica de los estrógenos fue sugerido por los experimentos con el medio condicionado de células tecaes/intersticiales (MCTI). Aún cuando otros tipos celulares estén probablemente presentes en las preparaciones de células tecaes/intersticiales utilizadas para esta tesis (127), diferentes evidencias sugieren que las células tecaes/intersticiales son la fuente de la actividad mitogénica.

La presencia de actividad mitogénica en células tecaes/intersticiales fue descrita por primera vez por Makris y col.(128). Estos autores mostraron que extractos de tejido tecal porcino o medio condicionado por células tecaes eran capaces de estimular la síntesis de ADN de células BALB-3T3 y células de la granulosa. La

fracción activa ha sido parcialmente caracterizada como una proteína termo-lábil de peso molecular estimado entre 12,5 y 25 KD (128).

Dorrington y col. caracterizaron posteriormente esta actividad de cultivos de células tecales/intersticiales bovinas y de rata ensayandola en cultivos de células NRK y de células de la granulosa bovinas (119,121).

De esta manera, nuestro trabajo constituye la primera descripción del efecto mitogénico del MCTI sobre células de la granulosa de rata y de que este efecto es amplificado por el tratamiento de los cultivos con estrógenos.

Con respecto a la identidad del mitógeno derivado de las células tecales/intersticiales, Skinner y Coffey sugirieron que podría ser idéntico al TGF $\alpha$  (98).

Por otro lado, se ha descrito que el estradiol aumenta la producción de TGF $\alpha$  por células de cancer de mama (129).

Sin embargo, este factor de crecimiento actúa a través de receptores que son homólogos (o idénticos) a los de EGF (130) y, de acuerdo a nuestros resultados, este último factor de crecimiento no fue capaz de estimular la síntesis de ADN de las células de la granulosa bajo idénticas condiciones que el MCTI .

Esto sugiere que el TGF $\alpha$  no es el principal mitógeno presente en el MCTI, o bien que se requiere la presencia de otros factores que también podrían ser producidos por las células tecales/intersticiales.

Esta última posibilidad sería consistente con los resultados de May y col.(105) que describen la necesidad de múltiples factores para la máxima estimulación del crecimiento de células de la granulosa porcinas.

En trabajos recientes realizados por Saragüeta y col. en nuestro laboratorio se observó que el TGF $\beta$  ejerce un moderado efecto mitogénico sobre las células de la granulosa de rata, el cual es marcadamente amplificado por estradiol y FSH (132).

Mulheron y col. han descrito que las células tecales/intersticiales expresan TGF $\beta$  de tipo 1 y 2 y que este último es regulado por gonadotrofinas (133).

Por otro lado, Bendell y col. sostienen que la acción mitogénica del estradiol estaría mediada, al menos en parte, por TGF $\beta$  (110). Estas evidencias sugieren fuertemente que el factor mitogénico presente en el MCTI es TGF $\beta$ .

La necesidad de células tecales/intersticiales para la inducción por estradiol de la síntesis de ADN en células de la granulosa de rata puede explicar la incapacidad de este esteroide de estimular la proliferación de las células de la granulosa de otras especies que son altamente sensibles a los estímulos de factores de crecimiento peptídicos (134).

Los resultados presentados en esta tesis sugieren que los estrógenos aumentan la sensibilidad de las células de la granulosa a un factor de crecimiento derivado de células tecales/intersticiales. Sin embargo, no pueden descartarse efectos de estradiol sobre la síntesis y/o liberación de este factor por las células

tecales/intersticiales hasta tanto se realice un ensayo independiente de su actividad en medios condicionados obtenidos de cultivos tratados con estrógenos.

En este sentido, resultados preliminares realizados con cultivos prolongados de células de la teca bovinas indican que el aumento del efecto estimulador de cultivos tratados con estradiol perdura aún después de la remoción del esteroide (datos no mostrados).

Es notable que el agregado de insulina o MCTI, obtenido de cultivos de células tecales/intersticiales tratados con estradiol, a células de la granulosa produzca sólo un 50% o un 100% de aumento, respectivamente, del número final de células después de 9 días de cultivo.

Esto es coincidente con las observaciones realizadas por Orly y col. (125) que describen un incremento máximo del número de células de la granulosa de rata, cultivadas durante 7 días en presencia de suero, que no excede una duplicación celular.

La regulación de la respuesta de las células de la granulosa a los mitógenos al igual que la estimulación de la producción de factores autocrinos y paracrinos parecen ser parte del mecanismo por el cual los estrógenos promueven el crecimiento folicular.

## ***CAPITULO 2***

## LAS GONADOTROFINAS Y EL CRECIMIENTO FOLICULAR

El desarrollo folicular en los mamíferos involucra la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa (59). Ambos procesos han sido parcialmente reproducidos *in vitro* en diferentes sistemas (64,135), lo cual ha permitido la identificación de numerosos factores involucrados en el control de la diferenciación de las células de la granulosa. La proliferación de estas células ha sido comparativamente menos estudiada. La insulina y los factores de crecimiento como EGF, FGF e IGF-I son conocidos mitógenos para las células de la granulosa porcinas y bovinas en cultivo (93,136). El IGF-I es además producido por las células de la granulosa, sugiriendo una función de regulador intraovárico del crecimiento folicular (82,65).

Contrastando con los efectos establecidos de los factores de crecimiento peptídicos que estimulan el crecimiento de las células de la granulosa *in vitro*, la acción de las gonadotrofinas o los estrógenos, conocidas como las principales hormonas tróficas que controlan el crecimiento folicular *in vivo* (57,55), ha sido difícil de demostrar en estas células. Numerosos estudios indican un acción estimuladora directa de la FSH en la proliferación de las células de la granulosa *in vitro*, mientras que también se han informado efectos nulos o aún inhibitorios de esta hormona sobre la síntesis de ADN en estas células (124,137). Algunas de estas discrepancias pueden deberse a diferencias entre los sistemas de cultivo, suplementos al medio o a la fuente de las células de la granulosa.

Los cultivos libres de suero de células de la granulosa han probado ser extremadamente útiles para el estudio de la diferenciación celular (64). Bajo

ciertas condiciones estas células sintetizan ADN (138). Sin embargo, muy pocos estudios se han focalizado en la regulación de la proliferación, ya que se asume que las células de la granulosa de rata exhiben un potencial de replicación limitado (93, 116).

En el sistema de cultivo desarrollado en nuestro laboratorio ya hemos demostrado efectos estimulatorios de insulina, de estradiol y de medio condicionado por células tecaes/intersticiales sobre la síntesis de ADN en células de la granulosa de rata. En este capítulo evaluaremos las siguientes hipótesis:

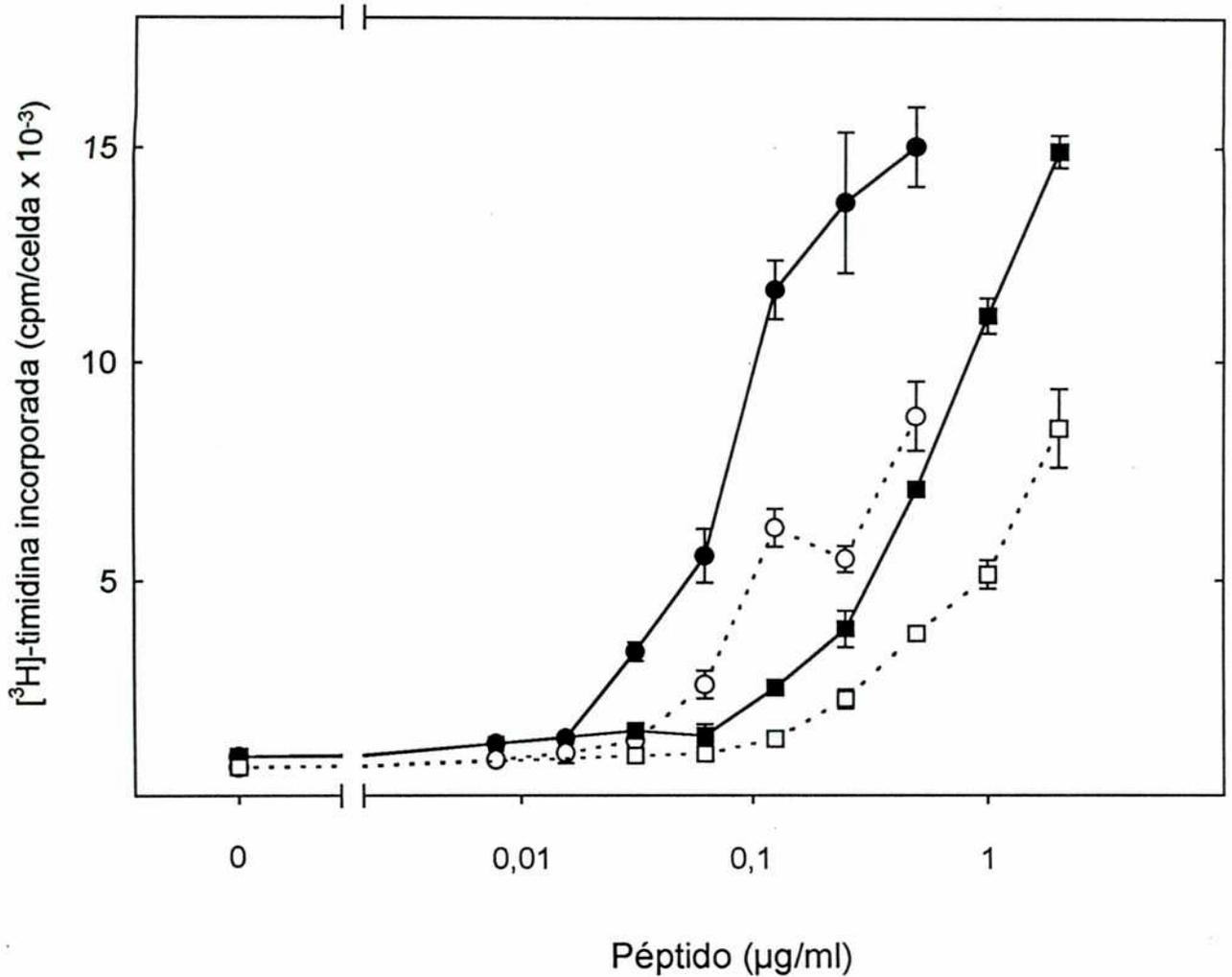
- 1) El IGF-I y la insulina estimulan la proliferación de las células de la granulosa de rata.
  
- 2) Los efectos de ambos péptidos son potenciados por FSH y/o AMPc.

## RESULTADOS

### **La insulina y el IGF-I estimulan la síntesis de ADN y su efecto se ve amplificado por MIX.**

Se ha demostrado que el IGF-I estimula la proliferación de las células de la granulosa porcinas y bovinas a concentraciones menores que las que lo hace la insulina (65). Experimentos preliminares indicaron que la acción de insulina en nuestro sistema se veía potenciada mediante la adición de MIX, un inhibidor de la enzima fosfodiesterasa. Con el objeto de evaluar las potencias relativas de insulina e IGF-I en la estimulación de la síntesis de ADN bajo estas condiciones, se cultivaron células de la granulosa de rata con diferentes concentraciones de ambos péptidos, en presencia y ausencia de MIX (Figura 2.1). El análisis de las curvas de dosis-respuesta, ajustadas mediante una ecuación logística de cuatro parámetros (116) nos muestra que el IGF-I fue más potente que la insulina en la estimulación de la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina en términos de la ED<sub>50</sub> (95±10 vs. 656±110 ng/ml; p<0,05). La respuesta máxima, sin embargo no fue significativamente diferente para ambos péptidos. La adición de MIX a los cultivos produjo un incremento del 100% en la respuesta máxima (16.100±915 vs. 8.300±580 cpm/celda; p<0,05), sin cambios en los valores de ED<sub>50</sub> para cada péptido.

Diferentes dosis de MIX (0,01-0,5 mM) produjeron una amplificación similar del efecto de insulina (1µg/ml) sobre la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina (datos no mostrados). No se detectaron señales de toxicidad a ninguna de las concentraciones de MIX al observar las células al microscopio.



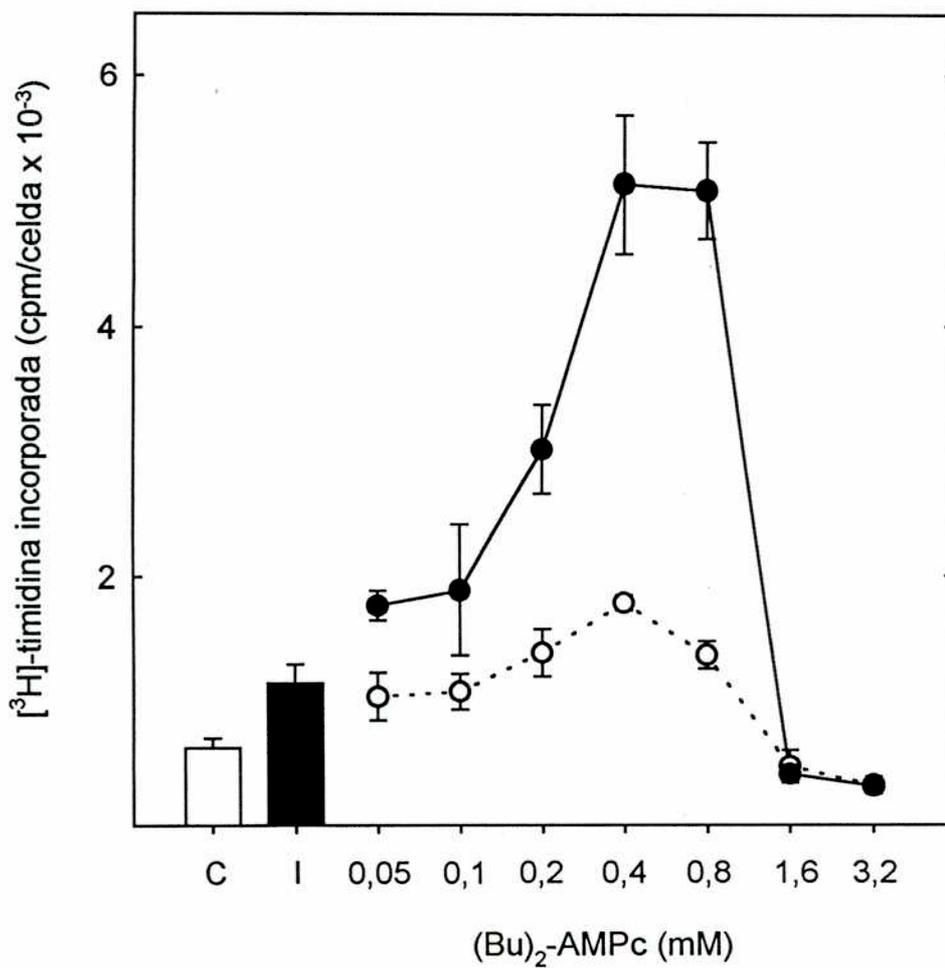
**Figura 2.1**

Efectos de insulina y de IGF-I sobre la síntesis de ADN de las células de la granulosa. Las células de la granulosa fueron aisladas de animales tratados con DES durante 3 días y cultivadas en presencia de concentraciones crecientes de insulina (□, ■) o de IGF-I (○, ●), en presencia (■, ●) o ausencia (□, ○) de MIX (0,1mM). Se determinó la timidina tritiada incorporada entre las 24 y las 48 horas de cultivo. Los resultados fueron expresados en cpm promedio  $\pm$  ES, n=3.

## Acción de AMPc

Con el objeto de evaluar si la amplificación producida por MIX podría estar mediada por el incremento de los niveles de AMPc, estudiamos el efecto de  $(\text{Bu})_2\text{AMPc}$  sobre la acción estimuladora de la síntesis de ADN de insulina ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) e IGF-I ( $100 \text{ ng/ml}$ ). En presencia de insulina, dosis crecientes de  $(\text{Bu})_2\text{AMPc}$  produjeron un efecto bifásico sobre la síntesis de ADN (Figura 2.2). Una amplificación del efecto de insulina se observó en el rango de  $0,2\text{-}0,5 \text{ mM}$ , mientras que concentraciones mayores que  $1 \text{ mM}$  del análogo de AMPc produjeron una marcada inhibición de la incorporación de  $[^3\text{H}]$ -timidina. En ausencia de insulina, el  $(\text{Bu})_2\text{AMPc}$  ( $0,4\text{-}1 \text{ mM}$ ) estimuló la incorporación de  $[^3\text{H}]$ -timidina ( $p < 0,05$ ), y este efecto revirtió parcialmente a concentraciones mayores.

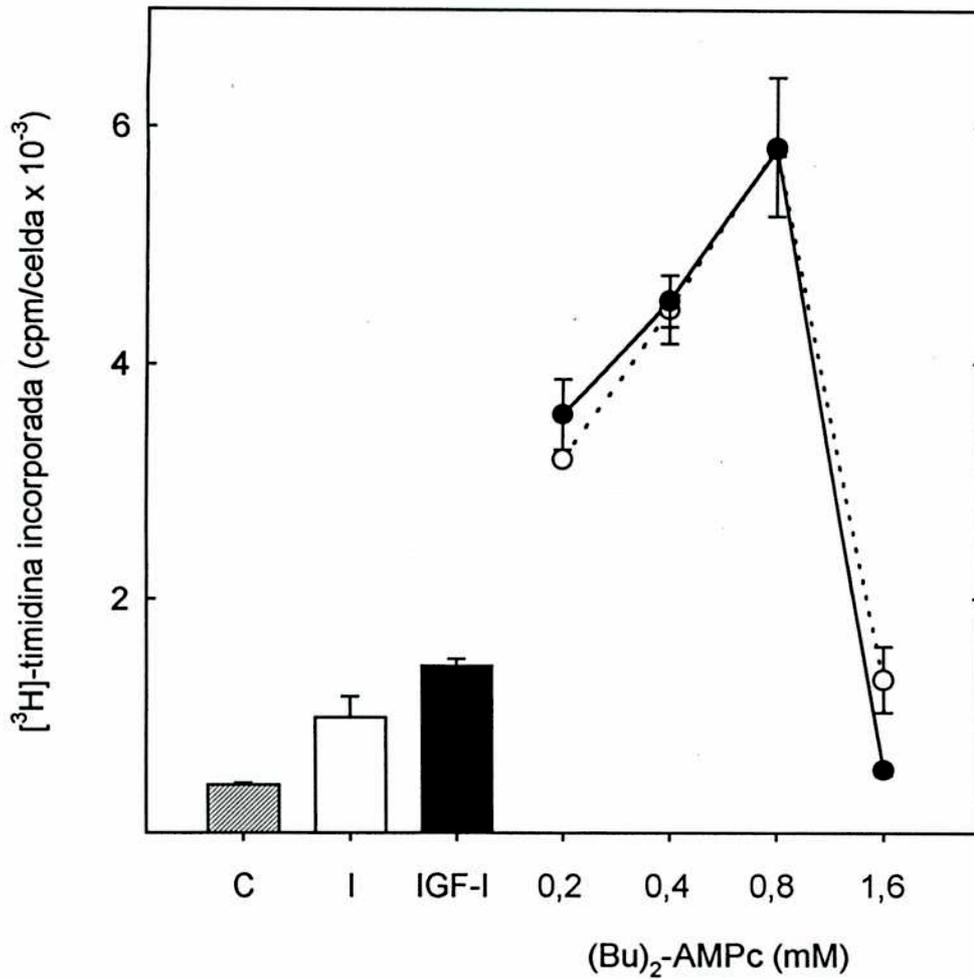
Cultivos tratados con  $1 \mu\text{g/ml}$  de insulina o con  $100 \text{ ng/ml}$  de IGF-I produjeron curvas dosis-repuesta similares en presencia de diferentes concentraciones de  $(\text{Bu})_2\text{AMPc}$  (Figura 2.3).



## Figura 2.2

### Efecto de AMPc sobre la síntesis de ADN estimulada por insulina.

Las células de la granulosa fueron aisladas de animales tratados con DES durante 3 días y cultivadas en presencia (●) y ausencia (○) de insulina (1 μg/ml), con concentraciones crecientes de (Bu)<sub>2</sub>AMPc. Se determinó la timidina tritiada incorporada entre las 24 y las 48 horas de cultivo. Los resultados fueron expresados en cpm promedio ± ES, n=3.



### Figura 2.3

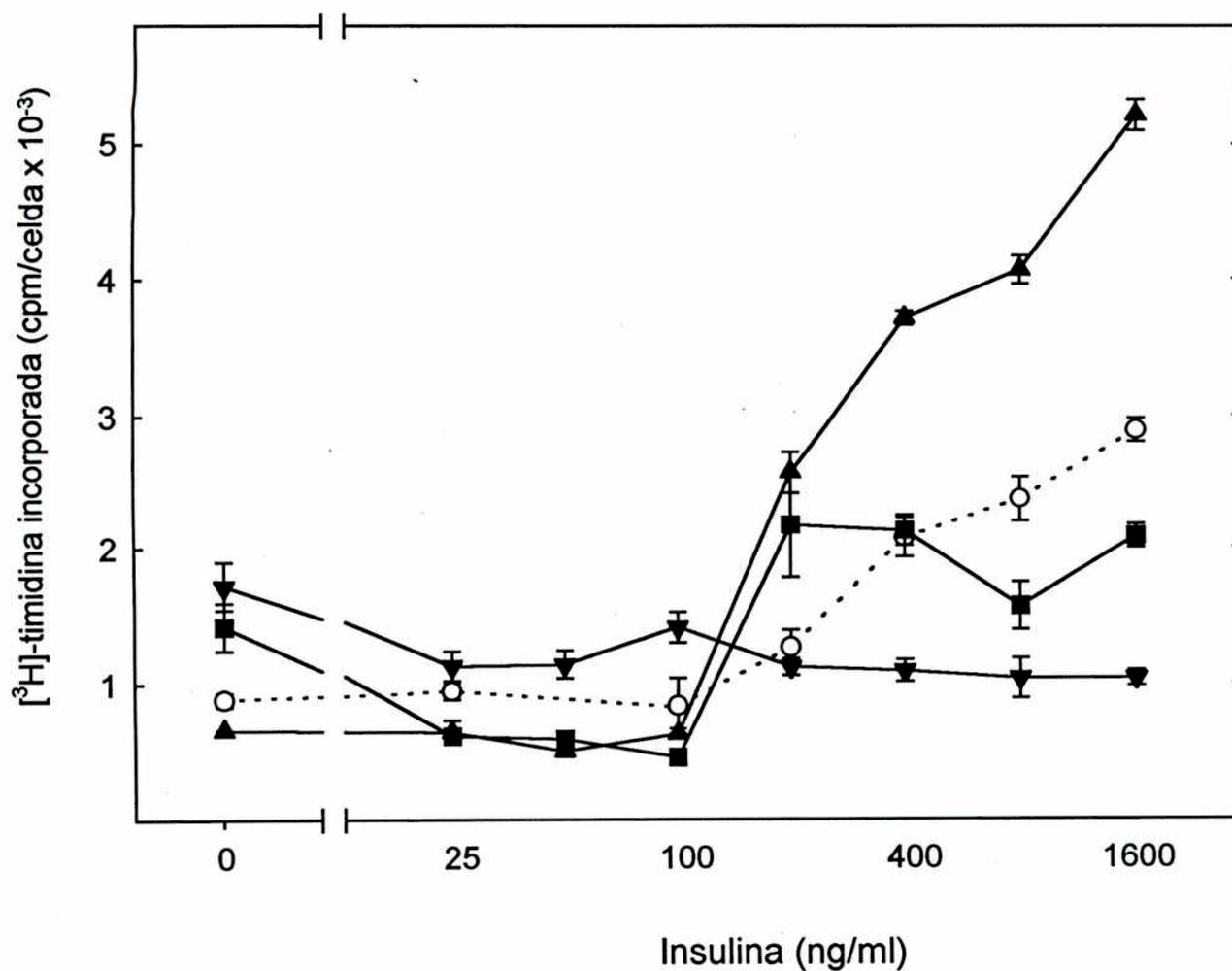
#### Efecto de AMPC: comparación entre la interacción con insulina y con IGF-I.

Las células de la granulosa fueron aisladas de animales tratados con DES durante 3 días y cultivadas con concentraciones crecientes de (Bu)<sub>2</sub>AMPC, en presencia de 1 μg/ml de insulina (o) y 100 ng/ml de IGF-I (●). Se determinó la timidina tritiada incorporada entre las 24 y las 48 horas de cultivo. Los resultados fueron expresados en cpm promedio ± ES, n=3.

## Acción de FSH

*A posteriori* estudiamos el posible sinergismo entre FSH e insulina o IGF-I. Las células fueron cultivadas con diferentes dosis de insulina a tres concentraciones de FSH (Figura 2.4). FSH a 2 ng/ml produjo una amplificación significativa ( $p < 0,05$ ) del efecto de insulina sobre la síntesis de ADN. Este efecto se produjo sin una alteración significativa de la  $ED_{50}$  para insulina (control:  $364 \pm 70$ , FSH-2 ng/ml:  $249 \pm 50$  ng/ml;  $p > 0,1$ ). A una concentración de 20 ng/ml, la FSH no modificó significativamente la respuesta a insulina, pero a 200 ng/ml inhibió completamente el efecto estimulador de esta hormona. En ausencia de insulina, 200 ng/ml de FSH produjeron un leve incremento en la incorporación de [ $^3$ H]-timidina.

El efecto bifásico de la FSH sobre la estimulación de la síntesis de ADN por insulina se corroboró mediante determinación del índice de marcación. Los resultados se exponen en la Tabla 2.1 y podemos observar que 2 ng/ml de FSH produjeron una amplificación sensible de la estimulación debida a insulina, mientras que a la mayor concentración no hubo diferencia con la estimulación observada en los cultivos con insulina sola. El bajo porcentaje de células marcadas indica que sólo una parte de la población de las células de la granulosa sintetiza ADN en condiciones basales y que la adición de hormonas sólo induce la entrada en fase S de una pequeña fracción de células.



**Figura 2.4**

**Efecto de FSH sobre la síntesis de ADN estimulada por insulina.**

Las células de la granulosa fueron aisladas de animales tratados con DES durante 3 días y cultivadas en ausencia (Controles: O) y en presencia de diferentes dosis de oFSH-16 (2 ng/ml: ▲, 20 ng/ml: ■ y 200 ng/ml: ▼), en combinación con concentraciones crecientes de insulina. Se determinó la timidina tritiada incorporada entre las 24 y las 60 horas de cultivo. Los resultados fueron expresados en cpm promedio  $\pm$  ES,  $n=3$ .

FSH (ng/ml)	% núcleos marcados	
	Control	Insulina
0	10,41a	14,7b
2	9,9a	23,6c
200	6,8d	7,9a,d

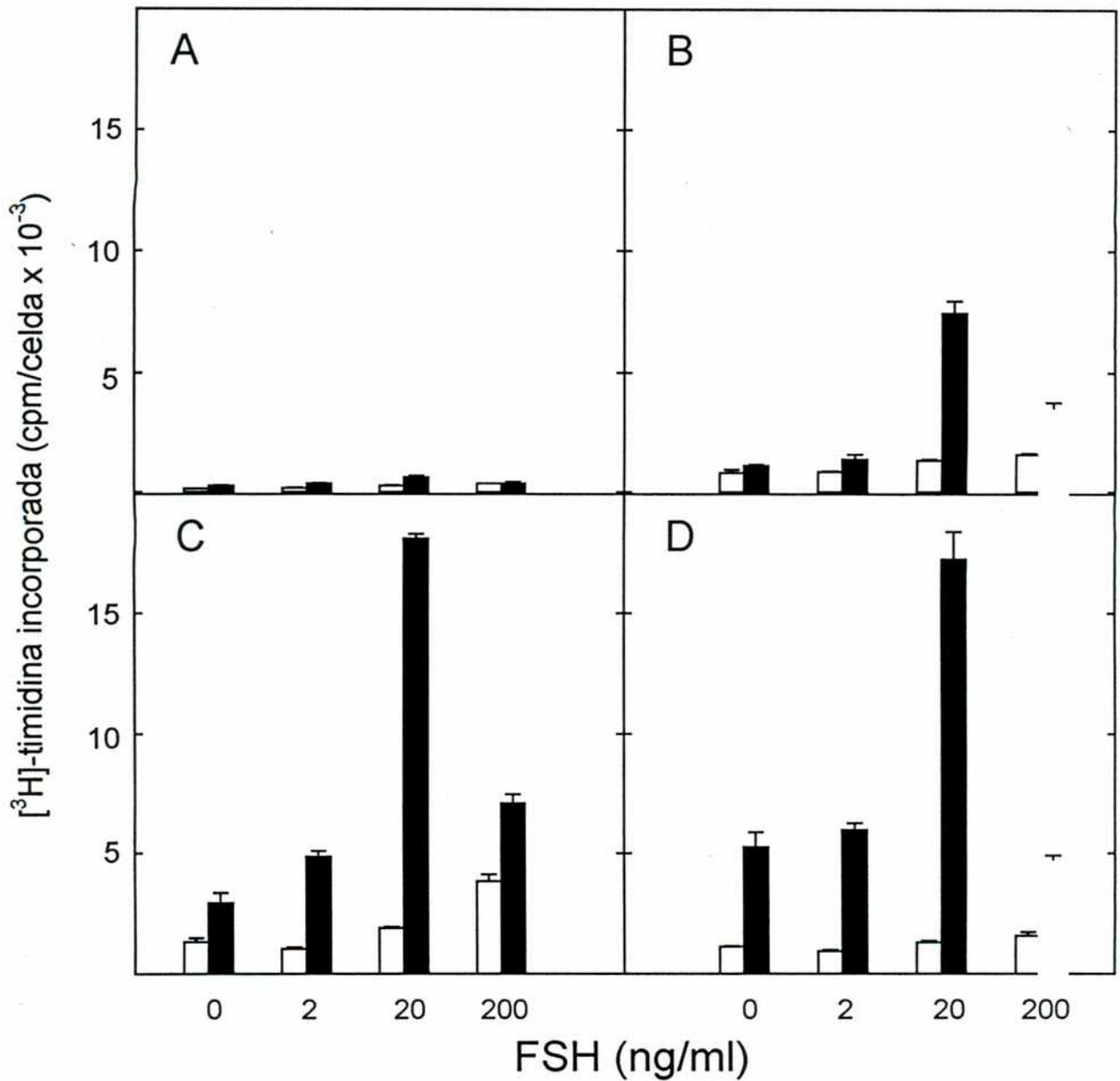
**Tabla 2.1:**

**Efecto de FSH e insulina sobre la síntesis de ADN: demostración autorradiográfica.**

Las células de la granulosa fueron cultivadas con dos dosis de FSH (oFSH-16) en presencia o ausencia de insulina. Se determinó la timidina tritiada incorporada entre las 24 y las 60 horas de cultivo. El porcentaje de núcleos marcados fue determinado por conteo de al menos 500 células en cultivos por duplicado. Los valores que comparten la misma letra no fueron significativamente diferentes ( $p > 0,05$ , test de  $\chi^2$ ).

## **La densidad celular afecta la interacción entre FSH e IGF-I.**

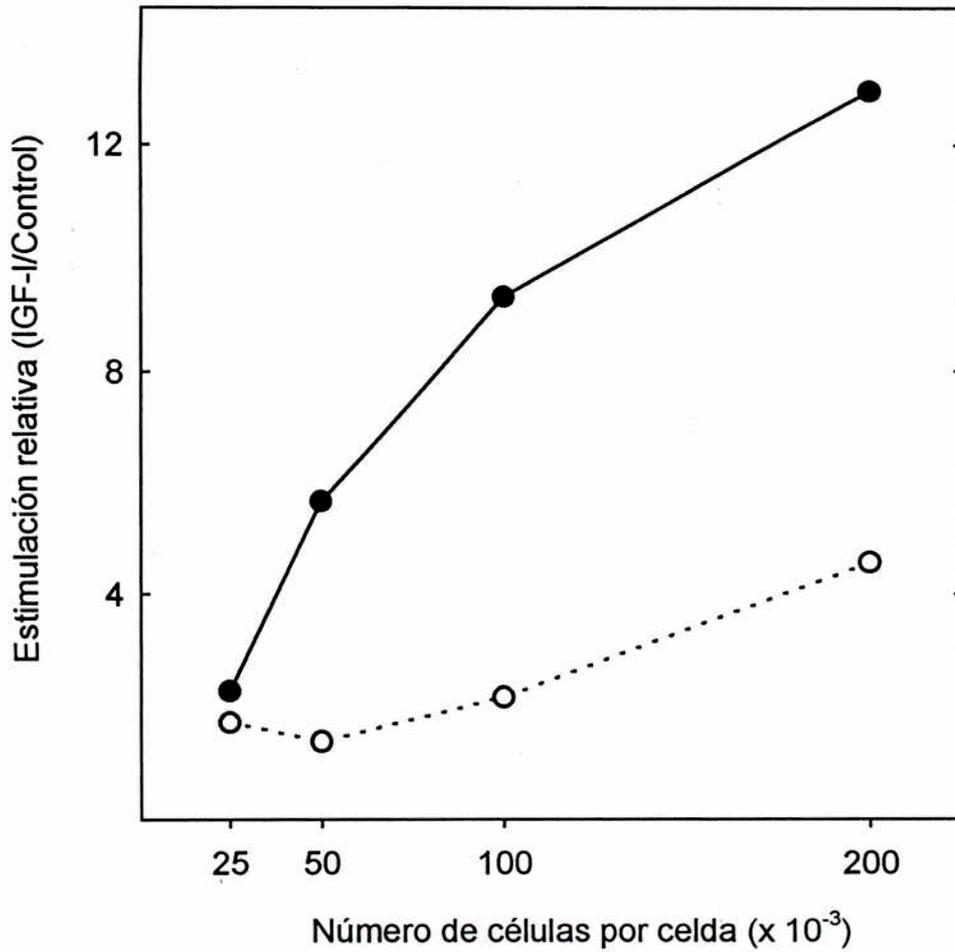
Los efectos de FSH sobre la síntesis de ADN estimulada por IGF-I fueron comparables a los observados con insulina. Tanto la estimulación por IGF-I como la modulación por FSH se vió afectada por la densidad celular de los cultivos (Figura 2.5). La incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina, expresada como cuentas por minuto/10<sup>4</sup> células, en cultivos tratados con IGF-I y 20 ng/ml fueron de 247±27 y 1810±18 para densidades de plaqueo de 25 y 100 mil células/celda, respectivamente. Como puede verse en la figura 2.6, la amplificación por FSH del efecto de IGF-I se observó a densidades superiores a 25 mil células/celda (7,8 x 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>).



## Figura 2.5

### Efecto de la densidad celular sobre la interacción entre FSH e IGF-I.

Las células de la granulosa fueron aisladas de animales tratados con DES durante 3 días y plaqueadas a diferentes densidades celulares: (A)=25, (B)=50, (C)=100 y (D)=200 mil células por celda. Las células fueron cultivadas en ausencia (barras vacías) y en presencia (barras llenas) de IGF-I (100ng/ml), en combinación con diferentes dosis de FSH (oFSH-17). Se determinó la timidina tritiada incorporada entre las 24 y las 48 horas de cultivo. Los resultados fueron expresados en cpm promedio  $\pm$  ES, n=3.



## Figura 2.6

### Efecto de la densidad celular sobre la interacción entre FSH e IGF-I.

Este gráfico muestra los resultados obtenidos en el experimento graficado en la Figura 2.5 en ausencia de FSH (○) y en presencia de 20 ng/ml FSH (●), expresados como cocientes entre los valores de timidina tritiada incorporada en presencia y en ausencia de IGF-I (100ng/ml), en función de la densidad celular.

## CONCLUSIONES

Se ha descrito que la insulina y el IGF-I estimulan la síntesis de ADN de células de la granulosa porcinas, bovinas y humanas (136, 69, 139). Sin embargo, numerosos laboratorios han reportado que ambos péptidos no fueron capaces de estimular la proliferación de las células de la granulosa de rata (64, 140), y por este motivo la validez general de la acción mitogénica de la insulina y el IGF-I ha sido cuestionada (65).

El sistema de cultivo de células de la granulosa de rata desarrollado en nuestro laboratorio nos ha permitido observar que la insulina incrementa marcadamente la síntesis de ADN. La optimización del medio nutriente, la cobertura de las placas de cultivo con colágeno, altas densidades de plaqueo y una ventana de tiempo adecuada para las mediciones de incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina, probablemente constituyen factores fundamentales para evidenciar los efectos mitogénicos.

Utilizando este sistema, hemos demostrado que el IGF-1 fue más potente que la insulina al estimular la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina. Esta observación es consistente con las potencias relativas de ambos péptidos en la estimulación de la síntesis de ADN en células de la granulosa porcinas (136).

Los valores de ED<sub>50</sub> para cada péptido pueden estar sobreestimados debido a la degradación en el medio de cultivo. Es por esto que, basados en los presentes resultados, no podemos asegurar que el efecto de insulina esté mediado por la interacción con su receptor y no con el receptor homólogo de tipo I de IGF-I (141).

La amplificación de los efectos de insulina y de IGF-I observada en presencia de MIX puede estar mediada por pequeños incrementos del AMPc endógeno debido a la inhibición de la actividad fosfodiesterasa o a un efecto no específico no relacionado con cambios en los niveles de este nucleótido cíclico.

Evidencia de esta última posibilidad ha sido presentada por Weinenberg-Ohana y col.(142), quienes demostraron efectos sobre la diferenciación de las células de la granulosa a concentraciones de MIX que no alteran significativamente los niveles de AMPc intracelular.

En otros tipos celulares la amplificación observada de los efectos de la insulina parece deberse a cambios en los niveles de calcio intracelular (143). Si bien las acciones directas de MIX no pueden descartarse, el hecho que bajas concentraciones de un análogo del AMPc, el (Bu)<sub>2</sub>AMPc, fueran capaces de aumentar las acciones de la insulina y del IGF-I, sugiere que el efecto de MIX está mediado por un incremento del AMPc intracelular.

La función del AMPc como regulador de la proliferación celular no ha sido claramente establecida. Se han descrito efectos estimulatorios e inhibitorios sobre la síntesis de ADN, dependiendo del tipo celular (144)). Los efectos estimulatorios se han evidenciado casi siempre como producto de un sinergismo con mitógenos polipeptídicos (144). En esta tesis, si bien hemos observado una leve estimulación tanto con FSH como con (Bu)<sub>2</sub>AMPc solos, sus efectos se han visto marcadamente amplificados en presencia de insulina o de IGF-I. Más aún, es posible que incluso en ausencia de estos péptidos, la FSH o el (Bu)<sub>2</sub>AMPc

estén interactuando con el IGF-I producido endógenamente por las células de la granulosa en los cultivos (80).

El aumento de la acción del IGF-I sobre la síntesis de ADN podría deberse en parte a la inducción de receptores de tipo I, ya que un incremento de la unión de somatomedina-C ha sido descrita para células de la granulosa de rata estimuladas con FSH o AMPc (145).

Sin embargo, nuestra observación de una amplificación similar de los efectos de IGF-I y de insulina a una concentración de este último péptido que no produciría una marcada interacción con los receptores de tipo I (141) y la ausencia de cambios significativos en los valores de ED<sub>50</sub>, sugieren que el efecto sinérgico ocurre a un nivel posterior al de interacción con el receptor.

En este sentido, el efecto de FSH sobre la síntesis de ADN de las células de la granulosa estimulada por insulina/IGF-I asemeja al de TSH observado sobre tirocitos caninos y sobre una línea de células tiroideas de rata: FRTL-5 (144). En este último sistema, Takahashi y cols. (146) propusieron que la potenciación del efecto mitogénico de IGF-I por TSH podría estar mediada por un factor de amplificación autocrino.

La secreción de un factor autocrino explicaría la amplificación de la interacción entre FSH e IGF-I que hemos observado al aumentar la densidad celular de los cultivos de células de la granulosa de rata.

Más recientemente se ha descrito una interacción entre AMPc y la vía de trasducción de señales del IGF-I a nivel de la fosforilación de su receptor en tirosina en células FRTL-5 (147).

*La interacción entre ambas vías en la regulación de la proliferación celular puede ocurrir también a niveles posteriores, como los del control de la expresión de proteínas específicas involucradas en la respuesta proliferativa (148).*

Al respecto, hemos demostrado recientemente que, bajo las condiciones experimentales de este trabajo, la actividad de ADN-topoisomerasa I, una enzima requerida para la replicación del ADN, fue estimulada por FSH y (Bu)<sub>2</sub>AMPc, mientras que la insulina no tuvo efecto (149).

Los efectos tanto de FSH como de (Bu)<sub>2</sub>AMPc sobre la síntesis de ADN estimulada por insulina/IGF-I presentan un comportamiento bifásico, siendo las dosis más altas comparativamente menos efectivas o aún inhibitorias.

Este tipo de efecto bifásico ha sido descrito previamente para análogos de AMPc en otros tipos celulares, como las células BHK y células BALB 3T3 (150).

Además, Adashi y col.(151) describieron que la modulación que ejerce la FSH sobre la liberación de las proteínas ligadoras de IGF-I (IGF-BP) por parte de las células de la granulosa de rata en cultivo sería también de naturaleza bifásica.

Sin embargo, la modulación por FSH de la actividad mitogénica de IGF-I no parece estar vinculada a la biodisponibilidad de este factor de crecimiento, ya que

resultados similares fueron obtenidos con insulina, la cual no interactúa con estas proteínas ligadoras (89).

A pesar de ello, no puede descartarse una función de estas proteínas ligadoras, en vista de la evidencia de un efecto, independiente de IGF-I, de estas proteínas sobre la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina en cultivos de células de la granulosa estimuladas por FSH (152).

Dorrington y col. informaron que la FSH, sin tener un efecto *per se*, amplificó la acción estimuladora de TGFβ sobre la síntesis de ADN de células de la granulosa de rata (153).

Estos investigadores no observaron una estimulación significativa de la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina con IGF-I ni con la asociación de IGF-I con FSH.

Como ya fue discutido, diversos factores podrían ser responsables de las discrepancias en los efectos observados de FSH e insulina/IGF-I sobre la síntesis de ADN. Más aún, hemos observado que las dosis óptimas para detectar una amplificación del efecto de insulina/IGF-I puede variar entre diferentes preparaciones de FSH (2 y 20 ng/ml para oFSH-16 y oFSH-17, respectivamente).

Por otro lado, si bien la insulina, el IGF-I y dosis bajas de (Bu)<sub>2</sub>AMPc, son capaces de producir incrementos significativos de la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina, cuando son agregados por separado, la magnitud de estas respuestas varía enormemente entre distintos preparaciones de células. En cambio, el efecto máximo observado con asociaciones de insulina/IGF-I con FSH o AMPc fue comparativamente más reproducible.

Nuestra interpretación de estas observaciones es que la variación de la respuesta a un estímulo aislado, entre distintas preparaciones celulares, puede ser producto de diferencias en los niveles basales de AMPc intracelular o de IGF-I endógeno, que podrían interactuar con la insulina/IGF-I y con AMPc agregados, respectivamente.

En este contexto es difícil asegurar cuál es el estímulo primario para la proliferación de las células de la granulosa. Sin embargo, es presumible que, como ha sido descrito para una variedad de tipos celulares (144), la función del AMPc sea la de aumentar el efecto mitogénico de insulina/IGF-I.

El requerimiento de la asociación de FSH a insulina para la estimulación de la síntesis de ADN de las células de la granulosa descrito en este trabajo, sería congruente con los resultados obtenidos con ovarios inmaduros de rata perfundidos en cultivo (154).

En este sistema, la FSH produjo un aumento transiente de la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina cuando fue agregada sola y amplificó el efecto estimulador de insulina después de 24 horas de perfusión.

Se han acumulado evidencias que indican que el IGF-I cumple una función clave como regulador intraovárico del desarrollo folicular. La mayoría de los estudios sobre la acción de IGF-I se han ocupado de la amplificación que produce sobre la diferenciación celular inducida por FSH (65).

Los resultados presentados en esta tesis sugieren que la interacción entre FSH e IGF-I también estaría involucrada en la regulación de la proliferación de las

células de la granulosa. En este sentido, la acción mitogénica de la FSH estaría involucrando, no solo la estimulación de la producción de IGF-I por las células de la granulosa (80), sino también la modulación del efecto mitogénico de este factor a través de un mecanismo mediado por AMPc.

## ***CAPITULO 3***

## ACCION CONCERTADA DE GONADOTROFINAS Y ESTEROIDES

En contraste con los efectos establecidos de los factores de crecimiento peptídicos sobre la proliferación de las células de la granulosa *in vitro* (61), la acción de las gonadotrofinas y de los estrógenos, conocidas como las principales hormonas tróficas involucradas en el control del crecimiento folicular *in vivo* (55,57) ha sido difícil de demostrar en células de la granulosa *in vitro*.

Sobre esta base, se ha considerado que los efectos de FSH y estradiol sobre la proliferación de las células de la granulosa están mediados por factores de crecimiento peptídicos producidos localmente (61). En este sentido ya hemos observado que:

- 1) El tratamiento con estradiol sensibiliza a las células de la granulosa de rata al efecto mitogénico de la insulina y al efecto de un factor de crecimiento derivado de células tecales/intersticiales.
- 2) La FSH ejerce un efecto co-mitogénico con IGF-I a través de un mecanismo mediado por AMPc .

En estudios más recientes hemos encontrado que ,si bien la FSH y el estradiol no tienen efecto cuando se agregan separadamente al cultivo, la combinación de ambas hormonas produce una marcada estimulación de la síntesis de ADN de las células de la granulosa de rata (156).

## RESULTADOS

### Interacción entre FSH y estradiol: Curvas de tiempo.

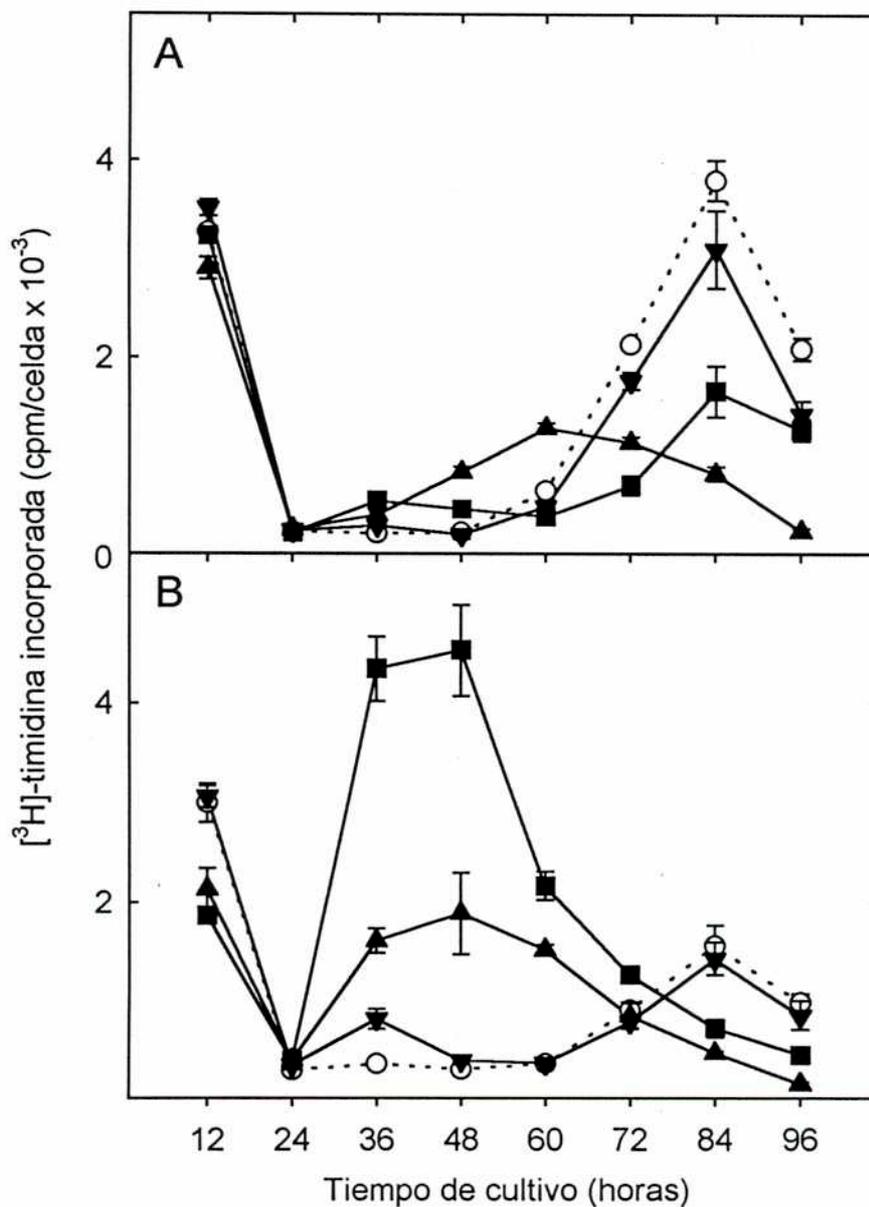
La Figura 3.1 nos muestra las curvas de tiempo de incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-timidina a células de la granulosa de rata tratadas con dosis crecientes de FSH, en presencia y ausencia de estradiol. Puede observarse cómo, en ausencia de estradiol o FSH, los niveles de incorporación caen desde los valores comparativamente altos observados inmediatamente después del plaqueo; hasta un nivel basal bajo y comienzan a aumentar después de las 60 horas de cultivo.

Dosis crecientes de FSH producen una disminución progresiva de la incorporación global. A la dosis máxima utilizada (200 ng/ml) se observa un leve incremento en la velocidad de incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-timidina, que ya comienza a aumentar respecto del nivel basal entre las 48 y las 60 horas posteriores al plaqueo.

La presencia de estradiol en los cultivos, no induce cambios evidentes en el perfil de la curva de tiempo, pero los niveles máximos alcanzados entre las 60 y 96 horas se reducen al 60% (comparar los paneles superior e inferior de la figura).

Sin embargo, en presencia de estradiol se observa un notable cambio en la respuesta de las células a FSH. En presencia del esteroide, una dosis de 20 ng/ml de FSH produce un incremento dramático de la incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-timidina observado después de las 24 horas. Este efecto, aunque menos pronunciado, se observa también a la dosis máxima (200 ng/ml).

Basados en estos resultados, la incorporación de timidina se llevó a cabo entre las 24 y las 48 horas posteriores al plaqueo, en todos los experimentos subsiguientes.



### Figura 3.1

#### Interacción entre FSH y estradiol: Curvas de tiempo.

Las células de la granulosa fueron aisladas de animales tratados con DES durante 3 días y cultivadas en ausencia (panel A) y en presencia (panel B) de estradiol (100ng/ml), con dosis crecientes de FSH: 2 ng/ml (▼) ; 20 ng/ml (■) y 200 ng/ml (▲) y grupos controles (○). Se determinó la incorporación de timidina tritiada durante períodos consecutivos de 12 horas. Los resultados fueron expresados en cpm por celda  $\pm$  ES, (n=3) y corresponden a un experimento representativo de tres experimentos diferentes.

## **Interacción entre FSH y otros esteroides sexuales**

### **Efecto de andrógenos aromatizables.**

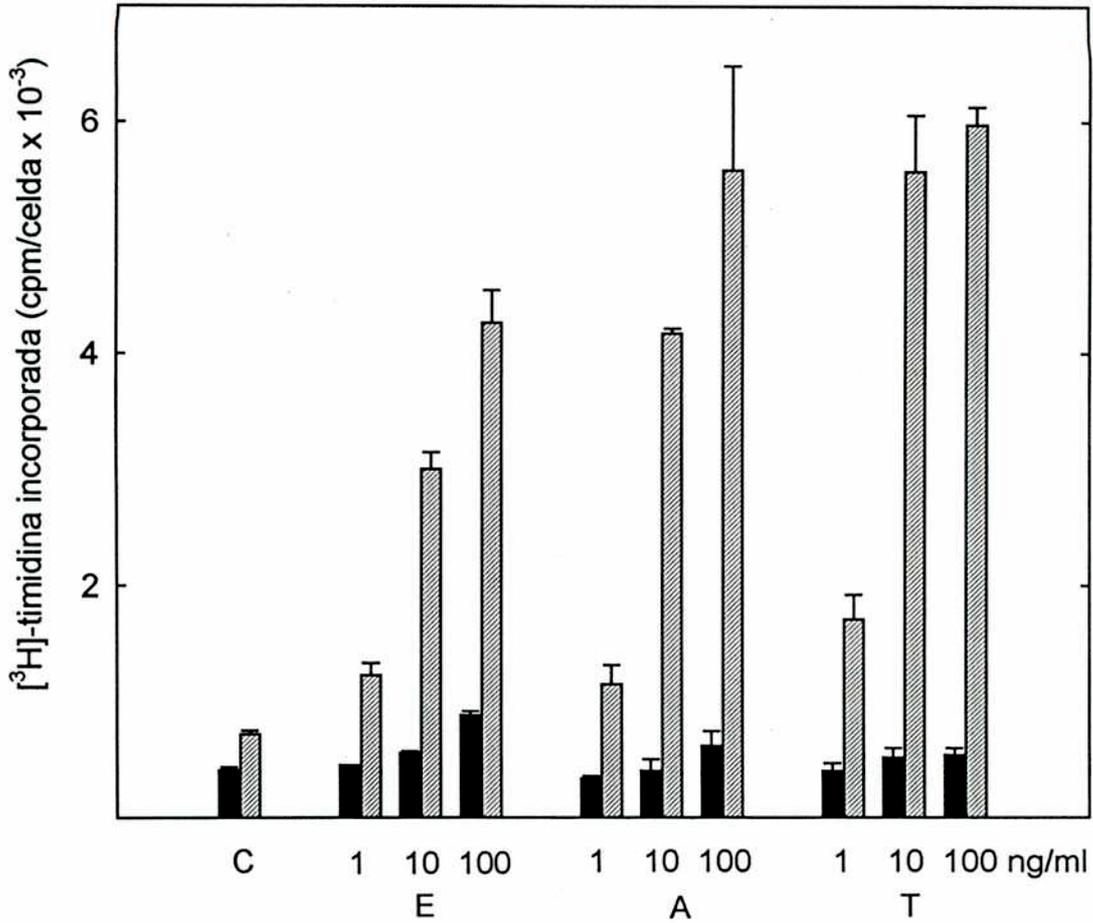
Con el objeto de evaluar la especificidad del efecto estrogénico comparamos la capacidad de diferentes esteroides para interactuar con una dosis óptima de FSH en la estimulación de la síntesis de ADN.

Los andrógenos aromatizables como androstenodiona y testosterona resultaron tan potentes como el estradiol en la estimulación de la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina (Figura 3.2).

### **Efecto de andrógenos 5 $\alpha$ -reducidos.**

De modo similar y para nuestra sorpresa, los andrógenos 5 $\alpha$ -reducidos como la 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona, 5 $\alpha$ -androstano-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol y androsterona también fueron capaces de interactuar de manera sinérgica con FSH (Figura 3.3). Comparando las curvas de dosis-repuesta para estradiol y dihidrotestosterona (figura 3.4) no se observan diferencias significativas en las ED<sub>50</sub> de ambos esteroides (10 $\pm$ 5 ng/ml).

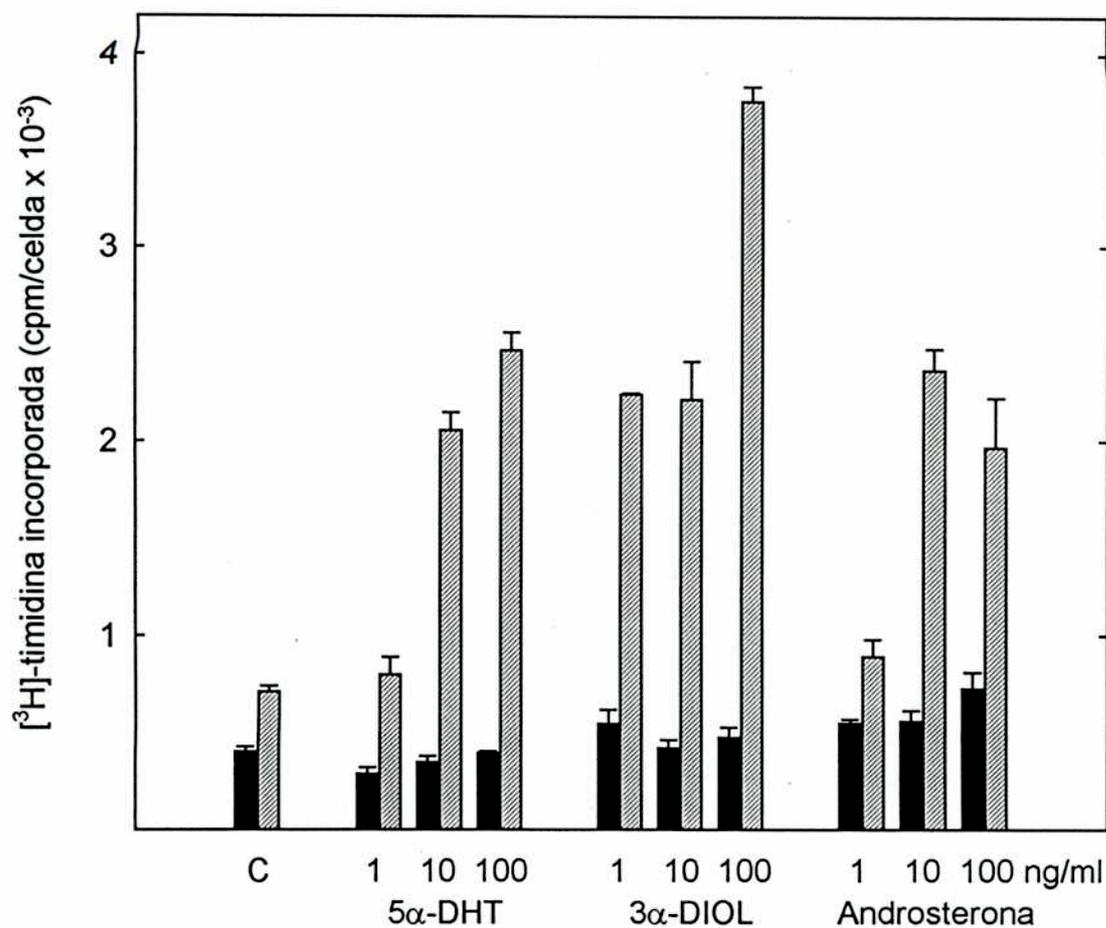
Ni el estereoisómero 5 $\beta$  de la dihidrotestosterona (5 $\beta$ -androstan-17 $\beta$ -ol,3-ona, Figura 5), ni el epímero 17 $\beta$  de la testosterona (datos no mostrados) evidenciaron interacción significativa con FSH.



### Figura 3.2

#### Efecto de andrógenos aromatizables.

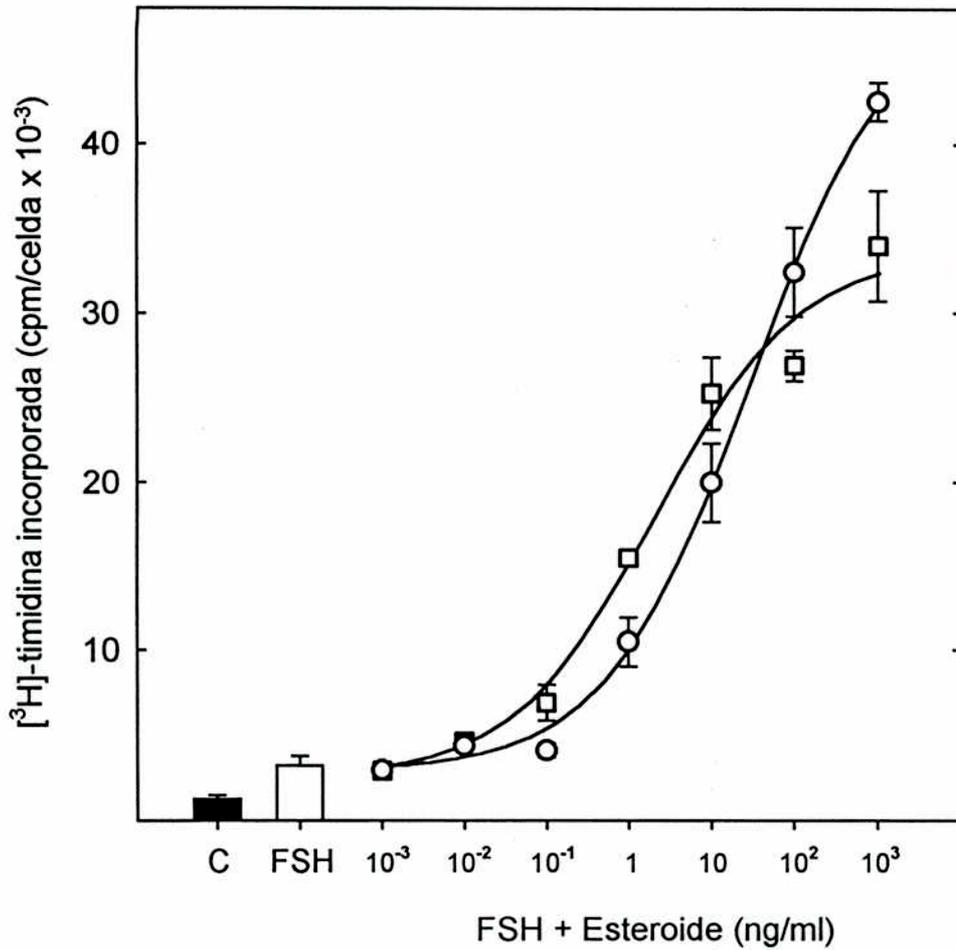
Las células de la granulosa fueron aisladas de animales tratados con DES durante 3 días y cultivadas con dosis crecientes (1 a 100 ng/ml) de estradiol (E), androstenediona (A) y testosterona (T), en ausencia (barras llenas) y en presencia (barras rayadas) de FSH (20 ng/ml). Se determinó la timidina tritiada incorporada entre las 24 y las 48 horas de cultivo. Los resultados fueron expresados en cpm promedio  $\pm$  ES, n=3.



### Figura 3.3

#### Efecto de andrógenos 5α-reducidos.

Las células de la granulosa fueron aisladas de animales tratados con DES durante 3 días y cultivadas con dosis crecientes (1 a 100 ng/ml) de 5α-dihidrotestosterona (5α-DHT), 5α-androstano-3α,17β-diol (5α-DIOL) y androsterona, en ausencia (barras llenas) y en presencia (barras rayadas) de FSH (20 ng/ml). Se determinó la timidina tritiada incorporada entre las 24 y las 48 horas de cultivo. Los resultados fueron expresados en cpm promedio ± ES, n=3.



### Figura 3.4

#### Curvas dosis respuesta de esteroides: interacción con FSH.

Las células de la granulosa fueron aisladas de animales tratados con DES durante 3 días y cultivadas en presencia de concentraciones crecientes de estradiol ( $\square$ ) y de 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (O), en presencia de FSH (20ng/ml). Se determinó la timidina tritiada incorporada entre las 24 y las 48 horas de cultivo. Los resultados fueron expresados en cpm promedio  $\pm$  ES, n=3.

### **Efecto de progestágenos**

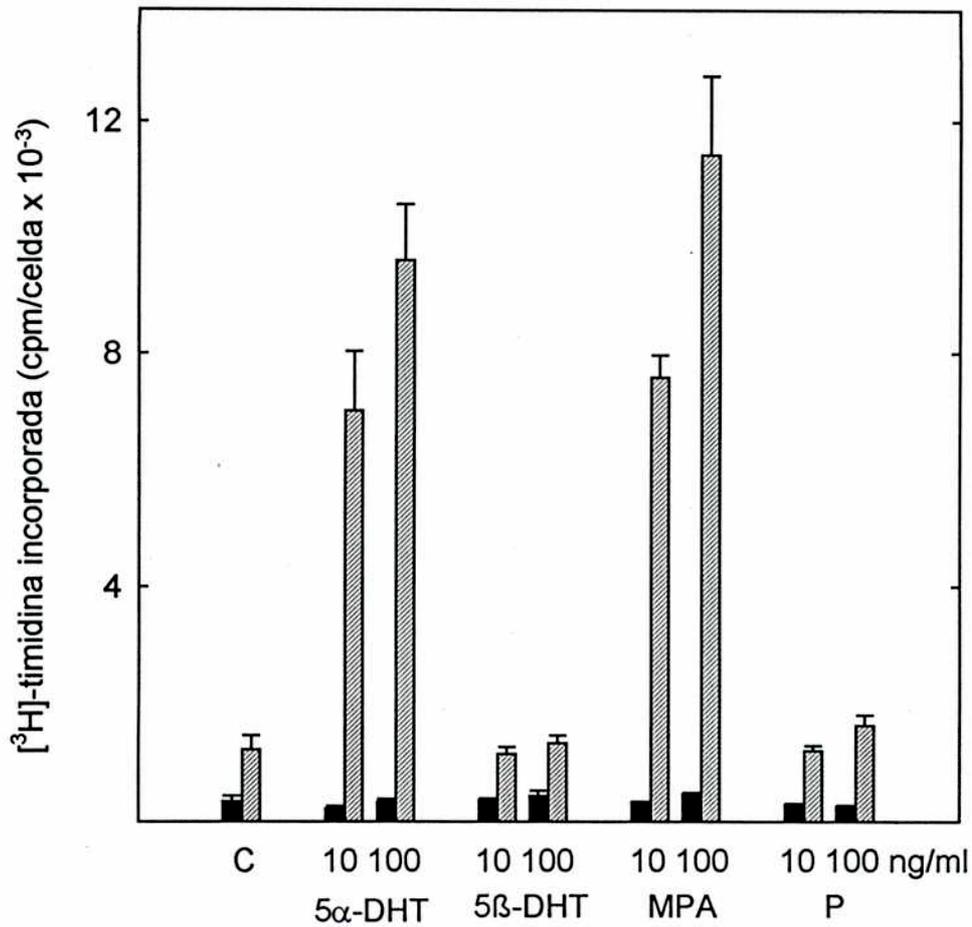
El esteroide sintético MPA, que ha demostrado actuar como andrógeno, como progestágeno y como glucocorticoide (157,158), interactuó con FSH evidenciando una potencia comparable a la observada con DHT (Figura 3.5), mientras que, bajo las mismas condiciones, la progesterona fue completamente inefectiva.

Más aún, el agregado de progesterona (100 ng/ml) no altera la respuesta de las células a FSH observada en presencia tanto de estradiol como de DHT (resultados no mostrados).

### **Interacción de FSH con andrógenos: bloqueo de receptores.**

Con el objeto de verificar si el sinergismo observado entre FSH y DHT está mediado por el receptor de andrógenos ensayamos el efecto del antiandrógeno puro hidroxiflutamida. Como se puede observar en la Figura 3.6, este antagonista no modifica el efecto de estradiol, pero suprime completamente el efecto de DHT.

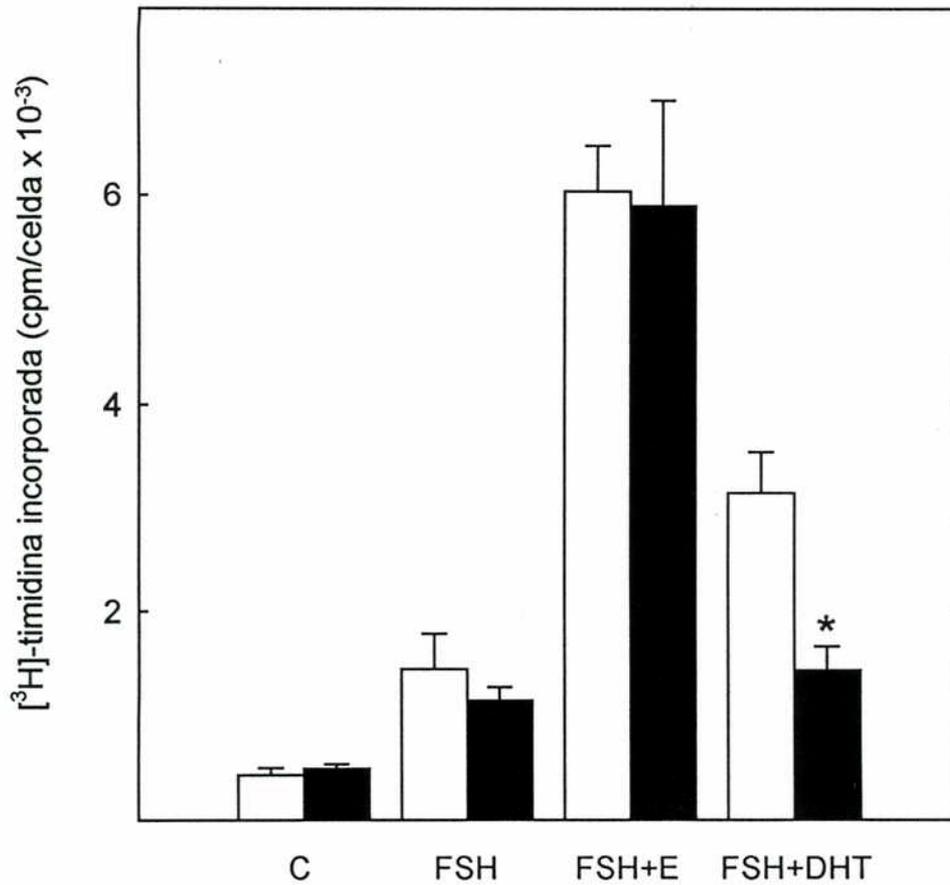
En la Tabla 3.1 se puede ver que los efectos de estradiol y DHT a dosis efectivas máximas no fueron aditivos.



### Figura 3.5

#### Efecto de andrógenos y progestágenos.

Las células de la granulosa fueron aisladas de animales tratados con DES durante 3 días y cultivadas con dos dosis (10 y 100 ng/ml) de 5α-dihidrotestosterona (5α-DHT), 5β-dihidrotestosterona (5β-DHT), acetato de medroxiprogesterona (MPA) y progesterona (P), en ausencia (barras llenas) y en presencia (barras rayadas) de FSH (20 ng/ml). Se determinó la timidina tritiada incorporada entre las 24 y las 48 horas de cultivo. Los resultados fueron expresados en cpm promedio ± ES, n=3.



### Figura 3.6

#### Bloqueo de acción androgénica.

Las células de la granulosa fueron aisladas de animales tratados con DES durante 3 días y cultivadas sin tratamiento (C), con FSH (20ng/ml, FSH) y con combinaciones de FSH y esteroides (10ng/ml, FSH+E y FSH+DHT), en ausencia (barras vacías) y en presencia (barras llenas) de hidroxiflutamida (1μg/ml). Se determinó la timidina tritiada incorporada entre las 24 y las 48 horas de cultivo. Los resultados fueron expresados en cpm promedio ± ES(n=3) y corresponden a un experimento representativo de dos experimentos diferentes.

<b>Tratamiento</b>	<b>[3H]-timidina incorporada (cpm/celda)</b>
<b>C</b>	1227 ± 244a
<b>E</b>	9269 ± 383b
<b>DHT</b>	9593 ± 973b
<b>E+DHT</b>	10652 ± 420b

**Tabla 3.1**

**Interacción entre FSH y esteroides sexuales: presencia simultánea de estradiol y DHT.**

Las células de la granulosa fueron aisladas de animales tratados con DES durante 3 días y fueron cultivadas en presencia de FSH (20ng/ml) en combinación con diferentes tratamientos: control (C), estradiol (100ng/ml, E), 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (100ng/ml, DHT) y la suma de ambos esteroides (100ng/ml c/u, E+DHT). Se determinó la timidina tritiada incorporada entre las 24 y las 48 horas de cultivo. Los resultados fueron expresados en cpm promedio  $\pm$  ES(n=3).

## **Acción de AMPc.**

Para comprobar si la interacción entre FSH y los esteroides sexuales podría estar mediada por el aumento de los niveles de AMPc, ensayamos el efecto del análogo (Bu)<sub>2</sub>AMPc en presencia de androstenodiona.

En combinación con este esteroide, dosis crecientes de (Bu)<sub>2</sub>AMPc produjeron un efecto bifásico sobre la síntesis de ADN (figura 3.7). Se observó un aumento de la incorporación de timidina en el rango de 0,1 a 0,5 mM, mientras que concentraciones superiores a 1mM del análogo produjeron una inhibición completa de la síntesis de ADN.

En ausencia de androstenodiona se observó una estimulación significativa ( $p < 0.05$ ) de la síntesis de ADN a dosis de (Bu)<sub>2</sub>AMPc entre 0,2 y 0,4 mM que revirtió a concentraciones mayores.

## **Similitud de la respuesta a hormonas proteicas y esteroides**

Como puede verse en la Figura 3.8, hay un sorprendente paralelismo entre las curvas dosis-respuesta de FSH en presencia de androstenodiona, insulina e IGF-I.

La principal diferencia observada entre las tres curvas fue que la androstenodiona no tuvo efecto en ausencia de FSH o a dosis máximas de la gonadotrofina, mientras que ese no es el caso con insulina e IGF-I.

Si bien los niveles de incorporación observados a una dosis óptima de FSH fueron similares tanto para los esteroides (estradiol y androstenodiona), como para insulina/IGF-I, los tres tipos de estímulos producen efectos superaditivos.

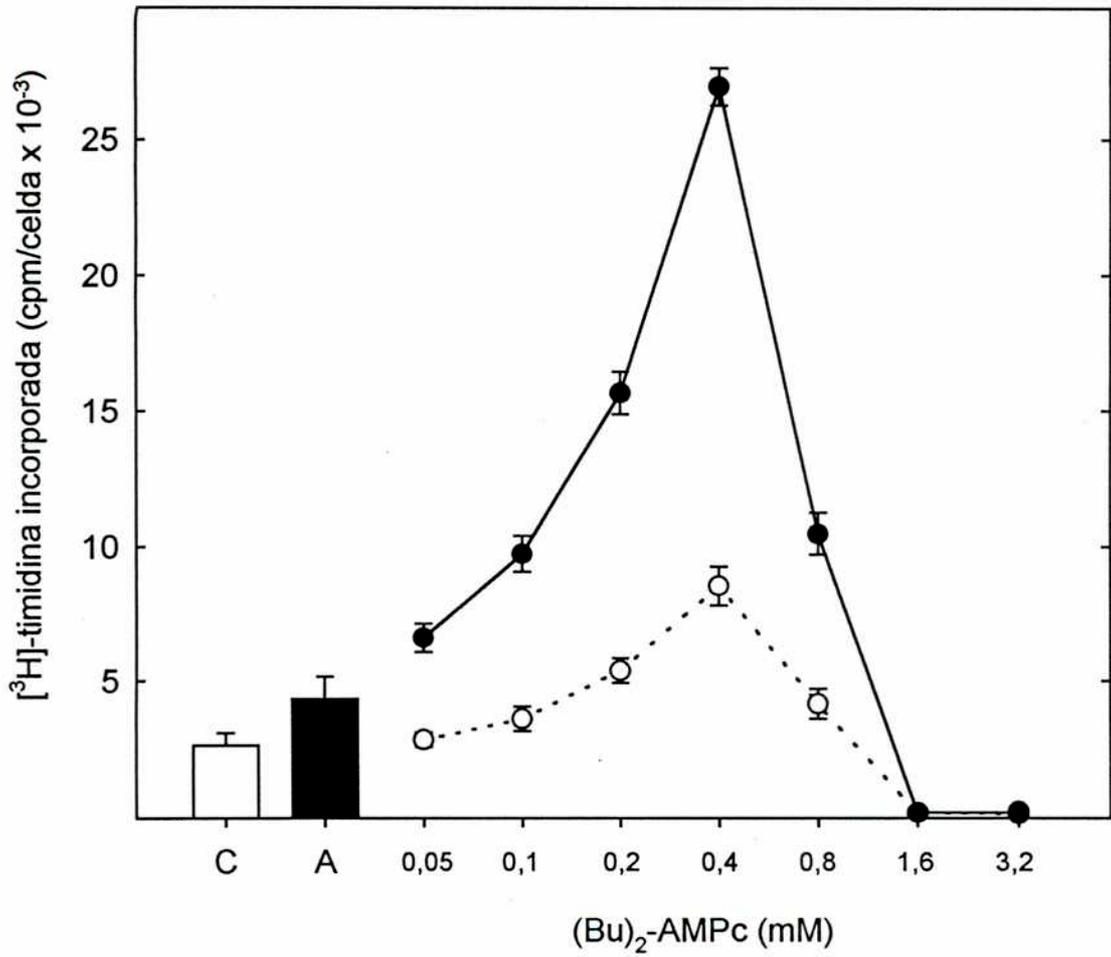
La Tabla 3.2 muestra los resultados obtenidos de cultivos de células de la granulosa tratados con diferentes combinaciones de FSH, estradiol e insulina. El efecto de la insulina fue amplificado por la FSH. La interacción entre FSH y estradiol fue aún evidente en presencia de insulina. La máxima estimulación, observada en presencia de las tres hormonas, representa un incremento de 27 veces sobre los valores basales.

### **Respuesta de diferentes subpoblaciones de células de la granulosa**

Con el objeto de determinar la existencia de subpoblaciones de células de la granulosa que presentasen una respuesta diferencial a FSH y hormonas esteroideas en términos de síntesis de ADN, se intentó la separación de las células utilizando la técnica de centrifugación en gradiente de densidad (159).

Se aislaron cinco fracciones, correspondientes a un rango de densidades entre 1,031 a 1,017 g/ml, y se cultivaron en presencia de FSH, androstenodiona y una combinación de ambas hormonas.

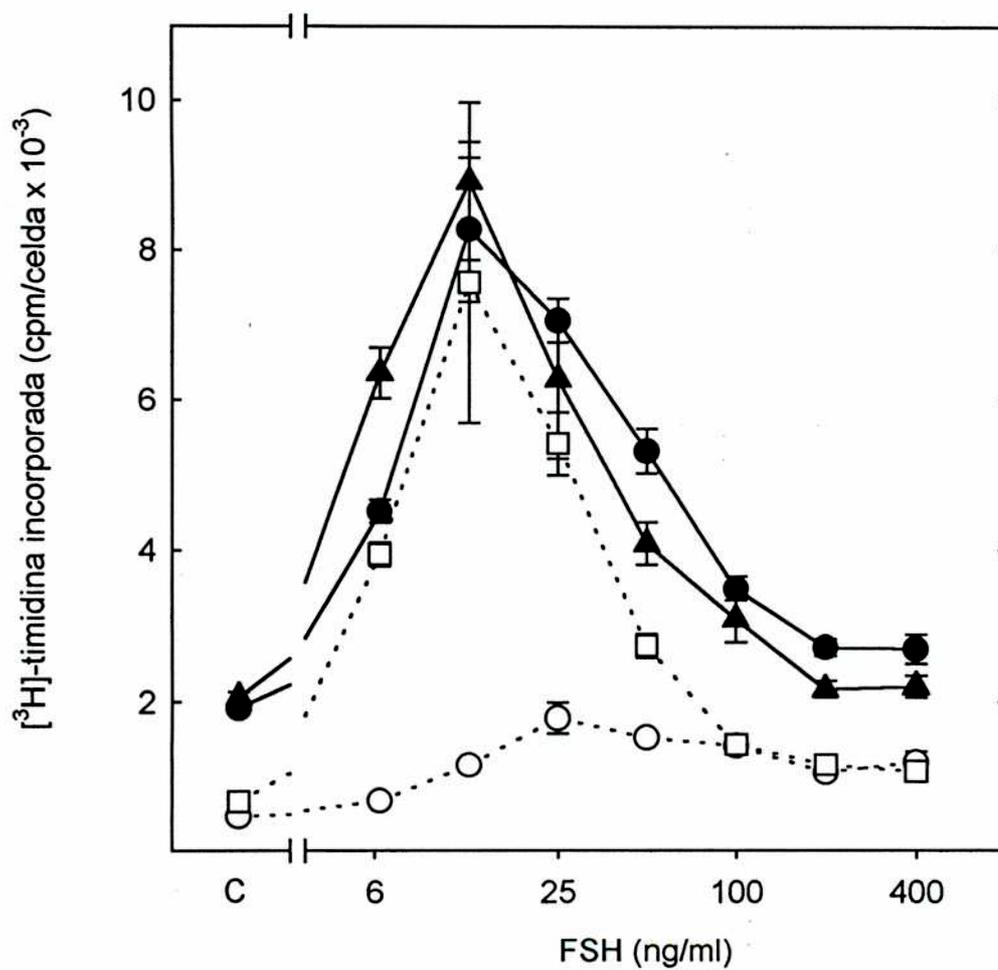
En la Tabla 3.3 puede verse que todas las fracciones aisladas (con excepción de la fracción 5, de menor densidad, correspondiente al 5% del número total de células) mostraron una respuesta comparable.



**Figura 3.7**

**Interacción entre FSH y androstenodiona mediada por AMPC.**

Las células de la granulosa fueron aisladas de animales tratados con DES durante 3 días y cultivadas en presencia (●) y ausencia (○) de androstenodiona (100ng/ml), con concentraciones crecientes de (Bu)<sub>2</sub>AMPC. Se determinó la timidina tritiada incorporada entre las 24 y las 48 horas de cultivo. Los resultados fueron expresados en cpm promedio ± ES, n=3.



**Figura 3.8**

**Paralelismo entre la interacción de FSH con esteroides y factores proteicos.**

Las células de la granulosa fueron aisladas de animales tratados con DES durante 3 días y cultivadas en presencia de: controles (O), 100 ng/ml de androstenodiona (□), 1 μg/ml de insulina (●) y 100 ng/ml de IGF-I (▲), en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de FSH. Se determinó la timidina tritiada incorporada entre las 24 y las 48 horas de cultivo. Los resultados fueron expresados en cpm promedio ± ES, n=3.

Tratamiento	<sup>3</sup> H]-timidina tritiada (cpm/celda)	
	Control	Insulina
<b>C</b>	788 ± 27a	1148 ± 313a
<b>E</b>	836 ± 40a	2288 ± 169a,b
<b>FSH</b>	852 ± 130a	10758 ± 592c
<b>FSH+E</b>	9880 ± 1410b,c	21093 ± 3384d

**Tabla 3.2:**

**Efecto de la combinación de FSH, esteroides y factores proteicos.**

Las células de la granulosa fueron aisladas de animales tratados con DES durante 3 días y cultivadas con 20 ng/ml de FSH, 100 ng/ml de estradiol (E) y la suma de ambos (FSH+E), en ausencia y en presencia de insulina (1µg/ml). Se determinó la timidina tritiada incorporada entre las 24 y las 48 horas de cultivo. Los resultados fueron expresados en cpm promedio ± ES, n=3.

F No.	$\delta$ g/ml	cél. %total	[ <sup>3</sup> H]-timidina incorporada (cpm/celda)					
			Tratamientos			Estimulación		
			C	A	FSH	FSH+A	FSH/C	FSH+A/C
1	1,031	4,1	532±15	263±30	1282±138	11909±743	2,4	22,4
2	1,028	34,7	474±43	318±27	1456±143	11305±1276	3,1	23,8
3	1,024	37,3	454±40	391±20	1640±118	12330±1220	3,6	27,2
4	1,021	18,7	454±22	414±33	2431±199	20949±720	5,4	46,2
5	1,017	5,2	349±48	201±4	1059±299	1413±457	3,0	4,0

**Tabla 3.3:**

Efecto de FSH y androstenodiona sobre diferentes fracciones de células de la granulosa. Las células de la granulosa fueron aisladas de animales tratados con DES durante 3 días, fraccionadas por densidad mediante un gradiente de Percoll (ver Materiales y Métodos) y cultivadas ( $1 \times 10^5$  células por celda) en presencia de los siguientes tratamientos: sin tratamiento (C), androstenodiona (100ng/ml), FSH (20ng/ml) y FSH (20ng/ml) + androstenodiona (100ng/ml) (FSH+A).

## CONCLUSIONES

Si bien la FSH y el estradiol son potentes estímulos para la proliferación de las células de la granulosa *in vivo* (57), el efecto mitogénico de estas hormonas ha sido difícil de demostrar en los sistemas de cultivo comunmente utilizados para estudios de la diferenciación de estas células (64).

En la presente tesis se ha desarrollado un sistema de cultivo de células de la granulosa que nos ha permitido demostrar por primera vez que la combinación de FSH y esteroides sexuales, a concentraciones fisiológicas, estimulan la síntesis de ADN de las células de la granulosa de rata *in vitro*.

Los datos presentados demuestran que cuando se cultivaron células de la granulosa de rata purificadas en presencia de dosis crecientes de FSH, el efecto global sobre la síntesis de ADN fue inhibitorio.

Como ya fuera descrito, el estradiol tiene un efecto nulo o levemente inhibitorio sobre células purificadas. Sin embargo, en presencia de este esteroide hubo un cambio dramático en el efecto de FSH, evidenciado por la aparición de un efecto estimulador de la gonadotropina.

El aumento de la incorporación de timidina en presencia de FSH (20 ng/ml) y estradiol podría estar reflejando una entrada adelantada en fase S y una reducción del tiempo de duplicación de 84 a 48 horas.

Este efecto es similar a producido por el agregado de un análogo de AMPc a cultivos de folículos murinos intactos, el cual induce una reducción del tiempo de duplicación de las células de la granulosa de 120 a 64 horas (160).

Epstein-Almog y Orly (138) demostraron que las células de la granulosa de rata incorporan timidina sincronizadamente y en una estrecha ventana de tiempo entre el cuarto y sexto día posterior al plaqueo. Estos autores no observaron, sin embargo, diferencias significativas entre cultivos tratados con FSH y FSH más androstenodiona.

Numerosas diferencias en las condiciones experimentales, como el uso de dosis comparativamente altas (100 ng/ml) de FSH y los suplementos empleados en el medio de cultivo podrían explicar estas discrepancias.

Por otro lado, MacNatty y Sawers, demostraron que el agregado de una combinación de FSH y estradiol a cultivos de células de la granulosa humanas en diferentes estadios foliculares estimuló marcadamente el índice mitótico (161).

En un trabajo reciente describimos cómo la FSH y el estradiol fueron incapaces de estimular la proliferación de células de la granulosa/luteínicas humanas (156). Sin embargo, la ausencia de efecto se debería, en apariencia, a la secreción de un factor de crecimiento inhibitorio.

Peluso y col. demostraron en un sistema de perfusión de ovarios de rata o folículos aislados que el tratamiento, tanto con FSH, como con un análogo de AMPc incrementó la síntesis de ADN de las células de la granulosa. Este efecto fue más pronunciado en folículos con altos niveles de estrógenos (162).

Más recientemente, estos autores describieron que, si bien el análogo de AMPc fue incapaz de incrementar la incorporación de timidina en células de la granulosa aisladas cultivadas por 24 horas, un antagonista de AMPc inhibió el efecto mitogénico de ésteres de forbol (163).

El hallazgo de una actividad estimuladora comparable a la de los estrógenos por parte de los andrógenos no-aromatizables resultó bastante sorprendente, ya que la acción androgénica se relaciona usualmente con un efecto deletéreo sobre el desarrollo folicular. Este concepto se basa principalmente en la asociación entre una relación andrógenos/estrógenos alta y la atresia folicular (164).

Sin embargo, los efectos estimuladores sobre las células de la granulosa de folículos preantrales y la inducción de la atresia pueden representar fenómenos separados (165).

Los andrógenos, interactuando con receptores específicos, son capaces de reproducir algunos (aunque no todos) los efectos de los estrógenos sobre la diferenciación celular inducida por FSH (64).

Por ello resulta plausible que el sinergismo entre los esteroides sexuales, tanto estrógenos como andrógenos, y FSH sea otra consecuencia de la acción pleiotrópica de estas hormonas sobre las funciones del folículo ovárico.

El efecto estimulador del MPA es aparentemente mediado por su acción androgénica (157), ya que la progesterona careció totalmente de efecto.

Se ha descripto que este compuesto estimula la proliferación de una línea de células de carcinoma mamario murinas sensibles a andrógenos (células Shionogi) (166).

Las células de la granulosa separadas de acuerdo a su densidad no exhibieron mayores diferencias en su respuesta a una combinación de androstenodiona y FSH, con la excepción de una fracción minoritaria (1,014 g/ml) que no respondió.

Estudios previos de Kasson y col. sugirieron la existencia de subpoblaciones de células de la granulosa aisladas de ratas hipofisectomizadas mediante centrifugación en gradiente de densidad.

Si bien no pueden hacerse comparaciones directas, debido a que no se consignaron las densidades correspondientes a estas subpoblaciones, es llamativo que la fracción minoritaria correspondiente a la menor densidad, tampoco respondió a FSH (159).

Dorrington y cols. (110) propusieron que el efecto de los estrógenos sobre la proliferación de las células de la granulosa de rata estaría mediado por TGF $\beta$ . A su vez, este factor interactuaría con FSH de un modo sinérgico para estimular la síntesis de ADN (153).

Sin embargo datos preliminares obtenidos en nuestro laboratorio, indican que el sinergismo entre estradiol y FSH es evidente aún en presencia de dosis máximas efectivas de TGF $\beta$  (132).

Por lo tanto, en nuestras condiciones de ensayo, la interacción entre ambas hormonas no parece involucrar cambios en el TGF $\beta$ .

Por otro lado, cambios en la producción local de IGF-I y/o sus proteínas ligadoras no serían absolutamente necesarios para la interacción entre FSH y esteroides sexuales, ya que fue igualmente observada en presencia de dosis máximas de insulina. Sin embargo, la existencia de un mecanismo autocrino de regulación que involucre a algún factor de crecimiento aún no identificado, no puede ser descartada completamente, ya que el sinergismo entre FSH y los esteroides sexuales se observa sólo en cultivos de alta densidad de plaqueo.

Las curvas dosis-respuesta, tanto para FSH como para un análogo de AMPc, en presencia de andrógenos o estradiol fueron bifásicas.

Este tipo de curvas han sido observadas igualmente para la interacción entre FSH e insulina/IGF-I. Efectos bifásicos similares de AMPc fueron descritos para la estimulación *in vitro* de la síntesis de ADN en células de la granulosa humanas (167). De esta manera, la naturaleza bifásica de la respuesta a AMPc no sería peculiar de la regulación de la proliferación celular.

Sin embargo, vale la pena destacar que tanto los datos de Yong y cols. (167) como los nuestros indican que las máximas concentraciones de FSH o AMPc, con efecto nulo o inhibitorio sobre la síntesis de ADN, tienen un efecto máximo sobre la biosíntesis de esteroides.

Esto estaría indicando una disociación entre los niveles óptimos de AMPc requeridos para inducir el crecimiento o la diferenciación celular.

Los datos presentados en esta tesis apoyan el concepto de que la FSH estimula el crecimiento de las células de la granulosa a través de un proceso mediado por AMPc.

Las acciones del AMPc como regulador de la proliferación celular varían desde inhibitorias hasta estimuladoras, dependiendo del tipo celular y las condiciones experimentales. La estimulación de la proliferación celular por AMPc parece estar restringida a unos pocos tipos celulares (144).

Sus efectos inhibitorios parecen deberse al bloqueo de la activación de raf dependiente de ras, con la consiguiente inhibición de la vía de la quinasa activada por mitogeno (MAP) (168,169).

Uno de los ejemplos más conspicuos nos lo ofrecen los tirocitos caninos. Se ha demostrado recientemente en estas células, que la cascada mitogénica dependiente de AMPc difiere de aquella gatillada por EGF o ésteres de forbol en que no involucra la fosforilación y traslocación nuclear de las quinasas MAP p42 y p44 (170).

Más recientemente, sin embargo, se ha descrito en células de la granulosa la vía de la MAP quinasa puede ser activada por FSH a través de un mecanismo mediado por la activación del AMPc (171).

***CONCLUSION FINAL***

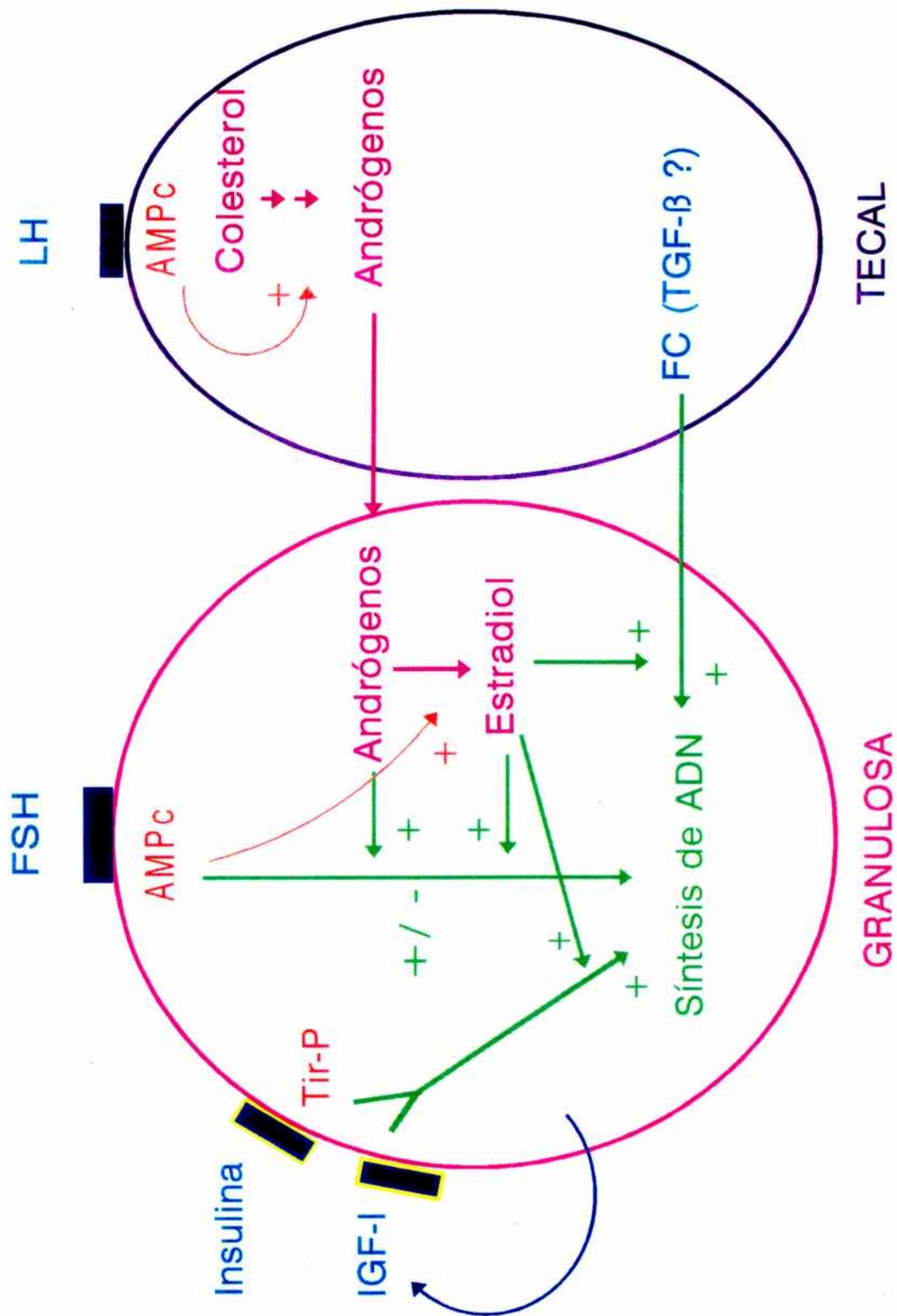
Hemos podido ver a lo largo de esta tesis que múltiples factores están involucrados en la regulación de la síntesis de ADN de las células de la granulosa de rata

Si bien hemos visto que la insulina y el IGF-I son capaces de interactuar con el AMPc para dar curvas de dosis respuesta similares a las observadas con andrógenos y estrógenos, mecanismos diferentes estarían involucrados, ya que la interacción entre FSH y estradiol pudo ser amplificada en presencia de una dosis máxima efectiva de insulina. Esto sugiere que el control de la síntesis de ADN en las células de la granulosa de rata integra cascadas de diferentes señales de transducción.

Queda por determinar si esta integración ocurre al nivel de los promotores de los genes que controlan la progresión de fase G1 a S del ciclo celular o si cada hormona controla componentes discretos del mecanismo responsable de este evento.

En conclusión, los datos aquí presentados demuestran que, si bien la FSH actuando via un proceso mediado por AMPc, puede estimular la proliferación de las células de la granulosa, las acciones mitogénicas de la gonadotropina son muy dependientes de la concentración, requieren de la presencia de esteroides derivados de las células de la teca y pueden ser modulados por factores de crecimiento peptídicos intraováricos.

La interrelación entre la estimulación por la hipófisis y la modulación por reguladores locales parece ser fundamental en la selección de los folículos ovulatorios en los mamíferos.



## BIBLIOGRAFIA

1. Asdell, S.A. Historical Introduction. In: H.H.Cole and P.T.Cupps (eds.), *Reproduction in Domestic Animals*. pp. 1-14, New York. Academic. 1969.
2. Greep, R.O. A vista of research on the mammalian gonadotropins. *Phys. Rev.* 8: 2-10, 1973.
3. Greep, R.O. History of research on anterior hypophysial hormones. In: *Anonymous Handbook of Physiology. Endocrinology*. pp. 1-28, Washington DC: Am. Physiol. Soc. 1974.
4. Allen, E. and Doisy, E.A. Ovarian and Placental Hormones. *Phys. Rev.* 7: 600-650, 1927.
5. Corner, G.W. The sites of formation of estrogenic substances in the animal body. *Phys. Rev.* 18: 154-172, 1938.
6. Corner, G.W. The early history of progesterone. *Gynecol. Invest.* 5: 106-112, 1974.
7. Bex, F.J. and Goldman, B.D. Serum gonadotropins and follicular development in the Syrian hamster. *Endocrinology*, 96: 928-933, 1975.

8. Butcher, R.L., Collins, W.E., and Fugo, N.W. Plasma concentrations of LH, FSH, prolactin, progesterone, and estradiol-17B throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology*, *94*: 1704-1708, 1974.
9. Gay, V.L., Midgley Jr., A.R., and Niswender, G.D. Patterns of gonadotropin secretion associated with ovulation. *Federation Proc.* *29*: 1880-1887, 1970.
10. Legan, S.J. and Karsch, F.J. Neuroendocrine regulation of the estrous cycle and seasonal breeding in the ewe. *Biol. Reprod.* *20*: 74-85, 1979.
11. Everett, J. Central neural control of reproductive functions of the adenohipophysis. *Phys. Rev.* *44*: 373-431, 1964.
12. Legan, S.J., Coon, G.A., and Karsch, F.J. Role of estrogen as initiator of daily LH surges in the ovariectomized rat. *Endocrinology*, *96*: 50-56, 1975.
13. Hauger, R.L., Karsch, F.J., and Foster, D.L. A new concept for control of estrous cycle of the ewe based on the temporal relationships between LH, estradiol and progesterone in peripheral serum and evidence that progesterone inhibits tonic LH secretion. *Endocrinology*, *101*: 807-817, 1977.
14. Seegel, R.F. and Goldman, B.D. Effects of photoperiod on cyclicity and serum gonadotropins in the Syrian hamster. *Biol. Reprod.* *12*: 223-231, 1975.
15. Peters, H. Folliculogenesis in mammals. In: R.E.Jones (ed.), *The Vertebrate Ovary*. pp. 121-140, New York: Plenum. 1978.

16. Byskov, A.G. and Hoyer, P.E. Embryology of Mammalian Gonads and Ducts. In: E.Knobil, J.Neill and et al. (eds.), The Physiology of Reproduction. pp. 265-302, New York: Raven Press Ltd. 1988.
17. Pederson, T. Follicle kinetics in the ovary of the cyclic mouse. Acta Endocrinol. 64: 304-323, 1970.
18. Pederson, T. and Peters, H. Follicle growth and cell dynamics in the mouse ovary during pregnancy. Fertil. Steril. 22: 42-52, 1971.
19. Edwards, R.G., Fowler, R.E., Gore-Langton, R.E., Gosden, R.G., Jones, E.C., Readhead, C., and Steptoe, P.C. Normal and abnormal follicular growth in mouse, rat and human ovaries. J. Reprod. Fertil. 51: 237-263, 1977.
20. Krohn, P.L. Factors influencing the number of oocytes in the ovary. Arch. Anat. Microscop. Morphol. Exp. 56: 151-159, 1967.
21. Peters, H. Some aspects of early follicular development. In: A.R.Midgley and W.A.Sadler (eds.), Ovarian Follicular Development and Function. pp. 1-15, New York: Plenum. 1979.
22. Neal, P. and Baker, T.G. Response of mouse ovaries *in vivo* and in organ culture to pregnant mare serum gonadotrophins and human chorionic gonadotrophin: examination of critical time intervals. J. Reprod. Fertil. 33: 399-410, 1973.

23. Uilenbroek, J.T.J., Arendsen de Wolffe-Exalto, E., and Welschen, R. Studies on the significance of high levels of follicle stimulating hormone for follicular development in immature rats. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* *16*: 297-305, 1976.
24. Hirshfield, A.N. and Midgley, A.R., Jr. Morphometric analysis of follicular development in the rat. *Biol. Reprod.* *19*: 597-605, 1978.
25. Richards, J.S. and Midgley Jr., A.R. Protein hormone action: a key to understanding ovarian follicular and luteal cell development. *Biol. Reprod.* *14*: 82-94, 1976.
26. Schwartz, N.B. The role of FSH and LH and of their antibodies on follicular growth and on ovulation. *Biol. Reprod.* *10*: 236-272, 1974.
27. Welschen, R. Amounts of gonadotropins required for normal follicular growth in hypophysectomized adult rats. *Acta Endocrinol. (Copenh)*, *72*: 137-155, 1973.
28. deJong, F.H. and Sharpe, R.M. Evidence for inhibin-like activity in bovine follicular fluid. *Nature*, *263*: 71-75, 1976.
29. Schwartz, N.B. and Channing, C.P. Evidence of ovarian "inhibin":supression of the secondary use in serum follicle stimulating hormone levels in proestrous rats by inyection of porcine follicular fluid. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, *71*: 5721-5725, 1977.

30. Welschen, R., Hermans, W.P., Dullaart, J., and deJong, F.H. Effect of an inhibin-like factor present in bovine and porcine follicular fluid on gonadotropin levels in ovariectomized rats. *J. Reprod. Fert.* 50: 129-131, 1977.
31. Falck, B. Site of production of oestrogen in rat ovary as studied by microtransplants. *Acta Physiol. Scand.* 163: 1-101, 1959.
32. Armstrong, D.T. and Dorrington, J.H. Estrogen biosynthesis in ovaries and testes. *Adv. Sex Horm. Res.* 3: 217-235, 1977.
33. Armstrong, D.T. and Papkoff, H. Stimulation of aromatization of exogenous and endogenous androgens in ovaries of hypophysectomized rat *in vivo* by follicle stimulating hormone. *Endocrinology.* 99: 1144-1148, 1976.
34. Bjersing, L. Maturation, morphology and endocrine function of the follicular wall in mammals. In: J.E.Jones (ed.), *The Vertebrate Ovary.* pp. 181-214, New York: Plenum. 1978.
35. Erickson, G.F. and Hsueh, A.J.W. Stimulation of aromatase activity by follicle stimulating hormone in rat granulosa cells *in vivo* and *in vitro*. *Endocrinology,* 102: 1275-1282, 1978.
36. Makris, A. and Ryan, K.J. Progesterone, androstenedione, testosterone, estrone and estradiol synthesis in hamster ovarian follicle cells. *Endocrinology,* 96: 694-701, 1975.

37. Makris, A. and Ryan, K.J. Aromatase activity of isolated and recombined hamster granulosa cells and theca. *Steroids*, 29: 65-72, 1977.
38. Moor, R.M. Sites of steroid production in ovine Graafian follicles in culture. *J. Endocrinol.* 73: 143-150, 1977.
39. Watson, J. and Howson, J.W.H. Inhibition by tamoxifen on the stimulatory action of FSH on oestradiol-17 $\beta$  synthesis by rat ovaries *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 49: 375-379, 1977.
40. Lacroix, E., Eechaute, W., and Leusen, I. The biosynthesis of estrogens by cow follicles. *Steroids*, 23: 337-356, 1974.
41. Erickson, G.F. and Hsueh, A.J.W. Stimulation of testosterone production in isolated rabbit thecal tissue by LH/FSH, dibutyryl cyclic AMP, PGF<sub>2a</sub> and PGE<sub>2</sub>. *Endocrinology*, 99: 452-458, 1976.
42. Fortune, J.E. and Armstrong, D.T. Androgen production by theca and granulosa isolated from proestrus rat follicles. *Endocrinology*, 100: 1341-1347, 1977.
43. Tsang, B.K., Moon, Y.S., Simpson, C.W., and Armstrong, D.T. Androgen biosynthesis in human ovarian follicles: cellular source, gonadotropin control and adenosine 3',5'-monophosphate mediation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 48: 153-158, 1979.

44. Baird, D.T. Evidence *in vivo* for the two-cell hypothesis of oestrogen synthesis by the sheep Graafian follicle. *J. Reprod. Fert.* 50: 183-185, 1977.
45. Bjersing, L. and Carstensen, H. The role of the granulosa cell in the biosynthesis of ovarian steroid hormones. *Biochim. Biophys. Acta*, 86: 639-640, 1964.
46. Moon, Y.S., Dorrington, J.H., and Armstrong, D.T. Stimulating action of follicle stimulating hormone on estradiol 17-B secretion by hypophysectomized rat ovaries in organ culture. *Endocrinology*, 97: 244-247, 1975.
47. Hillier, S.G., Knasek, R.A., and Ross, G.T. Androgenic stimulation of progesterone production by granulosa cells from preantral ovarian follicles: further *in vitro* studies using replicate cultures. *Endocrinology*, 100: 1539-1549, 1977.
48. Lucky, A.W., Schreiber, J.R., Hillier, S.G., Schulman, J.D., and Ross, G.T. Progesterone production by cultured preantral rat granulosa cells: stimulation by androgens. *Endocrinology*, 100: 128-133, 1977.
49. Pencharz, R.I. Effects of estrogens and androgens alone in combination with corionic gonadotropin on the ovary of the hypophysectomized rat. *Science*, 91: 554-555, 1940.
50. Simpson, M.E., Evans, H.M., Fraenkel-Conrt, H.L., and Li, C.H. Synergism of estrogens with pituitary gonadotropins in hypophysectomized rats. *Endocrinology*, 28: 37-41, 1941.

51. Williams, P.C. Studies of the biological action of serum gonadotropin.1. Decline in ovarian response after hypophysectomy. 2. Ovarian response after hypophysectomy and oestrogen treatment. *J. Endocrinol.* 4: 127-136, 1945.
52. Bradbury, J.T. Direct action of estrogen on the ovary of the immature rat. *Endocrinology*, 68: 115-120, 1960.
53. Midgley, A.R., Jr. Autorradiographic analysis of gonadotropin binding to rat ovarian tissue sections. *Adv. Exp. Med. Biol.* 36: 365-368, 1973.
54. Goldenberg, R.L., Reiter, E.O., and Ross, G.T. Follicle response to exogenous gonadotropins: an estrogen mediated phenomenon. *Fertil. Steril.* 24: 121-125, 1973.
55. Goldenberg, R.L., Vaitukaitis, J.L., and Ross, G.T. Estrogen and follicle stimulating hormone interactions on follicle growth in rats. *Endocrinology*, 90: 1492-1498, 1972.
56. Richards, J.S. Content of nuclear estradiol receptor complex in rat granulosa cells during follicular development: modification by estradiol and gonadotropins. *Endocrinology*, 97: 1174-1184, 1975.
57. Rao, M.C., Midgley, A.R., and Richards, J.S. Hormonal regulation of ovarian cell proliferation. *Cell*, 14: 71-78, 1978.

58. Gospodarowicz, D., Ill, C.R., and Birdwell, C.R. Effects of fibroblast and epidermal growth factors on ovarian cell proliferation *in vitro*: I.Characterization of the response of granulosa cells to FGF and EGF. *Endocrinology*, *100*: 1108-1111, 1977.
59. Richards, J.S. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Phys. Rev.* *60*: 51-89, 1980.
60. Sharpe, R.M. Bibliography on intragonadal hormones. *Bibliogr. Reprod.* *44*: C1-C16, 1984.
61. Tsafiriri, A. and Adashi, E.Y. Local Nonsteroidal Regulators of Ovarian Function. In: E. Knobil and J. Neill (eds.), *The Physiology of Reproduction*, pp. 817-860, New York: Raven Press. 1994.
62. Straus, D. Growth-stimulatory actions of insulin *in vitro* and *in vivo*. *Endocrine Reviews*, *5*: 356-369, 1984.
63. Sato, G.H., Pardee, A.B., and Sirbasku, D.A. Growth of cells in Hormonally Defined Media. In: Anonymous Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1982.
64. Hsueh, A.J.W., Adashi, E.Y., Jones, P.B.C., and Welsh, T.H.J. Hormonal regulation of differentiation of cultured granulosa cells. *Endocrine Reviews*, *5*: 76-127, 1984.

65. Adashi, E.Y., Resnick, C.E., D'ercole, J., Svoboda, M.E., and van Wyk, J.J. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocrine Reviews*, *6*: 400-419, 1985.
66. Poretsky, L. and Kalin, M. The gonadotropic function of insulin. *Endocrine Reviews*, *8*: 132-141, 1987.
67. Chernausek, S.D., Jacobs, S., and van Wyk, J.J. Structural similarities between human receptors for somatomedin C and insulin: analysis by affinity labeling. *Biochemistry*, *20*: 7345-1981.
68. Channing, C.P., Tsai, V., and Sachs, D. Role of insulin, thyroxine and cortisol in luteinization of porcine granulosa cells grown in chemical defined media. *Biol. Reprod.* *15*: 235-243, 1976.
69. Savion, N., Lui, G., Laherty, R., and Gospodarowicz, D. Factors controlling proliferation and progesterone production by bovine granulosa cells in serum-free medium. *Endocrinology*, *109*: 416-413, 1981.
70. May, J.V. and Schomberg, D.W. Granulosa cell differentiation *in vitro*: Effect of insulin on growth and functional integrity. *Biol. Reprod.* *25*: 421-431, 1981.
71. Diamond, M.P., Webster, B.W., Carr, R.K., Wentz, A.C., and Osteen, K.G. Human follicular fluid insulin concentrations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *61*: 990-992, 1985.

72. Hammond, J.M., Barañao, J.L.S., Skaleris, D., Knight, A.B., Romanus, J., and Rechler, M.M. Production of insulin-like growth factors by ovarian granulosa cells. *Endocrinology*, *117*: 2553-2555, 1985.
73. Hernandez, E.R., Roberts, C.T., LeRoith, D., and Adashi, E.Y. Rat ovarian insulin-like growth factor I (IGF-I) gene expression is granulosa cell-selective: 5'-untranslated mRNA variant representation and hormonal regulation. *Endocrinology*, *125*: 572-574, 1989.
74. Carlsson, B., Carlsson, L., and Billig, H. Estrus cycle-dependent co-variation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) messenger ribonucleic acid and protein in the rat ovary. *Mol. Cell. Endocrinol.* *64*: 271-275, 1989.
75. Hammond, J.M. Peptide regulators in the ovarian follicle. *Aust. J. Biol. Sci.* *34*: 491-504, 1981.
76. Hammond, J.M., Hsu, C., Klindt, J., Tsang, B.K., and Downey, B.R. Gonadotropins increase concentrations of immunoreactive insulin-like growth factor-I in porcine follicular fluid *in vivo*. *Biol. Reprod.* *38*: 304-308, 1988.
77. Echterkamp, S.E., Spicer, L.J., Gregory, K.E., Canning, S.F., and Hammond, J.M. Concentrations of insulin-like growth factor-I in blood and ovarian follicular fluid of cattle selected for twins. *Biol. Reprod.* *43*: 8-14, 1990.
78. Murphy, L.J., Bell, G.I., and Friesen, H.G. Tissue distribution of insulin-like growth factor I and II messenger ribonucleic acid in the adult rat. *Endocrinology*, *120*: 1279-1282, 1987.

79. Oliver, J.E., Aitman, T.J., Powell, J.F., Wilson, C.A., and Clayton, R.N. Insulin-like growth factor expression in the rat ovary is confined to the granulosa cells of developing follicles. *Endocrinology*, 124: 2671-2679, 1989.
80. Hsu, C.Y. and Hammond, J.M. Gonadotropins and estradiol stimulate immunoreactive insulin-like growth factor-I production by porcine granulosa cells *in vitro*. *Endocrinology*, 120: 198-207, 1987.
81. Mondschein, J.S., Canning, S.F., and Hammond, J.M. Effects of transforming growth factor- $\beta$  on the production of immunoreactive insulin-like growth factor I and progesterone and on ( $^3$ H)-Thymidine incorporation in porcine granulosa cell cultures. *Endocrinology*, 123: 1970-1976, 1988.
82. Mondschein, J.S. and Hammond, J.M. Growth factors regulate immunoreactive insulin-like growth factor-I production by cultured porcine granulosa cells. *Endocrinology*, 123: 463-468, 1988.
83. Adashi, E.Y., Resnick, C.E., Hernandez, E.R., Svoboda, M.E., and van Wyk, J.J. *In vivo* regulation of granulosa cell somatomedin-C/insulin-like growth factor I receptors. *Endocrinology*, 122: 1383-1389, 1988.
84. Adashi, E.Y., Resnick, C.E., Hernandez, E.R., Svoboda, M.E., and van Wyk, J.J. Characterization and regulation of a specific cell membrane receptor for somatomedin-C/insulin-like growth factor I in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, 122: 194-201, 1988.

85. Poretsky, L., Bhargava, G., and Levitan, E. Type I insulin-like growth factor receptors in human ovarian stroma. *Horm. Res.* 33: 22-26, 1990.
86. Ooi, G.T. Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs): More than *just 1, 2, 3*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 71: C39-C43, 1990.
87. Clemmons, D.R. Insulinlike growth factor binding proteins. *TEM*, 1: 412-417, 1990.
88. Mondschein, J.S., Smith, S.A., and Hammond, J.M. Production of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) by porcine granulosa cells: Identification of IGFBP-2 and -3 and regulation by hormones and growth factors. *Endocrinology*, 127: 2298-2306, 1990.
89. Adashi, E.Y., Resnick, C.E., Hernandez, E.R., Hurwitz, A., and Rosenfeld, R.G. Ovarian granulosa cell-derived insulin-like growth factor (IGF) binding proteins: Release of low molecular weight, high-affinity IGF-selective species. *Mol. Cell. Endocrinol.* 74: 175-184, 1990.
90. Carpenter, G. and Cohen, S. Epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 265: 7709-7712, 1990.
91. Todaro, G.J., Fryling, C., and DeLarco, J.E. Transforming growth factors produced by certain human tumors cells: polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 5258-5262, 1980.

92. Fisher, D.A. and Lakshmanan, J. Metabolism and effects of epidermal growth factor and related growth factors in mammals. *Endocr. Rev.* *11*: 418-442, 1990.
93. Gospodarowicz, D. and Bialecki, H. Fibroblast and epidermal growth factors are mitogenic for granulosa cells of rodent, porcine and human origin. *Endocrinology*, *104*: 409-420, 1979.
94. Bendell, J.J. and Dorrington, J.H. Epidermal growth factor influences growth and differentiation of rat granulosa cells. *Endocrinology*, *127*: 533-540, 1990.
95. Leal, J.A., May, J.V., and Keel, B.A. Human alpha fetoprotein enhances epidermal growth factor proliferative activity upon porcine granulosa cells in monolayer culture. *Endocrinology*, *126*: 669-671, 1990.
96. Roberts, A.J. and Skinner, M.K. Transforming growth factor- $\alpha$  and - $\beta$  differentially regulate growth and steroidogenesis of bovine thecal cells during antral follicle development. *Endocrinology*, *129*: 2041-2048, 1991.
97. St.Arnaud, R., Walter, P., Kelly, P.A., and Labrie, F. Rat ovarian epidermal growth factor receptors: characterization and hormonal regulation. *Mol. Cell. Endocrinol.* *31*: 43-52, 1983.
98. Skinner, M.K. and Coffey, R.J., Jr. Regulation of ovarian cell growth through the local production of transforming growth factor- $\alpha$  by theca cells. *Endocrinology*, *123*: 2632-2638, 1988.

99. Kudlow, J.E., Kobrin, M.S., Purchio, A.F., Twardzik, D.R., Hernandez, E.R., Asa, S.L., and Adashi, E.Y. Ovarian transforming growth factor- $\alpha$  gene expression: immunohistochemical localization to the theca-interstitial cells. *Endocrinology*, *121*: 1577-1580, 1987.
100. Josso, N. Antimüllerian hormone: new perspectives for a sexist molecule. *Endocr. Rev.* *7*: 421-433, 1986.
101. Mason, A.J., Hayflick, J.S., Ling, N., Esch, F., Ueno, N., Ying, S., Guillemin, R., Niall, H., and Seeburg, P.H. Complementary DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor- $\beta$ . *Nature*, *318*: 659-665, 1985.
102. Ling, N., Ying, S., Ueno, N., Shimasaki, S., Esch, F., Denoroy, L., and Guillemin, R. Pituitary FSH is released by heterodimer of the  $\beta$ -subunits from the two forms of inhibin. *Nature*, *321*: 779-82, 1986.
103. Bendell, J.J. and Dorrington, J.H. Rat theca/interstitial cells secrete a transforming growth factor  $\beta$ -like that promotes growth and differentiation in rat granulosa cells. *Endocrinology*, *123*: 941-948, 1988.
104. Skinner, M.K., Keski-Oja, J., Osteen, K.G., and Moses, H.L. Ovarian thecal cells produce transforming growth factor  $\beta$  which can regulate granulosa cell growth. *Endocrinology*, *121*: 786-792, 1987.
105. May, J.V., Frost, J.P., and Schomberg, D.W. Differential effects of epidermal growth factor, somatomedin-C/insulin-like growth factor I, and

transforming growth factor- $\beta$  on porcine granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation. *Endocrinology*, 123: 168-179, 1988.

106. Mulheron, G.W. and Schomberg, D.W. Rat granulosa cells express transforming growth factor- $\beta$  type 2 messenger ribonucleic acid which is regulatable by follicle-stimulating hormone *in vitro*. *Endocrinology*, 126: 1777-1779, 1990.

107. Talbot, N.C., Rexroad, C.E., and Pursel, V.G. Alkaline phosphatase staining of pig and sheep epiblast cells in culture. *Mol. Reprod. Devel.* 36: 139-147, 1994.

108. Gangrade, B.K. and May, J.V. The production of transforming growth factor- $\beta$  in the porcine ovary and its secretion *in vitro*. *Endocrinology*, 127: 2372-2380, 1990.

109. Chegini, N. and Flanders, K.C. Presence of transforming growth factor- $\beta$  and their selective cellular localization in human ovarian tissue of various reproductive stages. *Endocrinology*, 130: 1707-1715, 1992.

110. Bendell, J.J. and Dorrington, J. Estradiol-17 $\beta$  stimulates DNA synthesis in rat granulosa cells: Action mediated by transforming growth factor- $\beta$ . *Endocrinology*, 128: 2663-2665, 1991.

111. Bornstein, M.B. Reconstituted rat-tail collagen used as substrate for tissue cultures on coverslips in maximow slides and roller tubes. *Lab. Invest.* 7: 134-137, 1958.

112. Campbell, K.L. Ovarian granulosa cell isolated with EGTA and hypertonic sucrose: cellular integrity and function. *Biol. Reprod.* 21: 773-786, 1979.
113. Magoffin, D.A. and Erickson, G.F. Purification of ovarian theca-interstitial cells by density gradient centrifugation. *Endocrinology*, 122: 2345-2347, 1988.
114. Jimenez de Asua, L., O'Farrell, M.K., Clingan, D., and Rudland, P.S. Temporal sequence of hormonal interactions during the prereplicative phase in quiescent cultured fibroblast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 3845-3849, 1977.
115. Li, C.C. Introduction to experimental statistics. New York: McGraw-Hill, 1964.
116. DeLean, A., Munson, P.J., and Rodbard, D. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay and physiological dose-response curves. *Am. J. Physiol.* 235: E97-E102, 1978.
117. Louvet, J.P., Harman, S.M., and Ross, G.T. Effects of human chorionic gonadotropin, human interstitial cell stimulating hormone and human follicle stimulating hormone on ovarian weights in estrogen-primed hypophysectomized immature female rats. *Endocrinology*, 96: 1179-1186, 1975.
118. Katzenellebogen, B.S. Dynamics of steroid hormone receptor action. *Annu. Rev. Physiol.* 42: 17-35, 1980.

119. Bendell, J.J., Lobb, D.K., Chuma, A., Gylser, M., and Dorrington, J.H. Bovine thecal cells secrete factor(s) that promote granulosa cell proliferation. *Biol. Reprod.* 38: 790-797, 1988.
120. Soto, A.M. and Sonnenschein, C. Cell proliferation of estrogen-sensitive cells: the case for negative control. *Endocrine Reviews*, 8: 44-52, 1987.
121. Lobb, D.K., Skinner, M.K., and Dorrington, J.H. Rat thecal/interstitial cells produce a mitogenic activity that promotes the growth of granulosa cells. *Mol. Cell. Endocr.* 55: 209-217, 1988.
122. Naito, K., Skog, S., Tribukait, B., Andersson, L., and Hisazumi, H. Cell cycle related [<sup>3</sup>H]thymidine uptake and its significance for the incorporation into DNA. *Cell Tissue Kinet.* 20: 447-457, 1987.
123. Hammond, J.M., Veldhuis, J.D., Seale, T., and Rechler, M.M. Intraovarian regulation of granulosa-cell replication. In: Channing and Seagal (eds.), *Intraovarian Control Mechanisms*, pp. 341-356, Plenum Publishing Corporation. 1982.
124. Thanki, K.H. and Channing, C.P. Influence of serum, estrogens, and gonadotropins upon growth and progesterone secretion by cultures of granulosa cells from small porcine follicles. *Endocr. Res. Comm.* 3: 319-333, 1976.
125. Orly, J., Sato, G.H., and Erickson, G.F. Serum suppresses the expression of hormonally induced functions in cultured granulosa cells. *Cell*, 20: 817-827, 1980.

126. Shivers, C.A. and Dunbar, B.S. Autoantibodies to Zona Pellucida: A possible cause for infertility in women. *Science*, 197: 1082-1084, 1994.
127. Erickson, G.F., Magoffin, D.A., Dyer, C.A., and Hofeditz, C. The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. *Endocrine Reviews*, 6: 371-397, 1985.
128. Makris, A., Klagsbrun, M.A., Yasumizu, T., and Ryan, K.J. An endogenous ovarian growth factor which stimulates BALB/3T3 and granulosa cell proliferation. *Biol. Reprod.* 29: 1135-1141, 1983.
129. Kasid, A. and Lippman, M.E. Estrogen and oncogen mediated growth regulation of human breast cancer cells. *J. steroid Biochem.* 27: 465-470, 1987.
130. Todaro, G.F., Fryling, C., and De Larco, J.E. Transforming growth factor produced by certain human tumor cells: polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 5258-1980.
132. Barañao, J.L., Saragüeta, P.E., and Colman Lerner, A. Effect of transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) on granulosa cell DNA synthesis: modulation by hormones, growth factors and GnRH. *Endoc. Soc. 75Ann.Meet. Abs1762*: 491-1994.(Abstract)
133. Mulheron, G.W., Danielpour, D., and Schomberg, D.W. Rat thecal/interstitial cells express transforming growth factor- $\beta$  type 1 and 2, but

only type 2 is regulated by gonadotropin *in vitro*. *Endocrinology*, 129: 368-374, 1991.

134. Hammond, J.M. and English, H.F. Regulation of deoxyribonucleic acid synthesis in cultured porcine granulosa cells by growth factors and hormones. *Endocrinology*, 120: 1039-1046, 1987.

135. Erickson, G.F. and Magoffin, D.A. The endocrine control of follicle androgen biosynthesis. *J. steroid Biochem.* 19: 113-117, 1983.

136. Barañao, J.L.S. and Hammond, J.M. Comparative effects of insulin and insulin-like growth factors on DNA synthesis and differentiation of porcine granulosa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124: 484-489, 1984.

137. Roy, S.K. and Greenwald, G.S. Effects of FSH and LH on incorporation of [<sup>3</sup>H]-thymidine into follicular DNA. *J. Reprod. Fertil.* 78: 201-209, 1986.

138. Epstein-Almog, R. and Orly, J. Inhibition of hormone-induced steroidogenesis during cell proliferation in serum-free cultures of rat granulosa cells. *Endocrinology*, 116: 2103-2112, 1985.

139. Olsson, J.-H., Carlsson, B., and Hillensjö, T. Effect of insulin-like growth factor I on deoxyribonucleic acid synthesis in cultured human granulosa cells. *Fertil. Steril.* 54: 1052-1057, 1990.

140. Adashi, E.Y., Resnick, C.E., Svoboda, M.E., and Van Wyck, J.J. Somatomedin-C synergizes with Follicle-stimulating hormone in the acquisition

of progesterin biosynthetic capacity by cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, *116*: 2135-2142, 1985.

141. Adashi, E.Y., Resnick, C.E., and Rosenfeld, R.G. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II hormonal action in cultured rat granulosa cells: Mediation via type I but not type II IGF receptors. *Endocrinology*, *126*: 216-222, 1990.

142. Weinenberg-Ohana, P., Goldschmit, T.D.M., Mizrachi, L., and Orly, J. Cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitor, 3-isobutyl-1-methylxanthine, induces cytodifferentiation of follicular granulosa cells cultured in serum-free medium. *Endocrinology*, *115*: 2160-2167, 1984.

143. Gabbay, R.A. and Lardy, H.A. Methylsobutylxanthine blocks insulin antagonism of cAMP-stimulated glycogenolysis at a site distinct from phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.* *261*: 4002-4007, 1986.

144. Dumont, J.E., Jauniaux, J., and Roger, P.P. The cyclic AMP-mediated stimulation of proliferation. *TIBS*, *14*: 67-71, 1989.

145. Adashi, E.Y., Resnick, C.E., Svoboda, M.E., and van Wyk, J.J. Follicle-stimulating hormone enhances somatomedin C binding to cultured rat granulosa cells. *J. Biol. Chem.* *261*: 3923-3926, 1987.

146. Takahashi, S.-I., Conti, M., and van Wyk, J.J. Thyrotropin potentiation of insulin-like growth factor-I dependent deoxyribonucleic acid synthesis in FRTL-5 cells: Mediation by an autocrine amplification factor(s). *Endocrinology*, *126*: 736-745, 1990.

147. Takahashi, S.-I., Conti, M., Prokop, C., van Wyk, J.J., and Earp HS, I.I. Thyrotropin and insulin-like growth factor I regulation of tyrosine phosphorylation in FRTL-5 cells. Interaction between cAMP-dependent and growth factor-dependent signal transduction. *J. Biol. Chem.* 266: 7834-7841, 1991.
148. Jimenez de Asua, L., Richmond, K.M.V., and Otto, A.M. Two growth factors and two hormones regulate the initiation of DNA synthesis in cultured mouse cells through different pathways of events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 1004-1008, 1981.
149. Barañao, J.L., Bley, M.A., Batista, F.D., and Glikin, G.C. A DNA topoisomerase I inhibitor blocks the differentiation of rat granulosa cells induced by follicle-stimulating hormone. *Biochem. J.* 277: 557-560, 1991.
150. Pastan, I., Johnson, G.S., and X Role of cyclic nucleotides in growth control. *Ann. Bioch. Rev.* 44: 491-522, 1975.
151. Adashi, E.Y., Resnick, C.E., Hurwitz, A., Ricciarelli, E., Hernandez, E.R., and Rosenfeld, R.G. Ovarian granulosa cell-derived insulin-like growth factor binding proteins: Modulatory role of follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*, 128: 754-760, 1991.
152. Bicsak, T.A., Shimonaka, M., Malkowski, M., and Ling, N. Insulin-like growth factor-binding protein (IGF-BP) inhibition of granulosa cell function: Effect on cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate, deoxyribonucleic acid synthesis,

and comparison with the effect of an IGF-I antibody. *Endocrinology*, *126*: 2184-2189, 1990.

153. Dorrington, J.H., Chuma, A.V., and Bendell, J.J. Transforming growth factor  $\beta$  and follicle stimulating hormone promote rat granulosa cell proliferation. *Endocrinology*, *123*: 353-359, 1988.

154. Peluso, J.J., Delidow, B.C., Lynch, J., and White, B.A. Follicle-stimulating hormone and insulin regulation of  $17\beta$ -estradiol secretion and granulosa cell proliferation within immature rat ovaries maintained in perfusion culture. *Endocrinology*, *128*: 191-196, 1991.

156. Dain, L.B., Bley, M.A., Baraño, J.L., and Tesone, M. Evidence for the production of a growth-inhibitory factor by human granulosa-luteal cells. *Mol. Reprod. Devel*, *36*: 159-163, 1993.

157. Mowsowicz, I., Bieber, D.E., Chung, K.W., Bullock, L.p., and Bardin, C.W. Synandrogenic and antiandrogenic effect of progestins: comparison with non-progestational antiandrogens. *Endocrinology*, *95*: 1589-1599, 1974.

158. Pridjian, G., Schmit, V., and Schreiber, J. Medroxyprogesterone acetate: receptor binding and correlated effects on steroidogenesis in rat granulosa cells. *J. steroid Biochem*. *26*: 313-319, 1987.

159. Kasson, B.G., Meidan, R., Davoren, B., and Hsueh, A.J.W. Identification of subpopulations of rat granulosa cells: sedimentation properties and hormonal responsiveness. *Endocrinology*, *117*: 1027-1034, 1985.

160. Carroll, J., Whittingham, D.G., and Wood, M.J. Effect of dibutyryl cyclic adenosine monophosphate on granulosa cell proliferation, oocyte growth and meiotic maturation in isolated mouse primary ovarian follicles cultured in collagen gels. *J. Reprod. Fertil.* 92: 197-207, 1991.
161. McNatty, K.P. and Sawers, R.S. Relationship between the endocrine environment within the Graafian follicle and the subsequent rate of progesterone secretion by human granulosa cells "*in vitro*". *J. Endocr.* 66: 391-400, 1975.
162. Frishman, G.N., Luciano, A.A., and Peluso, J.J. Effect of the ratio of follicle-stimulating hormone to luteinizing hormone on rat granulosa cell proliferation and oestradiol-17 $\beta$  secretion. *Hum. Reprod.* 7: 1073-1078, 1992.
163. Peluso, J.J., Pappalardo, A., and White, B.A. Control of rat granulosa cell mitosis by phorbol ester-, cyclic AMP-, and estradiol-17 $\beta$ -dependent pathways. *Biol. Reprod.* 49: 416-422, 1993.
164. Gore-Langton, R.E. and Armstrong, D.T. Follicular Steroidogenesis and its Control. In: E. Knobil and J. Neill (eds.), *The Physiology of Reproduction*, pp. 331-385, New York: Raven Press, Ltd. 1988.
165. Billig, H., Furuta, I., and Hsueh, A.J.W. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology*, 133: 2204-2212, 1993.

166. Lüthy, I.A., Begin, D.J., and Labrie, F. Androgenic activity of synthetic progestins and spironolactone in androgen-sensitive mouse mammary carcinoma (Shinogi) cells in culture. *J. steroid Biochem.* 31: 845-852, 1988.
167. Yong, E.L., Baird, D.T., and Hillier, S.G. Mediation of gonadotrophin-stimulated growth and differentiation of human granulosa cells by adenosine-3',5'-monophosphate: One molecule, two messages. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, 37: 51-58, 1992.
168. Wu, J., Dent, P., Jelinek, T., Wolfman, A., Weber, M.J., Sturgill, T.W. Inhibition of the EGF-activated MAP Kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science* 262:1065-1069, 1993.
169. Cook, S.J., McCormick, F. Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science* 262:1069-1072, 1993.
170. Lamy, F., Wilkin, F., Baptist, M., Posada, J., Roger, P.P., and Dumont, J.E. Phosphorylation of mitogen-activated protein kinases is involved in the epidermal growth factor and phorbol ester, but not in the thyrotropin/cAMP, thyroid mitogenic pathway. *J. Biol. Chem.* 268: 8398-8401, 1993.
171. Das, S., Hunzicker-Dunn, M. Evidence for a stimulatory role of cAMP in FSH-activated MAP kinase signaling pathway. *Biol Reprod* 50(Suppl.1):89, 1994.