

Tesis de Posgrado

Regulación del desarrollo folicular por factores péptidicos intraováricos

Lanuza, Guillermo

1999

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Lanuza, Guillermo. (1999). Regulación del desarrollo folicular por factores péptidicos intraováricos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3143_Lanuza.pdf

Cita tipo Chicago:

Lanuza, Guillermo. "Regulación del desarrollo folicular por factores péptidicos intraováricos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3143_Lanuza.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 DEL
DESARROLLO FOLICULAR POR
FACTORES PEPTIDICOS INTRAOVARICOS**

Autor: Guillermo Lanuza

Director: Dr. José Lino Baraño

**Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires**

Instituto de Biología y Medicina Experimental

1999

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**REGULATION OF
FOLLICULAR DEVELOPMENT
BY PEPTIDIC INTRAOVARIAN FACTORS**

Author: Guillermo Lanuza

Director: Dr. José Lino Baraňao

Docthoral Thesis

Instituto de Biología y Medicina Experimental

1999

Resumen

El objetivo de esta tesis es el estudio de factores regulatorios, de producción y acción local, que controlan el desarrollo del folículo ovárico en mamíferos. En particular, se estudió el papel fisiológico de factores relacionados con el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β). El modelo utilizado consistió en células de la granulosa inmaduras de rata cultivadas en condiciones definidas. Se determinó que las células de la granulosa producen TGF- β bioactivo, encontrándose su secreción bajo control hormonal. El TGF- β producido ejerce acciones autocrinas, estimulando el crecimiento de células de la granulosa. La activina, otro miembro de la misma superfamilia, también es producida por las células de la granulosa y regula positivamente la proliferación de manera significativamente mayor que la realizada por el TGF- β . Factores paracrinós derivados del ovocito, probablemente pertenecientes a la misma superfamilia, promueven el crecimiento de las células somáticas del folículo, indicando que el ovocito participa activamente en el desarrollo folicular. Las acciones mitogénicas del TGF- β , activina o del factor derivado del ovocito sobre las células de la granulosa, son amplificadas por bajas concentraciones de FSH, enfatizando la potencial relevancia de estos factores sobre la función ovárica. Asimismo, estos factores locales ejercieron un regulación diferencial de la producción de inhibinas A y B, llevando la relación entre las formas hacia la predominancia de inhibina B, de manera semejante a lo encontrado in vivo en los estadios de crecimiento folicular.

Estos resultados indican que factores intraováricos, relacionados con el TGF- β , juegan un papel importante en el desarrollo folicular, regulando el crecimiento y la diferenciación de las células de la granulosa.

Palabras clave:

Células de la granulosa
Factores de crecimiento
Ovocito
TGF- β
Activina
Inhibina
Ovario
Desarrollo folicular

Abstract

This thesis is aimed at studying the production and action of local regulatory factors that control ovarian follicular development in mammals. Specially, the physiological role of transforming growth factor- β (TGF- β) related factors was studied. Rat immature granulosa cells cultured under defined conditions was used as experimental system. Granulosa cells produce bioactive TGF- β , and its secretion is under hormonal control. TGF- β exerts autocrine actions, stimulating granulosa cells growth. Activin, another member of this superfamily, is also produced by granulosa cells and regulates proliferation, being its effect bigger than that elicited by TGF- β . Oocyte-derived paracrine factors, probably belonging to the same superfamily, promote follicular somatic cells growth, indicating that the oocyte play an active role during follicular development. The mitogenic actions of TGF- β , activin and the oocyte-derived factor on granulosa cells are further amplified by low dosis of FSH, emphasizing the potential relevance of these factors in ovarian function. Furthermore, dimeric inhibin A and B production are differentially regulated these local factors, with a shift of the ratio towards the predominance of inhibin B, as is found in vivo during follicular growth stages. These results indicate that TGF- β related intraovarian factors play an important role in follicular development, regulating granulosa cells growth and differentiation.

Keywords:

Granulosa cell
Growth factors
Oocyte
TGF- β
Activin
Inhibin
Ovary
Follicular development

Los resultados presentados en esta tesis de doctorado forman parte de dos trabajos ya publicados y de tres manuscritos que se encuentran en etapa final de redacción.

Growth promoting activity of oocyte on granulosa cells is decreased upon meiotic maturation

G.M. Lanuza, M.L. Fischman y J.L. Barañao
Developmental Biology 197: 129-139 (1998).

Dimeric inhibin production are differentially regulated by hormones and local factors in rat granulosa cells.

G.M. Lanuza, N.P. Groome, J.L. Barañao y S. Campo
Endocrinology 140: 2549-2554 (1999).

Transforming growth factor- β (TGF- β 1) stimulation of rat granulosa cell deoxyribonucleic synthesis: mediation by fibronectin and activation of the latent form.

P. Saragüeta, G.M. Lanuza y J.L. Barañao
Manuscrito en preparación final

Comparative actions of activin A and transforming growth factor- β on granulosa cell function.

G.M. Lanuza, y J.L. Barañao
Manuscrito en preparación final

Effects of tumor necrosis factor- α on rat granulosa cell deoxyribonucleic synthesis: inhibition of gonadotrophin action and interaction with transforming growth factor- β .

G.M. Lanuza, P. Saragüeta and J.L. Barañao
Manuscrito en preparación final

INDICE

1.	Introducción general	1
1.1.	El folículo ovárico	2
1.2.	Desarrollo folicular	3
1.2.1.	Formación del folículo primordial.....	3
1.2.2.	Iniciación de la foliculogénesis	4
1.2.3.	Crecimiento del folículo preantral	5
1.2.4.	Desarrollo del folículo antral	6
1.2.4.1.	Estructura del folículo antral.....	6
1.2.4.2.	Dependencia de gonadotrofinas	7
1.2.5.	Atresia folicular.....	7
1.2.6.	Cinética del crecimiento folicular.....	8
1.2.7.	Folículo preovulatorio y ovulación	9
1.3.	Regulación hormonal.....	10
1.3.1.	Gonadotrofinas.....	10
1.3.1.1.	Esteroidogénesis ovárica	11
1.3.2.	Estrógenos	12
1.3.3.	Crecimiento de células de la granulosa: gonadotrofinas y estrógenos.....	12
1.3.4.	Reguladores peptídicos intraováricos	13
1.3.4.1.	Factores de crecimiento y diferenciación	13
1.3.4.2.	El factor de crecimiento similar a insulina de tipo I, IGF-I	15
1.4.	Cultivos de células de granulosa: el modelo experimental.....	17
1.5.	Objetivos	18
2.	Materiales y Métodos.....	20
2.1.	Reactivos.....	21
2.2.	Obtención y cultivo de células de la granulosa	21
2.2.1.	Incorporación de timidina.....	21
2.2.2.	Determinación de ADN	21
2.2.3.	Conteo de células	21
2.3.	Cultivo de células BGC-1.....	22
2.4.	Cultivo primario de células de la granulosa bovinas.....	22
2.5.	Obtención de ovocitos bovinos.....	22
2.6.	Maduración de ovocitos in vitro (IVM)	22
2.7.	Determinación de la maduración de ovocitos	22
2.8.	Obtención de ovocitos de rata.....	23
2.9.	Obtención de complejos cumulus-ovocito (COC) murinos y remoción del ovocito	23
2.10.	Determinación de la expansión de las células del cumulus en complejos intactos y ovocitotomizados.....	23
2.11.	Determinación de esteroides.....	23

2.12. Determinación de AMPc.....	23
2.13. Enzimo-inmuno ensayo para inhibinas diméricas (ELISA).....	24
2.14. Marcación y electroforesis en geles.....	24
2.15. Metabolismo de esteroides y cromatografía en capa delgada.....	25
2.16. Cultivo de células Mv1Lu - CCL64. Actividad de TGF- β	25
2.17. Cultivo de células Swiss 3T3.....	25
2.18. Preparación y tratamientos de medios condicionados.....	25
2.18.1. Activación del TGF- β latente:.....	25
2.19. Extracción de ARNm y Northern blot.....	25
2.20. Extracción de factores del fluido folicular.....	26
2.21. Ensayo de agar blando.....	26
2.22. Análisis estadístico.....	26
 3. Módulo I. El factor de crecimiento transformante- β como factor autocrino en el ovario.....	 27
3.1. Introducción.....	28
3.1.1. Superfamilia de factores relacionados con el TGF- β	28
3.1.2. El TGF- β	28
3.1.3. Estructura.....	28
3.1.4. Activación del TGF- β	28
3.1.5. Receptores.....	29
3.1.6. Smads.....	29
3.1.7. El TGF- β en el ovario.....	30
3.2. Objetivo.....	31
3.3. Resultados.....	32
3.3.1. Producción y activación de TGF- β por las células de la granulosa..	32
3.3.1.1. Actividad similar a TGF- β en el ovario.....	32
3.3.1.2. Producción de TGF- β por células de granulosa.....	33
3.3.1.3. Regulación hormonal de la producción de TGF- β	34
3.3.2. Efecto del TGF- β sobre la síntesis de ADN.....	36
3.3.3. Acciones comparativas del MC y del TGF- β sobre células de granulosa.....	37
3.4. Discusión.....	41
 4. Módulo II: Efecto de activina sobre la función de las células de granulosa. Análisis comparativo con el TGF- β	 44
4.1. Introducción.....	45
4.1.1. Estructura.....	45
4.1.2. Receptores.....	45
4.1.3. Proteínas ligadoras.....	46
4.1.4. Transducción de señal.....	46
4.1.5. Acciones biológicas.....	46

4.2.	Objetivo	47
4.3.	Resultados	48
4.3.1.	Efectos de activina sobre la síntesis de ADN en células de la granulosa.....	48
4.3.2.	Efecto de activina y follistatina sobre la síntesis de estradiol en células de la granulosa	50
4.4.	Discusión.....	51
5.	Módulo III. Efecto del factor de necrosis tumoral- α sobre la función de las células de la granulosa	56
5.1.	Introducción.....	57
5.1.1.	Estructura y acción.....	57
5.1.2.	Presencia en el ovario.....	57
5.1.3.	Acciones de TNF- α en el desarrollo folicular	58
5.2.	Objetivo	58
5.3.	Resultados	59
5.3.1.	Efecto del TNF- α en el crecimiento de células de granulosa	59
5.3.2.	Efecto del TNF- α sobre la esteroidogénesis.....	61
5.3.2.1.	Regulación de la biosíntesis de estradiol y progestágenos	61
5.3.2.2.	Efectos sobre el metabolismo de esteroides.....	62
5.3.2.3.	Controles de viabilidad celular	65
5.3.3.	Acción antigonadotrófica del TNF- α	66
5.4.	Discusión.....	68
6.	Módulo IV Factores derivados del ovocito regulan el crecimiento de células de la granulosa	73
6.1.	Introducción.....	74
6.1.1.	Comunicación entre el ovocito y las células somáticas	74
6.1.2.	Expansión del cumulus	74
6.1.3.	Regulación de la foliculogénesis por el ovocito.....	74
6.2.	Objetivo	75
6.3.	Resultados	76
6.3.1.	Efecto del co-cultivo con ovocitos sobre la síntesis de ADN en células de granulosa	76
6.3.2.	Especificidad del tipo celular	76
6.3.3.	Efecto de FSH sobre la acción del co-cultivo	77
6.3.4.	Caracterización de los factores derivados del ovocito.....	78
6.3.5.	Presencia de la actividad en ovocitos de otras especies.....	79
6.3.6.	Comparación de la actividad mitogénica con el factor de expansión del cumulus	80
6.4.	Discusión.....	83

7.	Módulo V Producción de inhibinas diméricas por células de la granulosa. Regulación por hormonas y factores locales.....	86
7.1.	Introduction	87
7.1.1.	Estructura de la inhibina	87
7.1.2.	Mecanismos celulares de acción.....	87
7.1.3.	Las inhibinas diméricas A y B: actividad biológica y métodos de detección	88
7.1.4.	La inhibina como regulador intraovárico.....	89
7.2.	Objetivo	89
7.3.	Resultados	90
7.3.1.	Efecto de FSH.....	90
7.3.2.	Efecto de estradiol e IGF-I.....	90
7.3.3.	Efecto de TGF-β.....	91
7.3.4.	Efecto de activina.....	91
7.3.5.	Efecto de co-cultivo con ovocitos	92
7.3.6.	Concentraciones séricas.....	93
7.3.7.	Regulación de los niveles de ARNm de las subunidades de activina e inhibina.....	93
7.4.	Discusión.....	95
8.	Conclusiones	99
9.	Referencias	101

1. Introducción general

1.1. El folículo ovárico

La función primaria del folículo ovárico en los mamíferos es la liberación de un ovocito en condiciones de ser fertilizado e involucra el crecimiento y maduración del folículo, así como los procesos de ovulación y de división meiótica del ovocito.

El folículo es la unidad funcional del ovario. Está formado por una capa exterior de células tecales, que envuelve, por fuera de la membrana basal, capas internas de células de la granulosa. A su vez, las células de la granulosa rodean y confinan al complejo formado por el ovocito y las células de cumulus (Figura 1.1).

En respuesta a la secreción cíclica de gonadotrofinas hipofisarias, los distintos compartimientos foliculares interactúan, de manera integrada, para sintetizar esteroides sexuales (estrógenos y progestinas) y para producir un ovocito fertilizable. Aunque las gonadotrofinas, que perfunden el ovario, son los mayores reguladores del desarrollo del folículo, no todos los folículos en un ovario responden estas hormonas en un ciclo. Sólo un número limitado de folículos seleccionados alcanza la ovulación durante la vida fértil, mientras que la mayoría de los folículos degeneran en atresia. Luego de la ovulación, las células de la granulosa sufren profundos cambios en la respuesta hormonal y en su capacidad de producir esteroides.

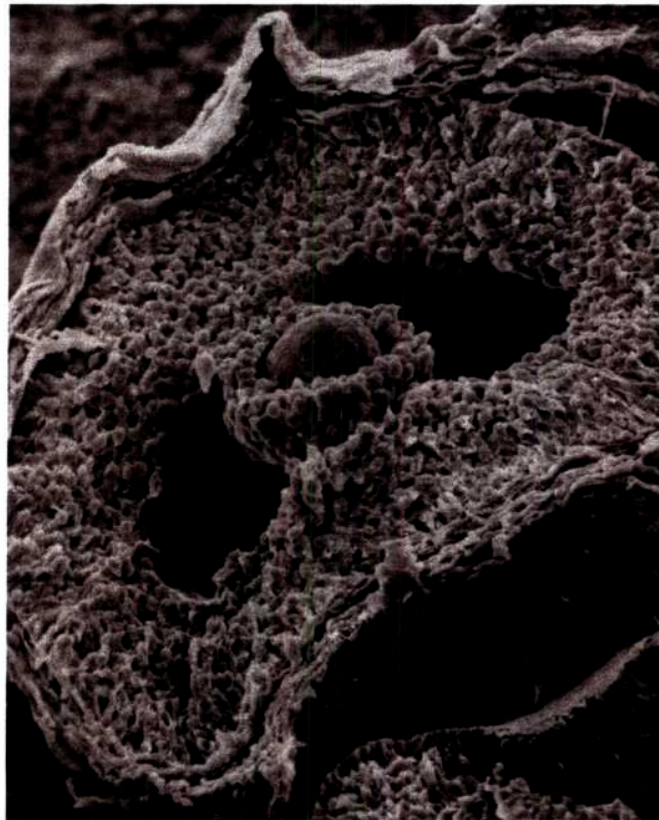


Figura 1.1

Folículo ovárico

Microscopía electrónica de barrido de un folículo ovárico maduro de rata. El ovocito se encuentra rodeado por las células del cumulus, varias capas de células de granulosa que contiene el antro folicular. Por fuera de la membrana basal se observa una capa de células de la teca (Richards, 1979).

1.2. Desarrollo folicular

El crecimiento y diferenciación del ovocito, y la proliferación y diferenciación de las células somáticas que lo rodean ocurre de manera coordinada en las distintas etapas de la foliculogénesis (Figuras 1.2 y 1.3)

1.2.1. Formación del folículo primordial

Las **células germinales primordiales** se originan a partir del endodermo del saco vitelino, cerca del final del cauda del embrión. Las células germinales en activa proliferación migran hacia el cresta genital (Byskov, Hoyer, 1994; Peters, 1978) y al arribar al lugar de desarrollo de la gónada las células premeióticas se denominan **oogonias** (Baker, Franchi, 1967).

Durante un intervalo previo al nacimiento en la roedores o en la semana 8 de vida intrauterina en el humano, las oogonias comienzan a dejar su ciclo mitótico, comienzan la división meiótica y se detienen en la primera profase, convirtiéndose en **ovocitos primarios** (Peters, 1970) (Figura 1.4). Tanto durante la mitosis, como durante

al meiosis, un gran proporción de células germinales degenera, resultando en una pérdida de más de un tercio de las mismas en el ratón. En el humano, esta pérdida de células germinales impactará sobre la reserva de folículos disponibles para futuras ovulaciones, disminuyendo desde 7×10^6 células germinales a las 20 semanas de gestación hasta entre 1.3 y 3.8×10^5 por ovario al nacimiento (Baker, 1963). Una vez formado, el ovocito primario persiste en la profase de la primera división meiótica hasta el momento de la ovulación (Figura 1.5).

En un estadio temprano de la diferenciación de la gonada femenina, las células de la pregranulosa, provenientes de la rete ovarii y del epitelio superficial se organizan alrededor de los ovocitos primarios (Byskov, Hoyer, 1994). La unidad resultante constituye el **folículo primordial** formado por un ovocito ($<20\mu\text{m}$) rodeado por una capa de células de la pregranulosa no cuboides y una membrana basal. Este folículo permanece quiescente hasta que se dispara su crecimiento.

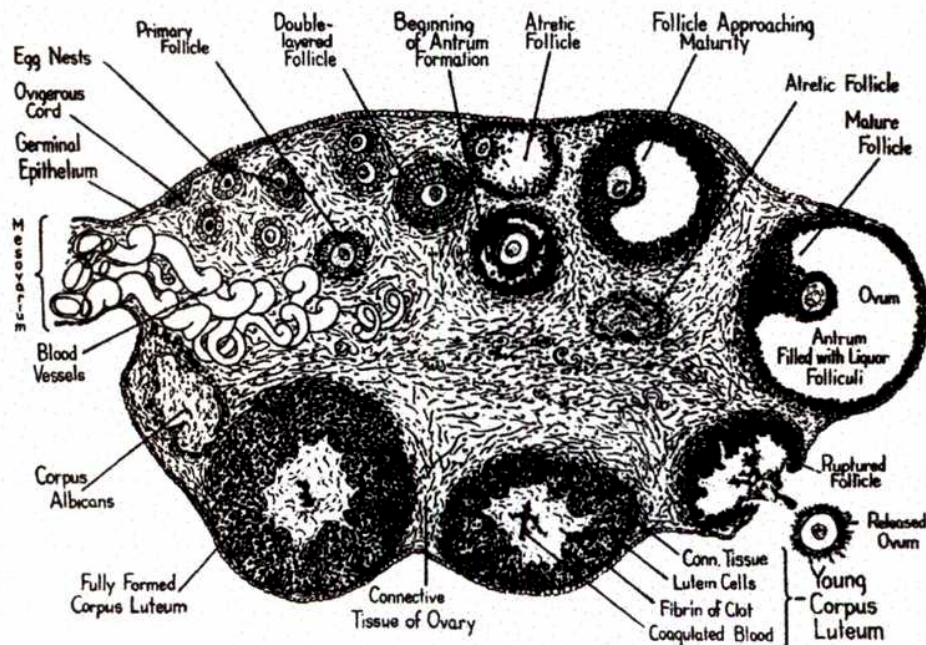


Figura 1.2

Estructura del ovario y desarrollo folicular

Esquema del ovario mostrando los diferentes estadios del desarrollo folicular (Ham, 1965).

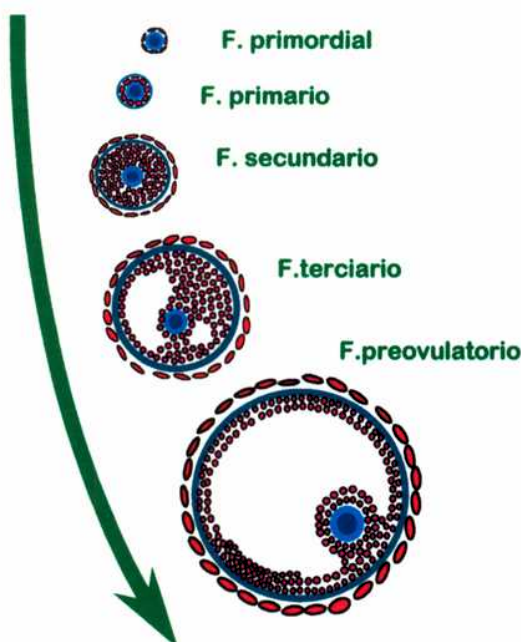


Figura 1.3
Desarrollo del folículo ovárico
Representación esquemática de la evolución de un folículo: primordial, primario, secundario, terciario y preovulatorio.

1.2.2. Iniciación de la foliculogénesis

La iniciación de la foliculogénesis puede reconocerse por la morfológica cubiende de las células de la granulosa y un incremento de su número (Peters, 1978), convirtiéndose en un **folículo primario**. Este período de crecimiento es lento y se ha estimado que la duración del ciclo celular sería de 7 días (Hirshfield, 1989). El momento de inicio del crecimiento folicular depende de la especie. En mamíferos grandes (como ovinos, bovinos, monos, humanos) ocurre durante la vida fetal; mientras que en mamíferos más pequeños (como ratón, rata, conejo, hamster) ocurre durante el período perinatal (Peters, 1978). Los factores responsables de la regulación de estos eventos tempranos no se conocen y se considera que serían de origen local. Una vez comenzado, el crecimiento folicular continúa a lo largo de toda la vida fértil, independientemente del estado fisiológico, de la fase del ciclo estral, de los niveles de gonadotrofinas y aún durante la preñez (Edwards et al., 1977; Pederson, Peters, 1971; Pederson, 1970).



Figura 1.4
Esquema de la ovogénesis en roedores
Progresión desde las células germinales proimordiales a ovocitos no crecidos en el desarrollo fetal y de etapas de la ovogénesis hasta el ovocito fertilizado en hembras adultas maduras

No existen evidencias de la existencia de poblaciones de folículos mas grandes de reserva, por lo tanto una vez que un folículo ha comenzado su etapa de crecimiento y diferenciación, culminará en la atresia o en la ovulación del ovocito maduro. En la mujer, el agotamiento de la población de folículos primordiales está asociada con la menopausia.

Es interesante notar que en ciertos estados patológicos, como la menopausia precoz, se produce un agotamiento prematuro de los folículos primordiales, sin que se hayan descrito otras alteraciones concomitantes. Por lo tanto, el mecanismo de reclutamiento de folículos primordiales constituye uno de los enigmas fundamentales de la fisiología ovárica.

Si bien, algunos trabajos indican que el número de folículos que comenzarán a crecer cada día está ligado al número de folículos arrestados (Krohn, 1967), otros estudios indican que el número de folículos primordiales en reposo no altera la tasa de iniciación de crecimiento (Hirshfield, 1994).

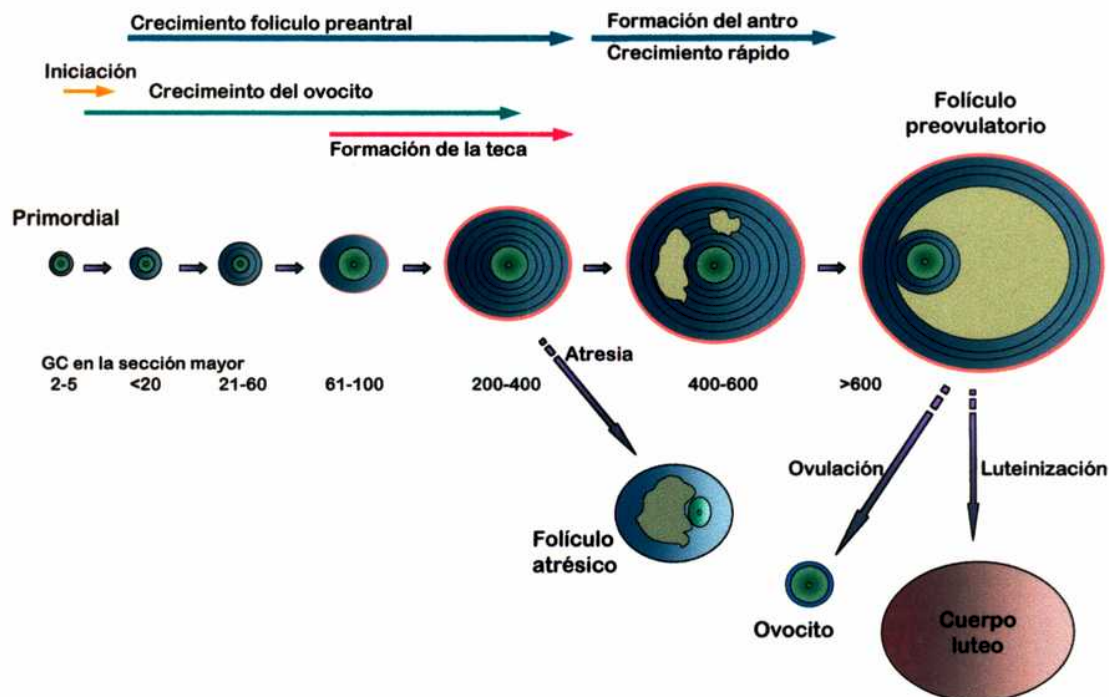


Figura 1.5
Foliculogénesis

Representación de los cambios morfológicos en la foliculogénesis. Las flechas indican el comienzo y la duración aproximada de distintas etapas: iniciación, crecimiento del ovocito, proliferación de las células de la granulosa, formación de la capa de la teca y desarrollo del folículo antral. También se muestran los puntos finales de la foliculogénesis: atresia, ovulación del ovocito y luteinización. Para cada folículo se indica el número de células de la granulosa (GCs) en la sección transversal mayor del folículo.

Coincidente con la transición de las células de la granulosa a morfología cuboide y el crecimiento del ovocito, éste comienza la secreción de la matriz glicoproteica extracelular, la **zona pelúcida** (Chiquoine, 1960). Comienza a su vez un proceso citoplasmático en el cual las células de la granulosa atraviesan la zona pelúcida, para mantener un íntimo contacto con la membrana plasmática del ovocito, formando "gap junctions". Dada la formación temprana de estos contactos, se especula que el acoplamiento entre el ovocito y las células que lo rodean sería importante en el adecuado desarrollo posterior del folículo (Hirshfield, 1991).

1.2.3. Crecimiento del folículo preantral

Mediante una serie de divisiones mitóticas, los folículos primarios con una capa de

células de la granulosa se convierten a un estadio preantral multilaminado, denominado como **folículo secundario**.

El crecimiento del folículo preantral es independiente de gonadotrofinas y parece estar regulado por mecanismos intraováricos e intrafolículos. La proliferación de las células de la granulosa, la diferenciación e hipertrofia de las células tecales y el crecimiento del ovocito, son los procesos que determinan un incremento en el diámetro del folículo maduro (Figura 1.5).

La capa de células tecales se forma cuando el folículo alcanza dos láminas de células de la granulosa y constituirá la fuente de andrógenos para la producción folicular de estrógenos (Gore-Langton, Armstrong, 1994). Posteriormente, el folículo secundario diferenciado migra hacia la médula y completa la formación de la teca, evento

asociado con la adquisición de una o dos arteriolas en sus adyacencias.

Si bien, no se conoce cuál es la señal capaz de disparar esta transformación de precursores tipo fibroblasto del estroma, la evidencia acumulada indica que señales paracrinias inductoras del desarrollo de la teca provienen de folículos preantrales con dos o más capas de células de la granulosa. Cuando un folículo secundario se ha formado, desarrolla receptores para FSH, estrógenos y andrógenos. Del conjunto de folículos secundarios maduros se reclutarán aquellos que entren en la fase tónica de crecimiento. Con la aparición de la cavidad antral, el folículo secundario se convierte en un **folículo terciario**.

1.2.4. Desarrollo del folículo antral

Durante el desarrollo folicular, la formación del **antro folicular** representa una transición de la regulación primaria intrafolicular a la regulación extraovárica. El folículo comienza un período de crecimiento rápido y adquiere nuevas características. El eje hipotálamo-hipófisis-gonadal en la hembra integra señales del cerebro, pituitaria y ovario y produce hormonas que coordinan la maduración folicular con el comportamineto sexual y la preparación fisiológica para la preñez. El hipotálamo produce y secreta GnRH de manera pulsátil directamente en el sistema porta hipofisario (Everett, 1994). La frecuencia de pulsos de GnRH es modulada por el estado endocrino del animal, los estrógenos incrementan la frecuencia de pulsos y aumentan la sensibilidad de la hipófisis anterior a GnRH. En respuesta a GnRH, la pituitaria anterior libera gonadotrofinas, la baja frecuencia de pulso favorece la secreción de FSH, mientras que una alta frecuencia favorece la liberación de LH.

Durante la primera fase del desarrollo folicular, el crecimiento del ovocito y el folículo correlacionan positivamente. Una vez que el ovocito ha alcanzado su tamaño máximo, justo antes de la formación de la cavidad antral, comienza una segunda fase, caracterizada por la actividad mitótica de las células de la granulosa, la diferenciación de

la teca y la acumulación de fluido folicular (Figura 1.5).

1.2.4.1. Estructura del folículo antral

Las células de la granulosa no constituyen un tejido homogéneo, pudiéndose diferenciar tres poblaciones. Las **células de la granulosa murales**, son las más cercanas a la membrana basal que serían las más activas en términos esteroidogénicos. Poseen altos niveles intracelulares de 3β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y citocromo P₄₅₀ (Zoller, Weisz, 1979a, 1979b) y parecen ser las que adquieren más receptores para LH (Magnusson et al., 1982; Channing et al., 1981).

Estas observaciones son marcadamente diferentes de las encontradas para las **células de la granulosa antrales**, aquellas células que cierran la cavidad antral, o de las **células del cúmulus**, aquellas que rodean al ovocito (Figura 1.6 y 1.1). En el momento de la ovulación, las células de la granulosa que constituyen el cumulus son expulsadas junto con el ovocito, mientras que las que forman la membrana granulosa permanecen en el ovario y serán incorporadas en el cuerpo lúteo.

La cavidad antral, se encuentra llena de fluido, denominado **fluido folicular**, en el cual el ovocito ocupa una posición excéntrica rodeado por la células del cumulus oophorus. El fluido antral contiene hormonas esteroideas libres y unidas a proteínas ligadoras, proteínas derivadas de plasma y de producción local, proteoglicanos y electrolitos (Edwards, 1974).

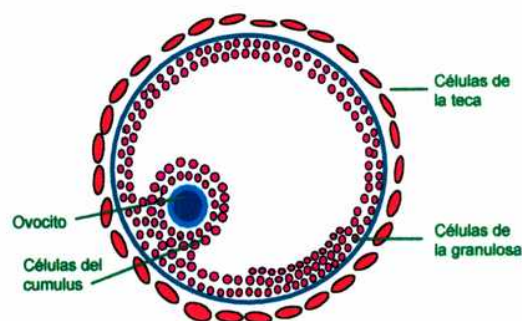


Figura 1.6
Esquema de un folículo antral

1.2.4.2. Dependencia de gonadotrofinas

Para que el folículo llegue hasta los primeros estadios antrales resulta imprescindible la acción de gonadotrofinas. Por lo tanto, cualquier tipo de defectos (por manipulación farmacológica, quirúrgica, por mutaciones espontáneas o inducidas) en el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal tienen impacto en el desarrollo del folículo antral.

La FSH estimula la actividad de aromatasa en las células de la granulosa, lo que se manifiesta en un aumento de la concentración de estrógenos intrafolicular (Figura 1.9). Al aumentar los niveles de estrógenos, aumenta también la sensibilidad del folículo a la acción de la gonadotrofina. La FSH, en conjunción con el estradiol localmente producido, promueve el crecimiento folicular (Rao et al., 1978), observándose un aumento en el índice mitótico de las células de la granulosa entre el estadio preantral tardío y antral temprano (Rao et al., 1978; Hirshfield, 1991). Las señales desencadenadas por FSH, interactúan con estradiol para activar la expresión de genes necesarios para la maduración del folículo, tales como citocromo P450 aromatasa, las subunidades de inhibina y el receptor de LH (Hsueh et al., 1984; Richards, 1994).

En algunos folículos se observa un incremento drástico de la producción de estrógenos, lo que se ve acompañado por una disminución de los niveles circulantes de FSH (Fritz, Speroff, 1982). Como resultado, aquellos folículos, con estrógenos relativamente bajos, y elevados niveles de andrógenos intrafoliculares, presentarán una sensibilidad disminuida a FSH y como consecuencia no serán seleccionados (Figura 1.7).

Asimismo, un conjunto de factores de producción local cumplen un papel importante en el proceso de selección folicular, como se detallará más adelante.

Por otra parte, el desarrollo del folículo dominante, se encuentra asociado a los cambios ocurridos en las células tecales. La LH circulante estimula al máximo la producción de andrógenos por las células tecales-intersticiales estableciéndose así la

unidad funcional ovárica entre células granulosa y las células de la teca (Figura 1.9).

Se ha sugerido que en varias especies, el folículo dominante secreta sustancias capaces de inhibir a los folículos pequeños hiposilaterales adyacentes. De acuerdo con esta teoría el folículo dominante tendría un papel activo para asegurar su estatus preferencial. Otros investigadores han explicado la inhibición del crecimiento de los folículos pequeños, como una consecuencia del deterioro del ambiente endocrino.

1.2.5. Atresia folicular

La atresia folicular es el proceso a través del cual degeneran los folículos que no fueron seleccionados para ovular (Hirshfield, 1991) y ocurre a través de muerte celular por apoptosis (Hsueh et al., 1994; Tilly, 1996). La primera referencia de la apoptosis en el ovario fue realizada por Flemming en 1885, y las características morfológicas de la degeneración folicular descrita ajustaron perfectamente a los criterios establecidos 90 años después para la identificación de la apoptosis (Majno, Joris, 1995).

En realidad existen dos tipos del procesos de degeneración celular en el ovario: 1) degeneración de las células germinales ("attrition"), que es responsable de la pérdida de el mayor número de ovocitos y ocurrió en la etapa prenatal o perinatal, dependiendo de la especie y 2) degeneración folicular (atresia) que ocurre en la vida reproductiva postnatal (Tilly, 1996).

Se ha estimado que más del 99% de los folículos degeneran en atresia en la vida reproductiva de la mujer, mientras que aproximadamente un 77% ocurre en el ratón (Baker, 1963). Por lo tanto, el número de folículos que se desarrollan hasta un estadio preovulatorio es sustancialmente menor que el de aquellos que se pierde. Los folículos pueden volverse atrésicos en cualquier estadio del desarrollo, aunque en la mayoría de los mamíferos la mayor eliminación ocurre entre los estadios preantral tardío y antral temprano (Tilly, 1996) (Figura 1.5 y 1.7).

Este es el momento cuando el crecimiento continuo es dependiente de gonadotrofinas y se ha demostrado, tanto *in vivo* como *in vitro*, que la exposición a FSH se requiere para evitar la atresia y continuar el desarrollo (Tilly et al., 1995; Tilly et al., 1992; Chun et al., 1994). Los estrógenos son indispensables para el crecimiento y maduración del folículo y los folículos atrésicos presentan una relación disminuida estrógenos/andrógenos (Carson et al., 1981). El estradiol y los andrógenos regulan la apoptosis en células de la granulosa actuando como factores de supervivencia o atretogénicos, respectivamente (Billig et al., 1993).

1.2.6. Cinética del crecimiento folicular

La cinética del desarrollo folicular que se representa en la Figura 1.7 se ha establecido a partir de análisis de dinámica folicular en el ratón, hamster y rata (Richards, 1980). El panel superior representa el patrón de concentraciones circulantes de gonadotrofinas en siete ciclos estrales de 4 o 5 días (Gay et al., 1970; Butcher et al., 1974).

El pico de FSH y LH ocurre en la mañana del proestro, extendiéndose el de FSH hasta la mañana del estro. El panel inferior representa los cambios relativos en el tamaño folicular, desde un folículo preantral temprano, con una o dos capas de células de la granulosa hasta folículos antrales grandes.

El folículo de de Graaf que ovula en respuesta al pico de gonadotrofinas de un ciclo, en realidad comenzó su crecimiento al menos 19 días antes, como parte de una población de folículos en crecimiento. Por lo tanto, una vez que un folículo fue reclutado para su crecimiento, se ve expuesto a tres o más aumentos consecutivos de gonadotrofinas. En la rata adulta, la mayoría de estos folículos crecen continuamente hasta que, como folículos antrales pequeños, sufren atresia (Hirshfield, Midgley, Jr. 1978).

Solamente unos pocos folículos entran la etapa final de maduración. Se ha propuesto que el pico de hormonas del ciclo que precede a la ovulación, selecciona de la

población de folículos preantrales a aquellos que ovularán en el proestro siguiente (Welschen, 1973; Schwartz, 1974; Richards, Midgley Jr. 1976).

El pico de hormonas gonadotróficas ejerce dos funciones. La LH induce la ovulación y luteinización, "eliminando" los folículos más grandes que se encuentran saludables en proestro. El aumento de FSH, probablemente junto con LH, selecciona para su crecimiento la población de folículos de la cual emergerán aquellos que se ovularán el ciclo siguiente (Figura 1.7).

El proceso hormonal que determina cuáles folículos finalmente ovularán involucra, mecanismos entre secreciones ováricas (esteroides y factores de crecimiento) e hipofisarias, caracterizándose los folículos en crecimiento por una sensibilidad específica a los factores actuantes (Adashi, Rohan, 1992; Hsueh et al., 1984; Richards, Midgley Jr. 1976; Everett, 1964).

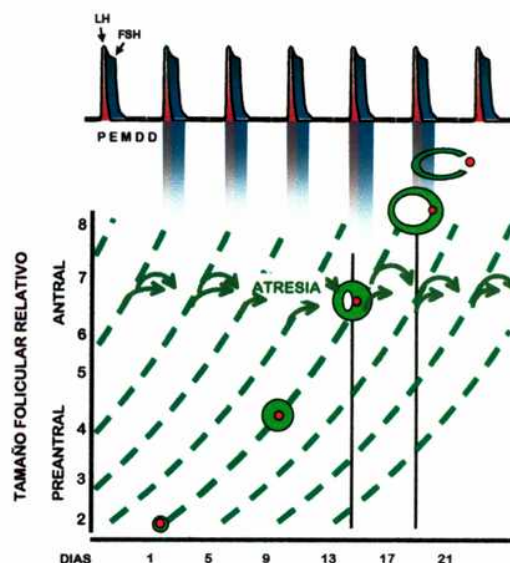


Figura 1.7

Crecimiento folicular y ciclo estral

Diagrama esquemático del crecimiento folicular en el ciclo estral en la rata. Panel superior: niveles séricos de gonadotrofinas, indicando los días del ciclo: proestro (P), estro (E), metaestro (M), diestro (D). Panel inferior: crecimiento del folículo, representado como cambio en el tamaño relativo en función con los días de desarrollo (Richards, 1980).

1.2.7. Folículo preovulatorio y ovulación

El **folículo preovulatorio** también es denominado como folículo de **de Graff**, en honor a Regnier de Graff que fue quien en 1672 identificó el folículo ovárico, si bien lo confundió con el propio ovocito. El folículo preovulatorio es el que presenta una esteroidogénesis más activa y el que presenta una mayor respuesta a gonadotrofinas. Estudios en la rata, han demostrado que las células de la granulosa del folículo en proestro expresan receptores de LH en alta concentración, produciendo elevados niveles de AMPc en respuesta a pico de gonadotrofinas (Uilenbroek, Richards, 1979). La LH, al igual que la FSH, estimula a la adenilato ciclase para producir AMPc, el que activa la proteína quinasa A (Richards et al., 1995).

El pico de LH promueve la supresión de la expresión de la aromatasa, detiene la división celular (Robker, Richards, 1998; Rao et al., 1978) e incrementa la expresión de los genes responsables de la ruptura de la pared del folículo y la membrana basal. Uno de estos compuestos es el activador del plasminógeno, que junto con otras enzimas y sus inhibidores, está involucrado en la cascada de reacciones proteolíticas necesarias para la ovulación (Hagglund et al., 1996; Reich et al., 1985; Beers, 1975).

Durante todo el desarrollo del folículo, los ovocitos crecen hasta alcanzar su máximo tamaño pero permanecen detenidos en la profase de la primera división meiótica (Figura 1.4). Se presume que las células de la granulosa son, al menos en parte, las encargadas de mantener detenido al ovocito, mediante la secreción de inhibidores de la meiosis (Eppig, 1993).

Antes de la ovulación, pero después del pico de LH, se completa la primera división meiótica y el ovocito pasa a denominarse **ovocito secundario**, arrestado en metafase de la segunda división meiótica. La maduración del ovocito se observa por la ruptura de la vesícula germinal y la eliminación del primer corpúsculo polar (Eppig et al., 1994) (Figura 1.8). Solamente si el ovocito es fertilizado, se activará el

mecanismo que determinará que se complete la segunda división meiótica (Figura 1.4). En respuesta al pico preovulatorio de gonadotrofinas se desencadena el proceso de mucificación o de expansión del cumulus, que se caracteriza por la activa secreción de ácido hialurónico y la expansión de la estructura de las células del cumulus (Eppig, 1982) (Figura 1.8).

El folículo preovulatorio representa el último estadio del desarrollo folicular. Posteriormente, sufrirá una serie de cambios morfológicos y funcionales en el proceso conocido como luteinización, comenzando un nuevo estadio de diferenciación.

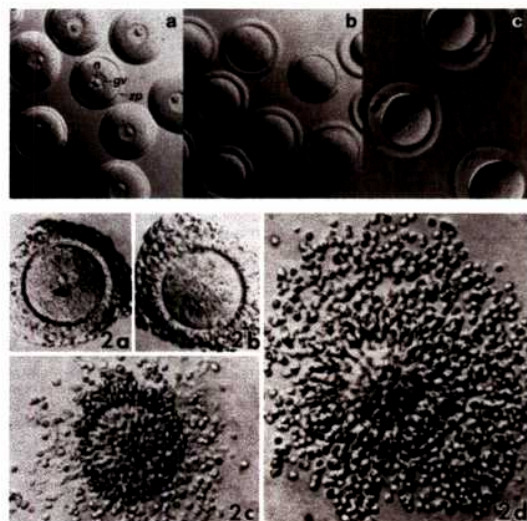


Figura 1.8

Maduración del ovocito y expansión del cumulus

Panel superior: microfotografías de ovocitos de ratón cultivados in vitro. a: Ovocitos aislados arrestados en la primera profase meiótica, donde es visible la vesícula germinal (gv); b: ovocitos que sufrieron la ruptura de la vesícula germinal y condensación de cromosomas; c: ovocitos arrestados en metafase II, que completaron la primera división meiótica, con expulsión del primer corpúsculo polar (Wassarman, Albertini, 1994).

Panel inferior: Secuencia de fotografías de complejos cumulus-ovocito (COC) de ratón luego de inyección de hCG. a: COC control, donde se observa la vesícula germinal; b: COC aislado a las 3 hs de aplicar hCG, que ya sufrió la ruptura de la vesícula germinal; c: COC aislados 6 hs post-hCG, sólo las células del cumulus externas expandieron; d: Expansión del cumulus completa, observada 9 hs. post-hCG (Eppig, 1982).

1.3. Regulación hormonal

La proliferación y diferenciación de las células de la granulosa involucra la transformación de la célula inmadura en una totalmente madura, bajo la influencia de señales hormonales endocrinas, paracrinas y autocrinas. Para realizar esta transformación, las células de la granulosa adquieren la capacidad de interactuar de manera específica y sincronizada con las señales hormonales que dirigen los procesos de crecimiento y maduración folicular.

Los mecanismos responsables de la regulación de la selección y dominancia folicular se conocen sólo parcialmente. En esta tesis se enfoca el papel que cumplen factores intraováricos, así como hormonas hipofisarias en la regulación de la función de las células de la granulosa.

1.3.1. Gonadotrofinas

La hormona folículo estimulante (FSH) ejerce sus funciones a través de receptores específicos que se localizan exclusivamente en células de la granulosa.

El receptor de FSH, al igual que el receptor de LH, son proteínas integrales de membrana con siete dominios transmembrana característicos de los receptores acoplados a proteína G. La unión de la hormona a su receptor promueve, a través de una proteína Gs, la activación de la adenilato ciclasa, que incrementa los niveles de AMPc. La proteína quinasa A transduce la señal de cAMP (Taylor et al., 1990), cuyo resultado es la fosforilación en serina y treonina de un gran número de proteínas, así de cambios específicos en la expresión de genes (Richards, 1994). Un factor transcripcional de unión a elementos con respuesta a cAMP (CREB) es capaz de ser activado por fosforilación por proteína quinasa A (Richards, 1994). La interacción de CREB con otros factores de transcripción

determinará la expresión de ciertos genes como por ejemplo los correspondientes a las enzimas esteroideogénicas (Oonk et al., 1990; Fitzpatrick, Richards, 1994).

En la rata, estudios *in vivo* e *in vitro* indican que la FSH incrementa la expresión de sus propios receptores en células de la granulosa (Ireland, Richards, 1978; Richards et al., 1976). Esta regulación homóloga de los receptores para FSH en células de la granulosa es amplificada por el estradiol, si bien el esteroide no modifica la expresión basal (Ireland, Richards, 1978; Louvet, Vaitukaitis, 1976). Consecuentemente, cambios en la producción de estradiol por los folículos preantrales seleccionados podrían modular la respuesta a FSH a través de un aumento del número de receptores para la gonadotrofina.

A diferencia de la presencia de receptores de FSH en células de la granulosa, los receptores de LH se expresan en las células tecales y sólo se encuentran en células de la granulosa de folículos preovulatorios grandes (Amsterdam et al., 1975; Richards et al., 1976). El tratamiento con FSH, tanto *in vitro* como *in vivo*, induce la expresión de receptores para LH en células de la granulosa (Piquette et al., 1991; Erickson et al., 1979). La inducción de los receptores para LH por FSH, es aumentada por la presencia de estrógenos (Rani et al., 1981).

Una de las principales acciones de FSH es la de promover la síntesis de estradiol a través de la inducción de la aromatasa en células de la granulosa, enzima que convierte andrógenos a estrógenos (Erickson, Hsueh, 1978; Armstrong, Papkoff, 1976). La biosíntesis de estradiol requiere la interacción de las células de la granulosa con las células de la teca.

En la tabla 1.1 se resumen algunas de las funciones de la célula de la granulosa que son reguladas por FSH.

1.3.1.1. Esteroidogénesis ovárica

Los más conocidos e inicialmente mejor caracterizados productos de secreción del folículo son las hormonas esteroideas. En todos los mamíferos, los tipos celulares involucrados en la esteroidogénesis folicular son dos tipos básicos:

- las células de la teca interna de la envoltura folicular y células intersticiales ováricas que responden a la hormona luteinizante (LH)
- las células de la granulosa que son sensibles a la hormona foliculo estimulante (FSH) y que sólo posteriormente en la maduración folicular adquirirán la capacidad de responder a la LH.

Estos dos tipos celulares cumplen particulares funciones en el proceso de esteroidogénesis en virtud de encontrarse reguladas por distintas hormonas y por la expresión de distintas enzimas esteroidogénicas. La cooperación entre las células de la teca y de la granulosa en la biosíntesis de estrógenos constituye lo que se conoce como la teoría de dos células, dos gonadotrofinas (Gore-Langton, Armstrong, 1988) (Figura 1.9).

Los esteroides más abundantes producidos por la teca madura son los andrógenos (fundamentalmente androstenediona), generados por metabolismo de colesterol. La acción de la LH, a través de receptores específicos presentes en la célula de la teca en todos los estadios foliculares provee el principal estímulo para las actividades esteroidogénicas (Tsang et al., 1979; Fortune, Armstrong, 1977). Los andrógenos producidos pueden difundir a través de la membrana basal y alcanzan la células de la granulosa.

En las células de la granulosa, las vías esteroidogénicas se encuentran organizadas principalmente para el metabolismo de esteroides C_{19} (andrógenos) y para la síntesis *de novo* de progesterona y sus metabolitos C_{21} (Hsueh et al., 1984). Las células de granulosa responden a FSH incrementando la actividad de

aromatización, promoviendo la conversión de los andrógenos sintetizados por las células tecales a estrógenos (Erickson, Hsueh, 1978; Hsueh et al., 1984). Por otra parte la vía de biosíntesis de progesterona en células de granulosa es típica de todas las células esteroidogénicas, que involucra la conversión de colesterol en pregneneolona y luego hacia progesterona.

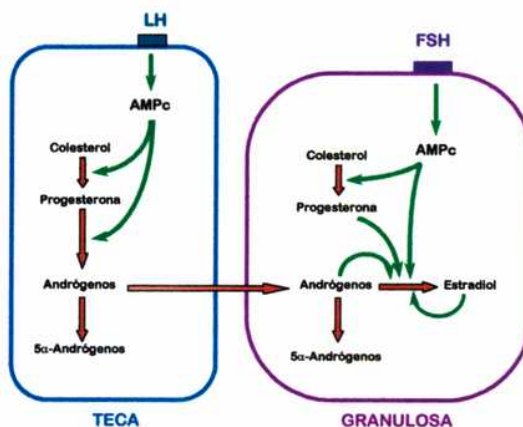


Figura 1.9
Esteroidogénesis. Representación del modelo dos células, dos gonadotrofinas
Regulación de la esteroidogénesis en el folículo ovárico: cooperación entre las células de la granulosa y de la teca. las flechas representan pasos regulados positivamente.

Tabla 1.1
Parámetros funcionales estimulados por FSH en células de granulosa en cultivo

- Estimulación de la esteroidogénesis
 - Biosíntesis de estrógenos
Inducción de aromatasa
 - Biosíntesis de progesterona y 20α -dihidroP
Inducción de citocromo P450 scc de 3β -HSD y de 20α -HSD
- Inducción de receptores
 - Receptores de FSH
 - Receptores de LH
 - Receptores de lipoproteínas
- Secreción de productos no esteroideos
 - Inhibina
 - Activador del plasminógeno
 - Proteoglicanos
- Estimulación de funciones celulares generales
 - Síntesis de ADN
 - Síntesis proteica
 - Captación de glucosa y formación de lactato.

1.3.2. Estrógenos

Los estrógenos además de los múltiples efectos sistémicos, ejercen una acción crítica a nivel ovárico (Williams, 1945; Goldenberg et al., 1972). En la tabla 1.2 se enumeran algunos de los efectos directos de estradiol en células de la granulosa.

Las células de la granulosa y las células tecales tienen receptores de estradiol. A nivel de las células de la granulosa los estrógenos promueven la división celular (Rao et al., 1978; Bradbury, 1960) y ejercen un efecto antiatréctico directo (Payne, Hellbaum, 1955; Ingraham, 1959). Por otro lado, el estradiol y sus agonistas tienen una función importante en la promoción de uniones estrechas intracelulares (Stein et al., 1991; Merk et al., 1972; Burghardt, Matheson, 1982), en el agrandamiento del antro y en el aumento de sus propios receptores (Richards, 1980).

Los estrógenos ejercen un efecto sinérgico con gonadotrofinas a diferentes niveles, incluyendo la promoción del crecimiento ovárico (Goldenberg et al., 1972), la formación de receptores de LH y FSH (Louvét, Vaitukaitis, 1976; Richards et al., 1979) y aumento de actividad de aromatasa (Adashi, Hsueh, 1982).

Por lo tanto, los estrógenos regulan la propia producción de estradiol por las células de la granulosa (Figura 1.9). Esta capacidad de los estrógenos de aumentar la actividad de la enzima que lo forma a partir de andrógenos, sería responsable del aumento exponencial de los niveles de estradiol. Según algunos autores ésta forma de autoamplificación podría jugar un papel central en el proceso de selección folicular, así como en el establecimiento de la dominancia (Hsueh et al., 1984). El(los) folículo(s) seleccionado(s) reducen los niveles de FSH, a través de la alta producción de estradiol, impidiendo la maduración de otros folículos. Sin embargo, los folículos seleccionados continúan su desarrollo aún con los niveles de FSH disminuidos.

Tabla 1.2
Efectos de estrógenos en células de granulosa en cultivo

- | | |
|----|--|
| 1. | Proliferación de células de la granulosa (crecimiento de folículos) |
| 2. | Acciones anti-atréticas |
| 3. | Formación del antro inducida por FSH |
| 4. | Incremento de receptores de estrógenos |
| 5. | Amplificación de la expresión de receptores de FSH y LH, estimulados por FSH |
| 6. | Amplificación de la acción de FSH sobre inducción de la aromatasa |

1.3.3. Crecimiento de células de la granulosa: gonadotrofinas y estrógenos

Durante el desarrollo folicular, las células de la granulosa sufren una serie de divisiones celulares repetidas. Si bien los estrógenos constituyen un mitógeno importante de las células de la granulosa (Pencharz, 1940), la FSH es un estímulo fundamental para promover su división (Goldenberg et al., 1972).

El patrón de proliferación y diferenciación de células de la granulosa, que caracteriza el desarrollo natural del folículo, puede reproducirse en ratas hipofisectomizadas por un régimen hormonal específico (Rao et al., 1978; Richards, 1980). Inyecciones de estradiol durante 3 días, seguidas por la aplicación de FSH durante 2 días, estimula la proliferación de células de la granulosa y el crecimiento del folículo hasta un estadio preovulatorio. Esta combinación de hormonas incrementa el contenido de ADN y la proporción de células de la granulosa marcadas después de administrar [³H]-timidina in vivo (Rao et al., 1978).

En ratas hipofisectomizadas, el desarrollo folicular se detiene en el estadio prenatal (Richards, 1980). Un bloqueo similar en la foliculogénesis ocurren en animales con mutaciones que provoquen deficiencia, deregulación o insensibilidad a gonadotrofinas, como los modelos de ratón hipogonadal (Mason et al., 1986), con delección de la subunidad β de FSH (Kumar

et al., 1997) o del receptor de la hormona (Dierich et al., 1998). Los ratones deficientes en el receptor de estrógenos tipo- α también presenta crecimiento folicular anormal e infertilidad (Lubahn et al., 1993), aunque el desarrollo de los folículos hasta estadio antral se debería a la presencia del receptor de estrógenos tipo- β en las células del folículo (Byers et al., 1997). Estos modelos han indicado que gonadotrofinas y estrógenos son los principales factores tróficos que controlan la proliferación y diferenciación de células de la granulosa *in vivo*, en fases posteriores al folículos preantral.

El efecto mitogénico de estas hormonas ha sido difícil de demostrar en los sistemas de cultivo comúnmente utilizados para el estudio de la diferenciación de células de la granulosa (Hsueh et al., 1984). Resultados de distinto laboratorios ha demostrado que tanto FSH como estradiol, cuando se administran de manera separada, ejercen efectos inhibitorios sobre el crecimiento de células de la granulosa (Reilly et al., 1996; Dodson, Schomberg, 1987; Feng et al., 1986; Hammond, English, 1987). Sin embargo, utilizando un sistema de cultivo de células de la granulosa de rata en alta densidad, la combinación de FSH y esteroides sexuales, en concentraciones fisiológicas, pueden ejercer un efecto pronunciado sobre la síntesis de ADN (Bley et al., 1997).

Si bien desde hace muchos años se ha reconocido que FSH induce la proliferación de células de la granulosa, recientemente se ha comprendido el mecanismo molecular de su acción mitogénica. Se ha demostrado que FSH activa directamente la expresión de ciclina D2 en células de la granulosa de rata en cultivo, siendo la ciclina D un componente esencial para la progresión en la fase G1 del ciclo celular (Robker, Richards, 1998). En el ratón deficiente en ciclina D2, no hay respuesta proliferativa a FSH, lo que conduce a la esterilidad de las hembras (Sicinski et al., 1996). Si bien en estos animales, la gonadotrofina no desencadena el crecimiento folicular, es capaz de aumentar la producción de estradiol,

indicando que la transducción de señales de FSH se encuentra intacta.

Si bien estas hormonas ejercen un papel fundamental en el control del desarrollo folicular, se ha propuesto que factores peptídicos intraováricos modulan localmente sus acciones (Adashi, Rohan, 1992; Greenwald, Roy, 1994). La participación de factores paracrinos y autocrinos, que sensibilizan a la acción de gonadotrofinas, constituiría un mecanismo que explicaría, más cabalmente, la estimulación por estas hormonas del crecimiento de las células de la granulosa en la selección folicular.

1.3.4. Reguladores peptídicos intraováricos

Los estadios más tempranos del crecimiento folicular son aparentemente independientes de las gonadotrofinas circulantes (Greenwald, Roy, 1994; Richards, 1980). Por ello, se asume que la iniciación del crecimiento folicular está regulada por factores ováricos autocrinos y paracrinos. Aún después de la formación del antro, cuando el desarrollo folicular es dependiente de las gonadotrofinas y los estrógenos, los procesos de crecimiento y selección folicular no son explicables exclusivamente por acción de estas hormonas.

1.3.4.1. Factores de crecimiento y diferenciación

El término factor de crecimiento se utiliza para describir un grupo amplio y diverso de péptidos que coordinan aspectos de interacción entre células. Los factores de crecimiento ejercen sus acciones sobre las células próximas y una de las mayores funciones es la de coordinar las actividades de distintos tipos celulares en momentos en los que ocurre remodelado de tejidos, como por ejemplo durante el desarrollo embrionario, crecimiento somático, maduración reproductiva, respuesta a injurias, inflamación o transformación neoplásica. Todos estos procesos requieren

proliferación celular (hiperplasia), extensión de las células existentes (hipertrofia) y apoptosis.

La foliculogénesis ovárica es un proceso dinámico caracterizado por una estrecha coordinación en la proliferación y diferenciación de los distintos tipos celulares somáticos del folículo, y de estos procesos con el crecimiento y maduración del ovocito.

Las gonadotrofinas son los reguladores primarios de la foliculogénesis, a través de mecanismos endócrinos clásicos. Además de estos mecanismos sistémicos, se ha revelado que mecanismos adicionales intraováricos se encuentran involucrados en el control del desarrollo folicular. El control local de la función ovárica está constituido por un complejo sistema regulatorio que modula la respuesta del folículo a las gonadotrofinas circulantes. La gran mayoría de los trabajos se han focalizado sobre la acción de factores de crecimiento. Dado que los mismos están involucrados en procesos de regulación en una gran variedad de tejidos, parecen ser candidatos lógicos para ejercer dicha función en el ovario.

El folículo ovárico produce una amplia diversidad de factores de crecimiento peptídicos y se han descrito acciones locales para un número importante de los factores de crecimiento conocidos (Tabla 1.3) (Adashi, Rohan, 1992).

Estos factores de crecimiento producidos por un tipo celular ejercer sus efectos, interactuando directamente con receptores en células del mismo tipo que los produce (*acción autocrina*) o presentes en otros tipos celulares dentro del folículo en desarrollo (*acción paracrina*). Por otra parte, existirían mecanismos adicionales mediante los cuales las células en contacto pueden controlar su función a través de acción yuxtacrina (activación de receptores en células adyacentes por factores de crecimiento unidos a la membrana) y a través de mecanismos intracrininos (sin secreción, regulando la función de la misma célula o de células conectadas a través de uniones estrechas)

Tabla 1.3
Potenciales reguladores autocrinos o paracrinos de la función ovárica

IGF-I	EGF	FGF
IGF-II	TGF- α	VEGF
IGF-BPs	HepB-EGF like	HGF
	PDGF	GnRH-like
TGF- β	NGF	Renina/angiotensina
Activina	Steel factor (ligando de kit)	Endotelina
Inhibina		VIP
Folistatina	TNF- α	Sustancia P
MIS	IL-1, IL-6	Catecolaminas
GDF-9	IL-12, IL-8, IL-2	GABA
BMP-3, BMP-15	LIF	Adenosina

IGF: insulin-like growth factor, BP: binding proteins, MIS: müllerian inhibiting substance, TGF: transforming growth factor, GDF: growth differentiation factor, BMP: bone morphogenetic protein, EGF: epidermal growth factor, PDGF: platelet-derived growth factor, NGF: nerve growth factor, TNF: tumor necrosis factor, IL: interleukin, FGF: fibroblast growth factor, VEGF: vascular endothelial growth factor, HGF: hepatocyte growth factor, VIP: vasointestinal peptide.

Se han establecido una serie de criterios que deben cumplirse para considerar a una compuesto como un **regulador autocrino o paracrino** de la función ovárica:

1. debe demostrarse producción local del regulador, ya sea por expresión de su ARNm, síntesis de la sustancia in vitro y localización inmunoquímica en las células
2. su expresión puede estar regulada, por hormonas u otros moduladores locales
3. debe tener acciones paracrinas o autocrinas por ejemplo a través de receptores específicos
4. su acción debe estar modulada a nivel local, por una proteína ligadora, por formación a partir de una forma inactiva precursora o por su metabolismo
5. debe ejercer una función regulatoria in vivo.

Idealmente, sólo aquellas moléculas que cumplan estos criterios podrían considerarse reguladores intragonadales.

Estudios fisiológicos, bioquímicos, farmacológicos y moleculares han provisto gran información acerca de potenciales mecanismos de control intragonadal. Sin embargo, hasta el presente, un número importante de posibles reguladores paracrinicos o autocrinos de la función ovárica no han sido evaluados de manera completa y rigurosa.

En algunos casos, factores proteicos no se han caracterizado químicamente de manera completa, analizando distintas formas generadas por modificaciones post-transcripcionales (variantes de "splicing") o post-traduccionales (como variantes de glicosilación). En otros casos, no se ha obtenido evidencia certera de su producción local, probablemente debido a que son producidos en pequeñas cantidades y sujetos a una rápida degradación. En la mayoría de los casos, la función gonadal se ha deducido de modelos in vitro. No obstante, la relevancia fisiológica de estas observaciones no ha sido claramente establecida. En particular, ha resultado difícil determinar si, en su entorno natural, las células de la granulosa se hallan expuestas a concentraciones efectivas de estos factores

En la actualidad, el desarrollo de las tecnologías de animales transgénicos permite alterar la expresión de un gen seleccionado y observar el efecto in vivo sobre el desarrollo y función del tejido. La utilización de este tipo de abordajes, al estudio de la gonadogénesis y la regulación de la foliculogénesis está demostrando de manera contundente la función de distintos genes que se encuentran implicados en la regulación folicular.

A continuación se realiza una breve descripción del sistema intraovárico del IGF-I, como ejemplo representativo de regulador peptídico intraovárico, mientras que en los capítulos siguientes de esta tesis se analizará en detalle la función de otros reguladores locales, tales como TGF- β (módulo I), activina (módulo II), inhibina (módulo V), TNF- α (módulo III) y factores derivados del ovocito (módulo IV)

1.3.4.2. El factor de crecimiento similar a insulina de tipo I, IGF-I

El IGF-I, es una molécula ubicua formada por 70 aminoácidos, y se lo ha postulado como uno de los posibles reguladores intragonadales (Adashi et al., 1985).

Gran cantidad de información sugiere la existencia de un sistema IGF intraovárico ya que es un sitio de producción, recepción y acción del IGF-I (Adashi, 1993). Se ha establecido claramente en varias especies, que el ovario, y en particular las células de la granulosa, expresan IGF-I y su síntesis se encuentra regulada hormonalmente (Hsu, Hammond, 1987; Hammond et al., 1985; Oliver et al., 1989; Hammond et al., 1988; Murphy et al., 1987; Hernandez et al., 1989). Si bien la expresión de IGF-I se encuentra restringida a células de la granulosa, tanto éstas como las células tecales presentan receptores específicos y son blanco de acción del IGF-I (Poretsky et al., 1990; Tsafiriri, Adashi, 1994; Adashi et al., 1988; Adashi et al., 1988). La acción del IGF-I se encuentra sujeta a modulación a través de la

elaboración local de proteínas ligadoras (Clemmons, 1990; Ooi, 1990).

Se han descrito múltiples acciones ováricas de este factor, postulándose un efecto amplificador de la acción de gonadotrofinas en el crecimiento y diferenciación (Baraño, Hammond, 1984; Bley et al., 1992; Adashi et al., 1985) y por lo tanto en el proceso de selección folicular.

El ratón deficiente en IGF-I presenta un fenotipo idéntico al knock-out de FSH, es decir el desarrollo del folículo se bloquea en estadio preantral (Zhou et al., 1997). La ausencia de IGF-I disminuye la expresión del receptor de FSH, lo que conduce a una relativa insensibilidad a gonadotrofinas, propuesta como mecanismo para el arresto folicular observado en este modelo de estudio.

1.4. Cultivos de células de granulosa: el modelo experimental

Numerosos laboratorios han estudiado la maduración de las células de la granulosa in vitro y han dilucidado el control hormonal de su diferenciación, estudiando aspectos como la biosíntesis de esteroides, la regulación de los receptores de gonadotrofinas, la comunicación intercelular o la regulación de la expresión de diversos genes involucrados en estos procesos (Hsueh et al., 1984). Sin embargo, los mecanismos de regulación de la proliferación de estas células han sido comparativamente menos estudiados.

Un número importante de los estudios originales se ha realizado en medio de cultivo suplementado con suero, el cual provee nutrientes, factores de crecimiento y hormonas que facilitan la adhesión celular, el mantenimiento y el crecimiento in vitro. Sin embargo, 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 disminuye el acceso a numerosos factores presentes en la circulación. El reemplazo del suero por medios definidos ha puesto en evidencia respuestas que permanecían enmascaradas por su presencia.

Los experimentos presentados en esta tesis, fueron realizados utilizando un modelo experimental que permite el estudio de los factores que controlan la proliferación y diferenciación de células foliculares. Dicho modelo consiste en cultivo de células de la granulosa obtenidas de folículos preantrales de ratas inmaduras luego del tratamiento con implantes conteniendo dietilstilbestrol (DES), un agonista de estrógenos. Las células fueron cultivadas sobre una matriz de colágeno y mantenidas en medio definido, libre de suero, en presencia de diferentes factores.

El modelo experimental elegido provee una serie de ventajas:

- 1) Las células se encuentran en un estado relativamente indiferenciado.
- 2) El tratamiento con estrógenos in vivo induce la formación de múltiples folículos preantrales y provee un número de células relativamente homogéneas en un mismo estado de desarrollo,
- 3) El aislamiento de las células no requiere tratamiento con enzimas.
- 4) El cultivo en medio libre de suero permite estudiar el efecto de gonadotrofinas, esteroides y factores peptídicos sin interferencia del suero,
- 5) Los cultivos primarios de granulosa, a diferencia de la mayoría de las líneas celulares obtenidas, mantienen respuesta hormonal y funciones fisiológicas semejantes a las condiciones in vivo, tanto en la regulación de la esteroidogénesis como en la modulación del crecimiento.

Si bien los cultivos celulares constituyen un medio conveniente y reproducible para estudiar la regulación hormonal del crecimiento y diferenciación, presenta una serie de limitaciones:

- 1) Los métodos in vitro no tienen en cuenta cambios en la vasculatura y microcirculación folicular, importante para el acceso de hormonas a los folículos in vivo.
- 2) El cultivo de células aisladas no tiene en cuenta las interacciones entre distintos tipos celulares como con las células de la teca o la relación con los complejos cumulus-ovocito
- 3) No tienen en cuenta la heterogeneidad estructural y funcional de las subpoblaciones de células de granulosa en un folículo dado.

1.5. Objetivos

Objetivo general

En el desarrollo del folículo ovárico, las células de la granulosa adquieren la capacidad de interactuar de manera específica y sincronizada con las señales hormonales, paracrinas y autocrinas que dirigen los procesos de crecimiento y maduración folicular.

Los mecanismos responsables de la regulación de la selección y dominancia folicular se conocen sólo parcialmente. El objetivo general de esta tesis es estudiar *el papel fisiológico que cumplen factores peptídicos intraováricos*, así como hormonas hipofisarias en la regulación de la función de las células de la granulosa.

Objetivos particulares

A los efectos de facilitar la presentación y el análisis de los resultados obtenidos, esta tesis ha sido dividida en módulos correspondientes a los distintos factores estudiados.

Los objetivos particulares son:

- I. Determinar si el TGF- β es un regulador autocrino de la función folicular.*
Estudiar la producción de este factor por células de la granulosa, la regulación hormonal de su biodisponibilidad, y los efectos sobre el crecimiento de estas células.
- II. Comparar las acciones ejercidas por el TGF- β con aquellas promovidas por activina, otro miembro de la misma superfamilia de péptidos.*
- III. Estudiar el efecto del factor de necrosis tumoral- α sobre la regulación hormonal de la función de las células de la granulosa*
- IV. Analizar acciones parcrinas del ovocito, modulando el crecimiento de las células somáticas del folículo*
- V. Establecer la regulación de la producción de inhibinas diméricas por hormonas y factores intraováricos, en particular por TGF- β , activina y factores derivados del ovocito.*

2. Materiales y métodos

2.1. Reactivos

La FSH ovina (oFSH-17), activina A recombinante y follistatina recombinante se obtuvieron del National Hormone and Pituitary Program. El factor de crecimiento similar a insulina-I (IGF-I) fue comprado a Bachem California (Torrance, CA), el factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1) de plaquetas porcinas, a R&D Systems (Minneapolis, MN), el factor de necrosis tumoral- α recombinante de ratón (TNF- α) a Genzyme Diagnostics (Cambridge, MA). Activina A fue provista por gentileza del Dr. H. Sugino (University of Tokushima, Japón). La [metil- 3 H]-timidina, [35 S]metionina, [3 H]-pregnenolona, [3 H]-testosterona se obtuvieron de Dupont NEN Research Products (Boston, MA). Dietilstilbestrol (DES), hialuronidasa, collagenasa, Hoechst y otros reactivos fueron provistos por SIGMA (St. Louis, MO). El colágeno fue preparado a partir de cola de rata como se describió previamente (Bley et al., 1992).

2.2. Obtención y cultivo de células de la granulosa

Ratas inmaduras (21 a 23 días) fueron tratadas con implantes de dietilstilbestrol (5mg DES/implante) por 4 días (Bley et al., 1992). Los ovarios fueron liberados de tejido conectivo y adiposo y se trataron secuencialmente con una solución de EGTA 6,8 mM y sacarosa 0,5 M en medio de cultivo (DMEM:F12, conteniendo Hepes 10 mM, pH:7,4). Las células fueron obtenidas por extrusión a través de una malla de nytex, resuspendidas en medio de cultivo y purificadas por colchón de Percoll (40%). La viabilidad se evaluó por exclusión de azul de tripán.

Las células fueron cultivadas en placas múltiples (Nunc de 96 celdas) en medio DMEM:F12 (1:1), suplementado con bicarbonato de sodio (2.2 g/l) conteniendo gentamicina (40 μ g/ml), en placas de cultivo cubiertas con colágeno purificado de tendones de cola de rata.

La densidad inicial de plaqueo fue de 3×10^5 células viables/ cm^2 (equivalente a 100.000 células/pocillo), excepto que se indique lo contrario. Los cultivos se incubaron a 37°C con 5% CO_2 . Luego de 2 horas, se removió

el medio para remover las células no adheridas y se reemplazó por medio fresco conteniendo las hormonas y factores según el diseño experimental. Todos los cultivos celulares se realizaron en ausencia de suero.

2.2.1. Incorporación de timidina

La síntesis de ADN se determinó por incorporación de 3 H-timidina de acuerdo al método previamente validado en estas condiciones de cultivo (Bley et al., 1992; Bley et al., 1991; Dain et al., 1993). Luego de 24 hs de estimulación, se agregó la timidina tritiada (4 μ Ci/ml) y los cultivos se cosecharon a las 48 de sembradas sobre filtros de fibra de vidrio (Wathman GF-C), usando un cosechador automático (Nunc). La radioactividad fue medida en un contador de centelleo líquido.

2.2.2. Determinación de ADN

La determinación de ADN de los cultivos celulares fue realizada usando el compuesto fluorescente Hoechst H33258 como se encuentra descrito (Labarca, Paigen, 1990). Se removió el medio, se sonicaron las células e incubó con el reactivo (100 μ g/ml), midiéndose la fluorescencia en un espectrofluómetro (Jasco FP-777) a las longitudes de onda de excitación y emisión en 350 y 455 nm respectivamente.

2.2.3. Conteo de células

Setenta y dos horas luego del plaqueo, las células se lavaron, se trataron con tripsina (0.2%) por 5 minutos a 37°C y se resuspendieron por pipeteo repetido. El número de células vida se determinó en hemocitómetro en cultivos cuadruplicados.

2.2.4. Índice de marcación

Para determinar el porcentaje de células que sintetizaron ADN, las células se cultivaron en placas de 35 mm cubiertas con colágeno. La marcación se realizó en las condiciones anteriormente descritas. La incubación se detuvo y se fijaron las células con lavados en frío con PBS, con 5% ácido tricloroacético y con etanol. Las placas se procesaron para la autorradiografía. El porcentaje de células marcadas se determinó contando al menos 500 células/placa (Bley et al., 1992).

2.3. Cultivo de células BGC-1

La línea de células de la granulosa bovina (BGC-1), fue obtenida en nuestro laboratorio por immortalización espontánea, a partir de cultivos primarios de células de la granulosa bovina (Bernath et al., 1990). El cultivo de células BGC-1 fue mantenido en crecimiento en placas de 10 cm. en medio DMEM:F12 (1:1) con bicarbonato de sodio (2.2 g/l) conteniendo 5% de suero de ternero neonato (NCS) a 37°C en atmósfera húmeda con 5 % de CO₂ hasta alcanzar subconfluencia (4×10^6 células/placa), momento en que fueron resuspendidas por tripsinización y sembradas a baja densidad. Para los experimentos de síntesis de ADN, las células BGC-1 fueron sembradas a una densidad de 3000 células/pocillo sobre colágeno en placas de 96 pocillos (Lerner et al., 1995). La timidina tritiada (4 µCi/ml) y los factores de crecimiento indicados se agregaron luego de que las células se hubieran adherido (2 horas). Al cabo de 24 horas se cosecharon los cultivos.

2.4. Cultivo primario de células de la granulosa bovina

Las células de la granulosa fueron aisladas de folículos pequeños (2-8 mm) por aspiración. Los glóbulos rojos se eliminaron por medio de una exposición breve (20 segundos) en agua destilada. Las células fueron cultivadas en medio DMEM:F12 (1:1), suplementado con bicarbonato de sodio (2.2 g/l), en presencia de 10% de NCS y antibióticos (Lerner et al., 1995). La incorporación de timidina tritiada se evaluó con el mismo protocolo que en las células BGC-1.

2.5. Obtención de ovocitos bovinos

Los ovocitos fueron obtenidos a partir de ovarios bovinos provenientes de animales sacrificados para consumo, en un frigorífico cercano (Frigorífico Rioplatense). Los ovarios recién extraídos se transportaron hasta el laboratorio en un termo con solución fisiológica a 25 - 30°C y fueron procesados en un lapso menor a cuatro horas.

Los ovocitos fueron obtenidos por punción de folículos antrales de 2 a 8 mm de diámetro, utilizando jeringas de 6 cc. y agujas 18G. El material recolectado se dejó decantar durante 20 minutos y se lavó con

PBS, con el agregado de 2% de suero de ternero, penicilina (100UI/ml) y estreptomycin (100µg/ml).

La recolección y selección de los ovocitos se realizó en el mismo medio de lavado, en placas de 100 mm de diámetro. Los ovocitos fueron clasificados en grupo A: rodeados por al menos 3 capas de células del cumulus y citoplasma homogéneo, y B: ovocitos parcialmente desnudos o con citoplasma heterogéneo. (Leibfried, First, 1979).

Las células del cumulus fueron eliminadas agitando con vortex durante 2 minutos en medio TC 199 con hialuronidasa al 0.1% y luego por medio de pipetas de vidrio afinadas.

2.6. Maduración de ovocitos *in vitro* (IVM)

La maduración de los ovocitos seleccionados se realizó en placas de 4 pocillos (Nunc), durante 24 horas, a 39°C en atmósfera húmeda con 5% CO₂. Se colocaron 50 complejos cumulus ovocito en 500 µl de medio TC 199 con 5% de suero fetal bovino (FBS), oFSH (200 ng/ml) y antibiótico, y fueron cubiertos con 2 ml de aceite mineral.

Para inhibir la maduración espontánea *in vitro*, un grupo de complejos cumulus-ovocito se cultivaron en el mismo medio en presencia de cicloheximida (10µg/ml). Luego de 24 hs, los ovocitos fueron desnudos y lavados 3 veces en medio CR1aa antes de su utilización.

2.7. Determinación de la maduración de ovocitos

Luego de 24hs de cultivo, se evaluó la maduración de ovocitos por la tinción de Hoechst (Pursel et al., 1985). Los ovocitos se lavaron en PBS y se incubaron en una solución de Hoechst 33342 (50µg/ml en CR1aa) 60 min a 39°C. La maduración nuclear se evaluó con un microscopio de fluorescencia y los ovocitos se clasificaron en inmaduros con vesícula germinal (GV) o maduros con ruptura de la vesícula germinal (GVBD).

2.8. Obtención de ovocitos de rata

Los ovocitos de rata fueron aislados a partir de ovarios de rata Sprague-Dawley

inmaduras (25 días) como se describió previamente (Zuccotti et al., 1991). Los ovarios cortados e incubados en TC199-Hepes (20 mM) con 2.5mg/ml de colagenasa y 400 U/ml de DNAsa. Luego de 20 min de incubación a 37°C con agitación constante, se agregó 1 % de BSA y se filtró a través de una malla de nylon de 200µm. El filtrado se centrifugó a 190xg durante 2 min. y el pellet se resuspendió en TC199 con 2.4mM EGTA. Tres minutos después se centrifugo, resuspendió en TC199 y se agitó con vortex 2 min.

2.9. Obtención de complejos cumulus-ovocito (COC) murinos y remoción del ovocito

Los ovarios fueron obtenidos a partir de ratones BALB/c de 23-25 días tratados con 5 UI de gonadotrofina de yegua preñada (PMSG) 44 a 48 hs antes de su utilización. Los COCs fueron obtenidos por punción de folículos antrales con agujas 25G en medio TC199-H suplementado con 5% de FBS y antibiótico. La remoción de los ovocitos de los complejos aislados (ovocitotomía) fue realizada por medio de micromanipulación según la técnica descrita por Vanderhyden y col.(1990) con la colaboración del Dr. Marcelo Rubinstein (INGEBI). Brevemente, usando un microscopio invertido Leitz Labovet FS y dos micromanipuladores Leitz, los COC fueron sujetados por succión con una de las pipetas (holding). Con otra pipeta de punta fina el COC fue atravesado penetrando en la pipeta holding. El contenido del ovocito es succionado a través de esta última, resultando complejos ovocitotomizados, donde la estructura tridimensional del COC fue conservada.

2.10. Determinación de la expansión de las células del cumulus en complejos intactos y ovocitotomizados

Los COCs y los complejos ovocitotomizados (OOX) fueron colocados en gotas de 25 µl de medio TC 199 con 2.2 g/l de bicarbonato suplementado con 5% de

FBS y antibióticos. Se agregó oFSH (500ng/ml) como promotor de la expansión del cumulus. Las gotas fueron cubiertas con aceite mineral y los complejos fueron cultivados durante 18 hs a 37°C en 5% de CO₂. Luego de la incubación, se determinó la expansión de las células del cumulus según una escala subjetiva (0 a +4) descrita por Vanderhyden y col.(1990). El valor 0 indica que no hay expansión, mientras que el valor +4 indica expansión máxima de las células, incluida la corona radiata.

2.11. Determinación de esteroides

El efecto de los distintos tratamientos sobre la producción de esteroides se evaluó por radioinmunoensayos específicos de progesterona y estradiol (Baraño et al., 1991). En ambos casos, se analizaron los niveles acumulados en los medios a las 60 o 72 hs. de cultivo, en condiciones basales y estimuladas por FSH. Para la determinación de estradiol se añadió a los cultivos androstenediona (0.35 µM) como sustrato aromatizable.

2.12. Determinación de AMPc

Las determinaciones de AMPc se realizaron en duplicados de cultivos por radioinmunoensayo. Para la medición de los niveles intracelulares a la 1-3 horas de los estímulos se aspiró el medio, se agregó agua destilada fría, se dejó 30 minutos y se congeló a -20°C. El AMPc extracelular acumulado en 48 hs. se ensayó en alícuotas del medio de incubación. Todas las muestras fueron tratadas a 100°C por 3 min. para eliminar cualquier actividad de fosfodiesterasa. El AMPc se acetiló usando anhídrido acético/ tetraetilamonio (Steiner et al., 1969) y se realizó el radioinmunoensayo utilizando un anticuerpo específico (Chemicon). El nucleótido se marcó con Na¹²⁵I usando el método de cloramina T limitante y se purificó por cromatografía en placa delgada (TLC) en celulosa, para su utilización en el RIA.

2.13. Enzimo-inmuno ensayo para inhibinas diméricas (ELISA)

Las células de granulosa se cultivaron por 72 hs. en presencia de los distintos estímulos. Los niveles de inhibinas A y B en los medios condicionados fueron determinados por enzimo-inmunoensayos de dos sitios (ELISA) específicos para cada uno de los péptidos como se describió previamente (Groome et al., 1994; Groome et al., 1996). Brevemente, los MC se diluyeron en FCS (suero fetal bovino) de acuerdo a la cantidad de inhibina presente. Antes de la determinación, las muestras y los standards se trataron con medio volumen de SDS 6% y fueron calentados a 100°C por 3 min. A continuación las muestras se trataron con una solución de H₂O₂ por 30 min. a temperatura ambiente. Se utilizó un sistema de amplificación de la enzima fosfatasa alcalina. Como standards se utilizaron inhibinas A y B recombinantes humanas. Activina A, B y follistatina presentan una reactividad cruzada <0.1% en ambos ensayos. Inhibina A tiene <0.5% de reacción cruzada en el ensayo de inhibina B, mientras que inhibina B tiene cruce <0.1% (Groome, O'Brien, 1993; Groome et al., 1996). La sensibilidad de los ensayos fue de 7 pg/ml para inhibina A y de 15 pg/ml para inhibina B. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron menores que 10% para ambos ensayos. Se realizaron validaciones para la utilización de estos ensayos para la detección de inhibina de rata. La comparación de las pendientes de las regresiones lineales de los datos transformados para los standards humanos del ensayo y los medios condicionados o suero de rata no presentaron desviación significativa del paralelismo (Figura 2.1)

2.14. Marcación y electroforesis en geles

Las células fueron cultivadas como se describe previamente durante aproximadamente 68 horas, el medio de cultivo fue removido, se agregó medio DMEM libre de metionina con metionina [³⁵S] (50 µCi/ml) y se incubó por 3 horas a 37°C. Al finalizar el período de marcación, el medio fue colectado y las proteínas celulares fueron extraídas con SDS 10% por 10 minutos. Se guardaron a -20 °C para su posterior análisis.

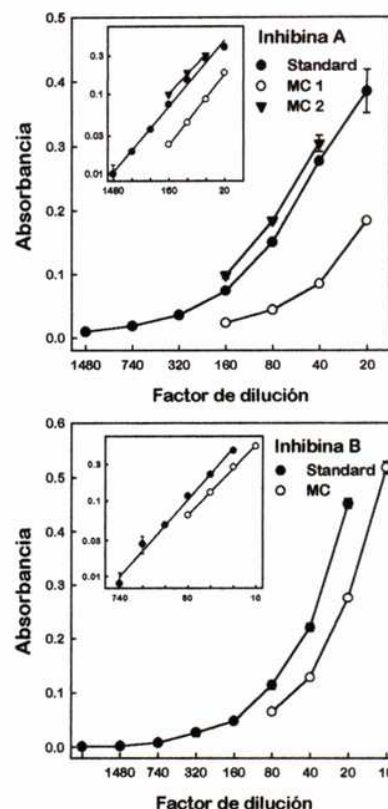


Figura 2.1: Análisis de paralelismo ELISAs para inhibina A o inhibina B.

Diluciones sucesivas de standards humanos de inhibina A, inhibina B o medios condicionados por células de granulosa de rata se analizaron en los inmuno-ensayos para cada una de las inhibinas diméricas. Los gráficos insertados corresponden a los datos luego de la transformación logarítmica y las regresiones lineales obtenidas. La comparación de las pendientes no indicó apartamiento del paralelismo.

Alícuotas de los medios de incubación fueron precipitadas con TCA: 5-10 µl de las muestras se agregaron a 1 ml de agua conteniendo 1 mg/ml de BSA en frío. Se agregó un volumen de TCA 40% y se dejó precipitar en frío durante 15-20 minutos. Posteriormente se filtró por Wathman GF-A, se lavó 2 veces con etanol frío y la radioactividad incorporada fue medida en un contador de centelleo líquido. Por otra parte alícuotas fueron aplicadas a geles de poliacrilamida (8%) con SDS en condiciones reductoras (Laemli, 1970). El gel fue secado y expuesto con placas Kodak X-OMAT AR-5 por 2-3 días.

2.15. Metabolismo de esteroides y cromatografía en capa delgada

Los diferentes esteroides radioactivos (1×10^5 cpm/pocillo de [^3H]-pregnenolona o [^3H]-testosterona) se agregaron a las 68 horas de cultivo. Luego de 0.5-3 horas los medios fueron colectados, extraídos con éter y separados por cromatografía en capa delgada en una mezcla de ciclohexano, cloroformo y éter (2:2:1). Las placas de sílica fueron rociadas con intensificador (^3H -Enhancer-DuPont, NEN Research Products) y expuestas para autoradiografía con placas Kodak por 4-5 días.

Los metabolitos producidos por los cultivos de células de granulosa se identificaron por comparación con los esteroides standard corridos en paralelo. Por otro lado, la identidad fue confirmada por la desaparición o el aumento de metabolitos luego del agregado de un exceso de sustrato competitivo no marcado.

En todos los casos, se realizó una preincubación de 3 hs e incubación con aminoglutarimida (200 μM) como inhibidor de la enzima $\text{P}_{450\text{SCC}}$.

2.16. Cultivo de células Mv1Lu - CCL64. Actividad de TGF- β

Las células Mv1Lu (mink lung epithelial cell), CCL-64 (código ATCC) se cultivaron como se describió previamente (Danielpour et al., 1989). Los cultivos se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS). Para los ensayos de incorporación de timidina, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 7.5×10^3 células/pocillo en DMEM conteniendo 0.2% de FBS y luego de 1 hora, se agregaron los distintos estímulos a ensayar. En paralelo se realizó una curva de TGF- β standard (250-0.3 pg/pocillo). A las 20 hs se adicionó la [^3H]-timidina (concentración final 10 $\mu\text{Ci/ml}$) y las células se cosecharon 4-6 hs más tarde. La radioactividad incorporada en el ADN fue medida en un contador de centelleo líquido.

2.17. Cultivo de células Swiss 3T3

Las células Swiss 3T3 se cultivaron según se describió (Corps, Brown, 1993). Los

cultivos se propagaron en medio DMEM con 10% FBS en placas de 100mm a 37°C en atmósfera con 10% CO_2 . Para las mediciones de la iniciación de la síntesis de ADN, las células se plaquearon en placas de 96 pocillos a 5×10^3 células/pocillo en DMEM con 10% FBS. Luego de 3 días, se reemplazó el medio y se dejó que el cultivo se hiciera confluyente y quiescente (3-4 días). Se removió el medio agotado y se reemplazó por medio fresco sin suero conteniendo los estímulos a ensayar y [^3H]-timidina (concentración final 3 $\mu\text{Ci/ml}$, 10^{-6}M). Las células se cosecharon 28 hs después y se analizó la radioactividad incorporada al ADN.

2.18. Preparación y tratamientos del medio condicionado de células de granulosa

Cultivos de células de granulosa de rata se cultivaron, en las condiciones que se indiquen, y a las 48, 72 o 96 hs se colectaron los medios condicionados (MC). Estos MCs se centrifugaron a 1000 rpm por 10 min. para eliminar restos celulares y guardaron a -20°C hasta el momento de su utilización.

2.18.1. Activación del TGF- β latente:

La activación del TGF- β latente presente en los MC se realizó por tratamiento ácido o por calentamiento (5 min. a 80°C) (Brown et al., 1990; Danielpour et al., 1989). Para la activación ácida, el MC se trató con ácido clorhídrico (25 μl HCl 5N/ 1ml MC, pH final ~3) durante 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se neutralizó con una solución de NaOH/Hepes (35 μl /1ml MC), ensayándose inmediatamente.

2.19. Extracción de ARNm total y Northern blot

El ARN total de los cultivos primarios de células de la granulosa se extrajo como se describió previamente (Chomczynski, Sacchi, 1987). La transferencia del ARN de los geles conteniendo formaldehído a membranas Zeta-Probe y la subsecuente hibridización se realizaron en las condiciones especificadas por los fabricantes (Bio-Rad Laboratories). Los resultados se encuentran normalizados usando una sonda que reconoce el mRNA de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

(G3PD). Las sondas que se utilizarán para la detección de los ARNm específicos y G3PD se marcaron usando un sistema de primers al azar. La cuantificación de las bandas se realizó con el programa ImageQuant (Molecular Dynamics). Los ADNc de las subunidades α , βA y βB fueron gentilmente provistas por el Dr. Aaron Hsueh.

2.20. Extracción de factores del fluido folicular

Las muestras de fluido folicular humano se obtuvieron por laparoscopia de mujeres que se encontraban en programas de fertilización "in vitro". Los fluidos individuales se centrifugaron a 4°C durante 15 min. a 1500 x g para remover las células que lo acompañan y se guardaron a -20 °C para su posterior procesamiento.

El extracto ácido-etanólico se realizó esencialmente según ha sido descrito (Roberts et al., 1980). El fluido folicular liofilizado se suspendió en solución ácido etanólica (etanol 20%, HCl 0,05M, PMSF y otros inhibidores de proteasas). Luego de extraer por 24 horas a 4°C, la mezcla se centrifugó y el residuo se extrajo nuevamente por 2 horas. Ambos sobrenadantes se llevaron a pH 5,2 y se reguló a ese pH. Inmediatamente se agregaron 2 volúmenes de etanol y 4 volúmenes de éter. La mezcla se mantuvo a -20°C por 2 días. El precipitado resultante se recuperó por centrifugación y fue redissuelto en ácido acético 1 M. Posteriormente se dializó el extracto contra ácido acético 0,17 M en membranas de corte en 3500, se liofilizó y conservó a -20°C.

2.21. Ensayo de agar blando

El ensayo de formación de colonias de células NRK 49F (normal rat kidney fibroblast, clon 49F) o BGC-1 en agar blando fue realizado por modificación de la técnica descrita (Schultz-Cherry, Murphy-Ullrich, 1993; Roberts et al., 1980). Brevemente las muestras a ensayar se incluyeron en medio DMEM-F12 con 0.3% de agar, suplementado con 10% de SFB y conteniendo 2.000 células/pocillo. Medio mililitro de la suspensión fue depositada sobre una capa de 0.5 ml de medio con 0.7% de agar en placas de 24 pocillos. La incubación se realizó por 7 días a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Al término de este tiempo se contó el número de colonias mayores que 63 μ m (>8-10 células).

2.22. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media $\pm$ error estándar de triplicados de cultivos. Las comparaciones estadísticas de los resultados se realizaron por ANOVA y test de Tukey-Kramer de comparaciones múltiples luego de transformación logarítmica de datos (Sokal, Rohlf, 1995). Las curvas dosis-respuesta se analizaron mediante un programa (ALLFIT) basado en la ecuación logística de 4 parámetros (DeLean et al., 1978). Todos los experimentos fueron realizados al menos 3 veces con resultados similares.

3. Módulo I

***El factor de crecimiento
transformante- β como modulador
autocrino en el ovario***

3.1. Introducción

3.1.1. Superfamilia de factores relacionados con el TGF- β

La Superfamilia de péptidos relacionados con el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) está formada por una serie de proteínas estructuralmente relacionadas, que cumplen importantes papeles en una diversidad de procesos biológicos. Son miembros de esta superfamilia: el TGF- β , la activina, la inhibina, la proteína morfogénica de hueso (BMP), proteínas relacionadas al péptido decapentaplégico Vg, la sustancia inhibidora Mülleriana (MIS), los factores de crecimiento y diferenciación (GDF 1-9) y el factor neurotrófico derivado de glía (GDNF).

3.1.2. El TGF- β

El TGF- β es una proteína comprometida en la modulación de crecimiento y diferenciación de una amplia diversidad de tipos celulares (Massague, 1990). Aunque originalmente se denominó de esta forma por la característica de inducir un fenotipo transformado de células en cultivo (Roberts et al., 1980), el TGF- β se encontró asociado frecuentemente en la supresión del crecimiento de células tumorales (Massague, 1990). Se han descrito efectos contradictorios del TGF- β sobre células normales. Dependiendo del tipo celular y del entorno, es capaz de estimular o inhibir el crecimiento (Moses, Serra, 1996). Asimismo, contribuye tanto en la iniciación, como en la terminación de procesos involucrados en la respuesta inflamatoria y en la reparación de tejidos (Massague, 1990).

Se han clonado 5 formas de TGF- β (TGF- β 1 a β -5) y en mamíferos, genes distintos codifican para las tres isoformas TGF- β 1, β 2 y β 3, que se expresan en patrones únicos, ocasionalmente superpuestos y pueden cumplir una variedad de funciones in vivo (Proetzel et al., 1995; Sanford et al., 1997; Letterio et al., 1994).

3.1.3. Estructura

La molécula activa de TGF- β está formada por 2 subunidades idénticas, unidas por

puentes disulfuro, con un peso molecular aproximado de 25 kDa. Estructuralmente estos ligandos presentan un alto grado de identidad aminoacídica (64-82%) con 9 residuos de cisteína invariables. Se ha determinado la estructura del TGF- β 1 y β 2 (Daopin et al., 1992). Ocho de las nueve cisteínas forman cuatro enlaces disulfuro intracadena, mientras que la restante (Cys 77) forma enlace intercadena con el residuo correspondiente de la otra subunidad.

La característica distintiva del TGF- β es el conjunto de cisteínas formado por tres de los cuatro enlaces intracadena que mantienen la integridad estructural del monómero.

3.1.4. Activación del TGF- β

El TGF- β es secretado por las células en una forma inactiva que es incapaz de interactuar con los receptores celulares (Miyazono, Heldin, 1991; Munger et al., 1997). La actividad del TGF- β maduro se encuentra enmascarada por su asociación no covalente con un dímero de la secuencia N-terminal del propéptido, llamada LAP (latency-associated peptide) (McMahon et al., 1996). La porción LAP se encuentra a la vez, unida por puentes disulfuro a proteínas ligadoras de TGF- β latente (LTBP). La formación de estos complejos latentes aumenta la estabilidad de la citoquina y sirve de medio para la interacción con la matriz extracelular y superficies celulares, asegurando una fuente rápida para la activación local (Dallas et al., 1995; Taipale et al., 1994).

El TGF- β latente puede activarse in vitro por tratamiento a pH extremo, por calentamiento o por agentes caotrópicos (Brown et al., 1990) pero ninguno de estos mecanismos participa en la activación durante el crecimiento y desarrollo normal. Una variedad de tratamientos más fisiológicos, también pueden activar el TGF- β . Ejemplos de este tipo de activación son la deglicosilación, la proteólisis por calpaína, cathepsina o plasmina (Flaumenhaft et al., 1992; Yee et al., 1993), o trombospondina (Schultz-Cherry, Murphy-Ullrich, 1993).

La activación ejercida por plasmina se realiza por proteólisis de la porción LAP y se

ha descrito un modelo para este mecanismo que involucra al receptor del activador de plasminógeno y al de manosa-6-fosfato/IGF-II (Dennis, Rifkin, 1991). Existen evidencias de correlación in vivo para la activación dependiente de plasmina, sin embargo, los ratones knock-out de plasmina no reproducen los fenotipos del knock-out de TGF- β (Bugge et al., 1996). Estas observaciones podrían indicar que la plasmina no es la responsable de la activación del TGF- β in vivo en condiciones fisiológicas normales.

La trombospondina-1 (TRB-1) es una proteína homotrimérica secretada por muchos tipos celulares (Schultz-Cherry, Murphy-Ullrich, 1993). En sistemas libres de células, es capaz de unirse y de activar el complejo de TGF- β latente (Schultz-Cherry et al., 1994). Se piensa que este mecanismo es el resultado de un cambio conformacional, probablemente en la LAP, requiere la presencia de las repeticiones centrales de TRB-1 y puede reproducirse por pequeños péptidos derivados de estas secuencias conteniendo los aminoácidos KRFK (Schultz-Cherry et al., 1995). La TRB-1 interactúa con la región N-terminal de LAP formando un complejo trimolecular que altera la conformación y permite al TGF- β interactuar con su receptor. Recientemente se ha propuesto que la TRB-1 sería el principal activador del TGF- β in vivo (Crawford et al., 1998). Se encontró una correlación de fenotipos entre los ratones knock-out para TGF- β y TRB-1 en diversos órganos y el tratamiento de las crías deficientes en TRB-1 con el péptido KRFK revierte algunas de las anormalidades y aumenta la activación del TGF- β .

Recientemente, se ha descrito que la interacción del TGF- β latente con la integrina $\alpha v \beta 6$, a través del sitio RGD, conduce a la conversión del TGF- β en una forma biológicamente activa (Munger et al., 1999).

3.1.5. Receptores

El TGF- β ejerce sus efectos por unión a receptores específicos de la superficie celular. Se han clonado cuatro receptores (I, II, III y endoglina), de los cuales sólo dos de ellos (I y II) median la señalización del TGF- β . El receptor de tipo III, que es el

betaglicano, y la endoglina funcionarían como aceptores de membrana y matriz extracelular que preservarían al péptido de la degradación y aumenta la unión del ligando a sus receptores de señalización (Ruoslahti, 1989; Lopez-Casillas et al., 1993). Los receptores I (50-60 kDa) y II (65-85 kDa) presentan en su dominio citoplasmático dominios de quinasa en treonina o serina responsables de desencadenar los efectos intracelulares (Wrana et al., 1992; Massague, 1992; Massagué et al., 1994).

El receptor tipo II es una quinasa constitutiva que por unión del TGF- β , se asocia con el de tipo I, el cual es fosforilado y activado (Figura 3.1). En la actualidad se desconoce si existe otro sustrato fisiológico del receptor tipo II distinto del receptor I. Se han creado mutantes constitutivamente activados del receptor del tipo I que, al expresarse en células, imitan los efectos de TGF- β , inhibiendo el crecimiento e induciendo la transcripción de genes blanco (Saitoh et al., 1996).

Otros miembros de la superfamilia del TGF- β , como las BMPs y la activina transducen su señal a través de cascadas de quinasas con receptores de tipo I y II homólogos a los del TGF- β (Attisano et al., 1996; Carcamo et al., 1994).

3.1.6. Smads

Estudios recientes han identificado a una familia de proteínas denominadas Smad como las mediadoras de la señal del TGF- β , del citoplasma al núcleo (Heldin et al., 1997; Massague, 1996). Se han clonado siete genes de Smad (Derynck et al., 1996). De ellos, Smad-2 y -3 median la acción del TGF- β y la activina (Derynck et al., 1998; Nakao et al., 1997), mientras que Smad-1 y -5 están involucrados en la señalización de BMP. Por otra parte, la Smad-4 sería un componente general en la traslocación de las Smad hacia el núcleo, donde potencialmente pueden regular la transcripción de genes blanco (Derynck et al., 1998; Hu et al., 1998).

Los homólogos de Smad fueron originalmente identificados por abordajes genéticos en *Drosophila* (llamados MAD) y *C.elegans* (denominados SMA) como

participes en la transducción de señales de factores de la familia del TGF- β (Derynck et al., 1996). Por lo tanto, la conservación evolutiva de estos mecanismos de acción se observa en la estructura de los ligandos, en la estructura y actividad de los receptores y en la estructura y función de las proteínas involucradas en la señalización intracelular.

En la Figura 3.1 se muestra el modelo altamente simplificado propuesto para la activación de las Smad por TGF- β (Derynck et al., 1998; Hu et al., 1998), el receptor de tipo I fosforila a las Smad-2 o -3. Al fosforilarse, un homotrímero de estas Smad forma un complejo hexaheteromérico con las Smad-4, evento que permite la entrada del complejo al núcleo donde puede modular la transcripción de genes blanco.

Por otra parte se han identificado otras proteínas Smad (-6 y -7) que actúan como reguladores negativos de la transducción de la señal y podrían cumplir un papel en la terminación de los efectos intracelulares desencadenados por la unión del péptido a su receptor.

A nivel nuclear, las Smad son capaces de regular la transcripción de genes de respuesta a TGF- β (Lagna et al., 1996; Zhang et al., 1996) por múltiples mecanismos: participando directamente como factores de transcripción uniéndose a secuencias específicas (Yingling et al., 1997), o participando como co-activadores, por interacción con otro factores de transcripción (Yingling et al., 1997; Chen et al., 1997; Chen et al., 1996).

3.1.7. El TGF- β en el ovario

Se ha demostrado la expresión de diferentes isoformas de TGF- β en el ovario por diversos métodos (Mulheron et al., 1992; Mulheron et al., 1991). Sin embargo no se han estudiado los mecanismos responsables de esta activación del precursor latente en el ovario ni la manera en que este proceso se regula hormonalmente.

El TGF- β es capaz de modular la función de las células de la granulosa *in vitro*, promoviendo un aumento de la producción de progesterona y de la actividad de la

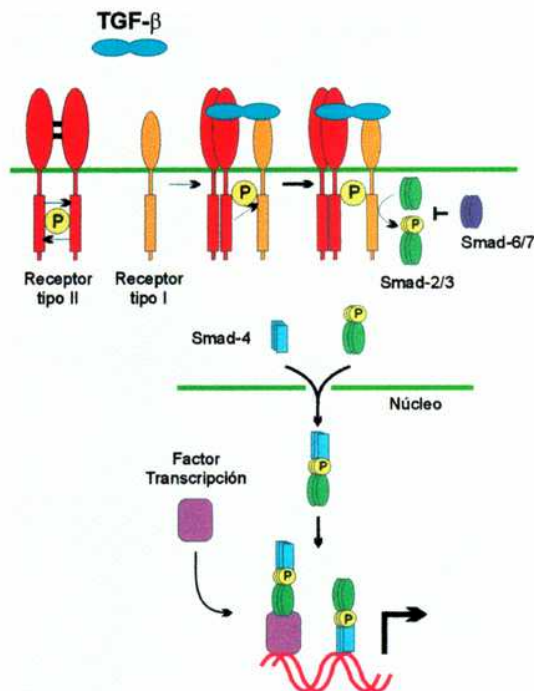


Figura 3.1
Modelo propuesto para la transducción de señal del TGF- β .

La unión del TGF- β al su receptor tipo II promueve la formación de un complejo con el receptor tipo I. La activación por fosforilación de las proteínas Smad-2 y -3 induce la asociación con Smad-4 que trasloca al núcleo, donde regula la transcripción de genes blanco.

aromatasa (Ying et al., 1986; Adashi, Resnick, 1986).

Las acciones del TGF- β sobre el crecimiento de células de la granulosa son motivo de controversia. Aunque se acepta generalmente que el TGF- β inhibe la proliferación de células epiteliales y endoteliales, se han encontrado acciones estimuladoras en ciertos tipos celulares derivados de mesenquima (Sporn et al., 1986; Roberts et al., 1985). Los efectos sobre las células de granulosa parecen variar dependiendo de las especies y de las condiciones experimentales. El TGF- β inhibe la síntesis de ADN en células de granulosa porcinas y bovinas (May et al., 1988; Skinner et al., 1987), mientras que sinergiza con FSH para promover la proliferación de células de granulosa de rata (Dorrington et al., 1988). Según estos autores, las acciones estimuladoras de estradiol estarían

mediadas por la producción local de TGF- β (Schumacher et al., 1991).

Una de las acciones caracterizadas para el TGF- β es la regulación de la secreción de proteínas de matriz celular (Massagué, 1990), incluyendo la fibronectina (FN). Aunque la fibronectina es conocida como una de las proteínas más abundantes secretadas por las células de la granulosa (Carnegie, 1990; Skinner, Dorrington, 1984), su papel en el desarrollo folicular no se ha establecido claramente. La inhibición del crecimiento por TGF- β se ha asociado a la inhibición de los complejos cdk4-ciclina D en la progresión de la fase del ciclo celular G1 para su entrada en S (Saltis, 1996). Para justificar la acción estimuladora de TGF- β sobre la proliferación en algunos tipos celulares, se ha propuesto que el efecto de

TGF- β está mediado por un "loop" autocrino del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Battegay et al., 1990), quien sería el responsable de antagonizar el efecto inhibitorio ampliamente aceptado.

3.2. Objetivo

El objetivo de este trabajo fue determinar si el TGF- β es un regulador autocrino de la función folicular. En particular, se estudió su producción por células de granulosa, la regulación hormonal de la secreción y la activación, y los efectos sobre el crecimiento de dichas células.

3.3. Resultados

3.3.1. Producción y activación de TGF- β por las células de la granulosa

3.3.1.1. Actividad similar a TGF- β en el ovario

El fluido folicular de la cavidad antral de un folículo ovárico en desarrollo contiene hormonas esteroideas y proteínas, derivadas del plasma o secretadas por las células de la granulosa. Dada la acumulación de un conjunto de sustancias activas de origen local, el fluido folicular ha constituido un medio de identificación de diversos factores potencialmente comprometidos en la regulación de la función ovárica.

Con el objeto de analizar la presencia de una actividad similar a la del TGF- β en el ovario, se ensayó el efecto de extractos de fluido folicular humano (FF) sobre cultivos de células NRK 49F (clon 49F de la línea de fibroblastos normales de riñón de rata). Este ensayo se basa en la capacidad de esta línea celular de formar colonias que crecen en agar blando, es decir independientes de anclaje, inducida por TGF- β , en presente de EGF (factor de crecimiento epidérmico) en el cultivo.

Cuando se analizó la acción de fluido folicular (FF) o de un extracto ácido-etanólico de factores presentes en el FF, se encontró un incremento en el número de colonias formadas (Figura 3.1), lo que sugeriría la presencia de actividad tipo TGF- β en el FF.

Asimismo, se detectó la presencia de actividad similar a TGF- β en medio condicionado (MC) por células de la granulosa, ya que también indujo una estimulación en la formación de colonias de células NRK (Figura 3.2). La comparación con la acción de TGF- β 1 puro, indicó una concentración aproximada de 5 ng/ml en el MC.

Estos ensayos demuestran que el fluido folicular contiene compuestos tipo TGF- β y que las células de la granulosa en cultivo

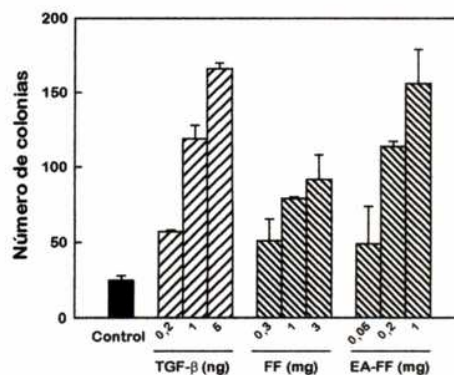


Figura 3.1

Actividad transformante en el fluido folicular

Crecimiento en agar blando de células NRK (normal rat kidney fibroblast) en presencia de EGF (5 ng) conjuntamente con TGF- β , fluido folicular humano (FF) o un extracto ácido de FF (EA-FF). Se determinó el número de colonias formadas a los 7 días en placas duplicado.

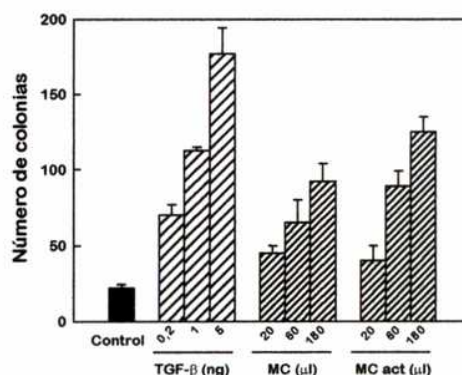


Figura 3.2

Actividad transformante secretada por células de la granulosa

Se crecimiento células NRK en agar blando en presencia de TGF- β , MC o MC tratado en medio ácido. Los ensayos se realizaron con EGF (5 ng). Se determinó el número de colonias formadas a los 7 días por duplicado.

son capaces de producir este tipo de factores. Por lo tanto, las células de granulosa podrían ser el origen de producción de este tipo de factores encontrados en el FF.

Por otra parte, se determinó que la actividad presente en el FF y en los extractos acéticos de este fluido, fue capaz de inducir la formación de colonias en agar blando de la línea de células de la granulosa BGC-1 (Figura 3.3). Estos resultados indican que estas células son capaces de crecer en condiciones que serían más representativas de las condiciones en que se encuentran dentro del folículo.

3.3.1.2. Producción de TGF- β por células de granulosa

Con el objeto de realizar una cuantificación de la producción de TGF- β por células de la granulosa, y estudiar la regulación hormonal de la secreción de este factor, se utilizó el ensayo biológico de células Mv1Lu. Estas células, epiteliales de pulmón de visón, también denominadas CCL-64 (código ATCC), responden de manera relativamente específica a TGF- β (Danielpour et al., 1989). La acción de este factor sobre estas células bloquea el crecimiento estimulado por bajas concentraciones de suero, inhibiendo la entrada en fase S del ciclo celular. Asimismo, este ensayo biológico permite la detección, de manera discriminada, del TGF- β que se encuentra activo y del TGF- β latente.

Dado que el TGF- β se secreta como complejo latente inactivo, una porción de los MCs fue tratado con medio ácido o con calor

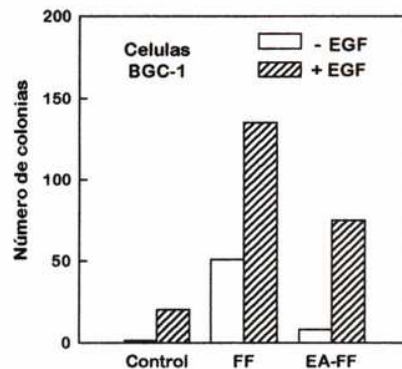


Figura 3.3

Crecimiento en agar blando de la línea de granulosa bovina BGC-1

Crecimiento en agar blando de células BGC-1 en presencia o ausencia de EGF (5 ng) con FF (2.5%) o un extracto ácido-etanólico de FF (EA-FF, 2.5%). Se determinó el número de colonias formadas al cabo de 14 días.

para promover su activación. El agregado de cantidades crecientes de TGF- β a cultivos de células CCL-64, arrestó su crecimiento de manera dosis dependiente (ED_{50} : 0.26 ± 0.04 ng/ml). En presencia de MCs por células de granulosa se obtuvieron similares curvas de inhibición (Figura 3.4, paneles A y B). El análisis de las curvas dosis-respuesta no reveló alejamiento del paralelismo entre TGF- β y los MCs ($p > 0.05$ para los parámetros de máxima y mínima respuesta y de pendiente, Allfit). Las concentraciones de TGF- β activo y total (latente + activo), se determinaron por comparación de los ED_{50} de las distintas curvas, según se muestra en la Figura 3.4, panel C).

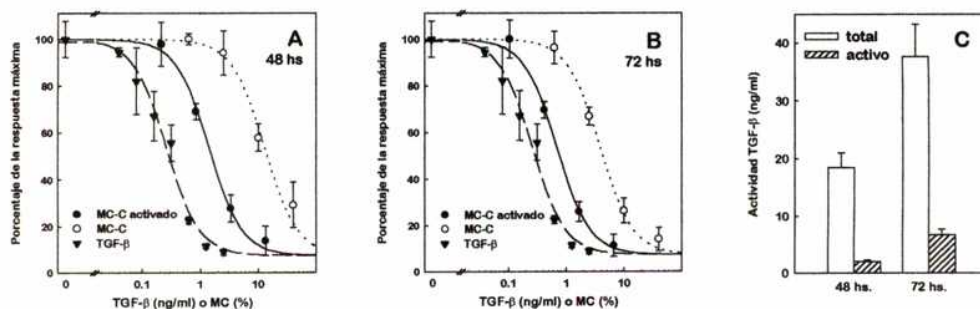


Figura 3.4. Actividad tipo TGF- β producida por células de la granulosa

Se cultivaron células CCL-64 en presencia de concentraciones crecientes de TGF- β 1 o de medio condicionado (MC-C) por células de granulosa de rata, con el objeto de cuantificar la actividad presente. Se analizaron MCs de 48 hs (panel A) o de 72 hs. (panel B), ensayándose directamente (MC-C, para detectar el TGF- β activo) o luego de tratamiento ácido (MC-C activado, para detectar el TGF- β total: activo + latente). La evaluación de la síntesis de ADN en las células CCL-64 se llevó a cabo durante 4 hs comenzando 22 hs luego de la estimulación. Los valores son medias $\pm$ ES de triplicados de cultivos. El análisis de las curvas dosis-respuesta (Allfit) y la comparación de los ED_{50} para las distintas curvas indicó

En condiciones basales, las células de la granulosa en cultivo producen elevadas cantidades de TGF- β , el cual se acumula en concentración suficiente para ejercer acciones biológicas. La Figura 3.4, panel C, muestra las concentraciones de TGF- β producidas por células de granulosa luego de 48 y 72 hs de cultivo. La mayor parte del TGF- β se encuentra en su forma latente, (proporción TGF- β activo/total: $11 \pm 3\%$ a las 48 hs y $17.7 \pm 5.3\%$ a las 72 hs). Estos resultados indican que las células de granulosa, además de secretar TGF- β , producen también los compuestos que permiten el procesamiento del TGF- β en el medio extracelular y que las concentraciones alcanzadas son suficientes para producir efectos.

La forma de las curvas de inhibición y la relativa especificidad del bioensayo de las células CCL-64 indican que la actividad detectada en los MCs corresponderían a TGF- β . Además, la identidad de este factor

se controló utilizando un anticuerpo anti-TGF- β , que neutralizó la actividad inhibitoria de los MCs, lo que no ocurrió en presencia de un anticuerpo normal de ratón (Figura 3.5).

3.3.1.3. Regulación hormonal de la producción de TGF- β

Utilizando el ensayo de las células CCL-64 para TGF- β , se estudió la regulación hormonal de la producción de TGF- β por las células de la granulosa. Con este objetivo, se colectaron medios condicionados por células tratadas con hormonas.

El tratamiento con FSH (20 ng/ml) disminuyó significativamente la producción de TGF- β , comparado con cultivos control, tanto a las 48 como a las 72 hs (Figura 3.6). Esta inhibición fue evidente para el TGF- β total y para el TGF- β activo, sin que se altere la proporción activo/total de manera significativa, como se muestra en la Tabla 3.1.

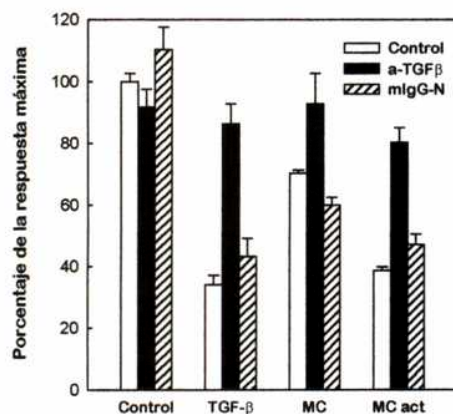


Figura 3.5

Neutralización de la acción del MC por un anticuerpo anti-TGF- β

Las células CCL-64 se cultivaron en condiciones control, con TGF- β (0.5 ng/ml), MC por células de granulosa (MC, 5%) o MC activado por tratamiento ácido (MC act, 1%) en conjunto con un anticuerpo anti-TGF- β o IgG normal de ratón (mIgG-N, 30 μ g/ml). Todos los estímulos se preincubaron durante 2 hs. Los valores son medias $\pm$ ES de cultivos por triplicado. El tratamiento con anti-TGF β revirtió significativamente los efectos ($p < 0.01$), mientras que no ocurrió lo mismo con IgG normal ($p > 0.05$).

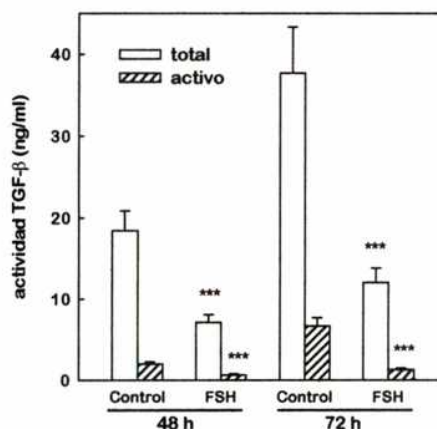


Figura 3.6

Regulación de la producción de TGF- β por FSH

Se cultivaron células CCL-64 en presencia de concentraciones crecientes de TGF- β 1 o de medio condicionado por células de granulosa de rata que habían sido cultivadas en medio Control o con FSH (20 ng/ml). Se analizaron medios condicionados de 48 y 72 hs., ensayándolos directamente (para detectar el TGF- β activo) o luego de tratamiento ácido (para detectar el TGF- β total: activo + latente). El análisis de las curvas dosis-respuesta (Allfit) y la comparación de los ED₅₀ para las distintas curvas determinó las concentraciones de TGF- β presentes en los MCs. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.001$, Allfit y test F) respecto de los correspondientes controles (en ausencia de FSH).

Tratamiento		Proporción TGF- β activo/ total (%)
48 hs.	Control	11.0 $\pm$ 3.1
	FSH	9.5 $\pm$ 2.6
72 hs.	Control	17.7 $\pm$ 5.3
	FSH	10.7 $\pm$ 3.2

Tabla 3.1. *Efecto de FSH sobre la producción de TGF- β por células de la granulosa de rata.*

Las células se cultivaron en ausencia o presencia de FSH (20 ng/ml) durante 48 o 72 hs. Se determinó la actividad de TGF- β total y activo por bioensayo (Figura 3.6) y la proporción de TGF- β activo/total.

Asimismo, se estudió la acción de estradiol sobre la producción de TGF- β . Como se muestra en la Tabla 3.2, cuando las células de granulosa fueron tratadas con estradiol (100 ng/ml) no se alteró la acumulación total de TGF- β pero se incrementó la proporción de TGF- β activo. Por otra parte, el agregado simultáneo de estradiol y FSH potenció el efecto inhibitorio de FSH, arrojando una significativa disminución en la producción de TGF- β . En trabajos previos, se había sugerido que la actividad estimuladora de estradiol, en conjunto con gonadotrofinas, sobre el crecimiento de células de granulosa podría estar mediada por la acción autocrina de TGF- β (Bendell, Dorrington, 1991). Sin embargo, los resultados de la Tabla 3.2 indican que el TGF- β no es mediador del efecto de estradiol y FSH, ya que, la secreción de TGF- β se encuentra disminuida por este tratamiento.

Tratamiento	Actividad TGF- β (ng/ml)		Proporción TGF- β activo/ total
	TGF- β activo	TGF- β total	
Control	14.4 $\pm$ 1.3 ^a	44.2 $\pm$ 3.7 ^a	32.6 $\pm$ 5.6
FSH	10.1 $\pm$ 0.9 ^b	29.3 $\pm$ 2.7 ^b	34.4 $\pm$ 6.2
Estradiol	23.5 $\pm$ 2.1 ^c	39.8 $\pm$ 3.3 ^c	59.1 $\pm$ 10.0
FSH + Estradiol	3.3 $\pm$ 0.3 ^d	14.0 $\pm$ 1.3 ^d	23.8 $\pm$ 4.4

Tabla 3.2. *Efecto de estradiol y FSH sobre el TGF- β la producido por células de la granulosa de rata.*

Las células se cultivaron con FSH (20 ng/ml), estradiol (100 ng/ml) o la combinación de ambos. El medio se colectó a las 72 hs., se determinó la actividad de TGF- β total y activo por bioensayo y se calculó la relación de TGF- β activo/total en cada uno de los MCs. Las concentraciones de TGF- β se calcularon a partir de los ED₅₀, obtenidos de los ajustes de las curvas dosis respuesta de TGF- β estándar y de los MCs. Dentro de cada columna, los valores con distinto superíndice son significativamente diferentes ($p < 0.05$, Allfit y test F).

3.3.2. Efecto del TGF- β sobre la síntesis de ADN en células de la granulosa

Una de las condiciones para postular al TGF- β como un factor de acción autocrina es que presente efectos sobre el crecimiento o diferenciación celular. Los siguientes experimentos muestran acciones del TGF- β sobre la proliferación de células de la granulosa de rata y posteriormente se analizaran estos efectos de manera comparativa con aquellos promovidos por el medio condicionado por las mismas células.

Cuando las células de la granulosa se cultivaron en presencia de concentraciones crecientes de TGF- β , se encontró una estimulación de la incorporación de timidina (Figura 3.7). La presencia de FSH (20 ng/ml) amplificó la acción estimuladora del TGF- β . Las dosis efectivas medias en ausencia o presencia de FSH fueron similares (ED_{50} : 0.95 ± 0.25 ng/ml). Resultados previos del laboratorio, mostraron el aumento de la síntesis de ADN por estos tratamientos mediante el análisis de núcleos marcados y por el contenido de ADN en los cultivos (datos no mostrados, tesis doctoral P. Saragüeta).

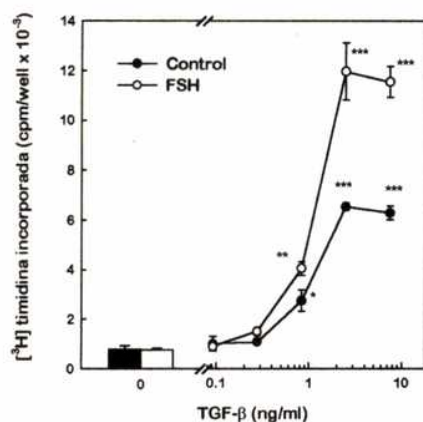


Figura 3.7

Efecto de TGF- β sobre la síntesis de ADN en células de la granulosa de rata

Las células de granulosa se cultivaron en ausencia o con concentraciones crecientes de TGF- β , en medio control o con FSH (20 ng/ml). Los resultados son medias $\pm$ ES de determinaciones en triplicado. El análisis de las curvas indicó ED_{50} : 0.95 ± 0.25 mg/ml. Los asteriscos indican diferencias significativas (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 comparado con los respectivos controles, en ausencia de TGF- β).

FSH no modifica la síntesis de ADN en condiciones basales. Sin embargo, en presencia de TGF- β , FSH ejerció una estimulación bifásica en la tasa de incorporación, con efecto máximo observado en concentraciones entre 20 y 60 ng/ml (Figura 3.8).

En trabajos previos del laboratorio, se demostró que en el sistema de cultivo utilizado en estos estudios, al estradiol no es estimulador per se, pero interactúa con un factor derivado de células tecales/intersticiales (Bley et al., 1991) o con FSH para promover la síntesis de ADN (Bley et al., 1997). A partir de estudios previos de Bendell y Dorrington (1991) sugiriendo que las acciones de estradiol eran mediadas por TGF- β , se intentó determinar si el agregado exógeno de TGF- β era capaz de imitar los efectos de estrógenos. Los datos de la tabla 3.3 indican la existencia de potenciación de efectos de TGF- β tanto con FSH como con estradiol. Además el sinergismo entre FSH y estradiol fue amplificado en presencia de TGF- β .

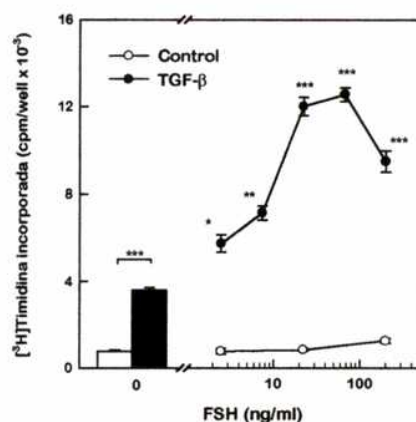


Figura 3.8

Amplificación por FSH de efecto de TGF- β sobre la síntesis de ADN

Las células de granulosa de rata se cultivaron con TGF- β 1 (3 ng/ml) con dosis crecientes de FSH. La incorporación de 3 H-timidina se realizó durante 24 hs., comenzando 24 hs. luego del plaqeo. Los resultados son medias $\pm$ ES de determinaciones por triplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 comparado con los respectivos controles, en ausencia de TGF- β).

Tabla 3.3. Efecto de estradiol sobre la estimulación por TGF- β .

Tratamiento	- TGF- β	+ TGF- β
Control	460 $\pm$ 30 ^a	1840 $\pm$ 120 ^b
Estradiol	890 $\pm$ 50 ^a	4020 $\pm$ 130 ^c
FSH	570 $\pm$ 60 ^a	5150 $\pm$ 180 ^d
FSH + estradiol	2720 $\pm$ 170 ^b	7880 $\pm$ 340 ^e

Las células de granulosa se cultivaron en presencia o ausencia de TGF- β 1 (5 ng/ml) con los siguientes agregados: estradiol (100 ng/ml), FSH (20 ng/ml) o una combinación de ambos. Los valores con superíndices distintos presentan diferencias significativas ($p < 0.05$).

3.3.3. Acciones comparativas del MC y del TGF- β sobre células de granulosa

Utilizando el bioensayo de células CCL-64, se demostró que las células de la granulosa producen TGF- β y que las concentraciones de este factor en los medios condicionados alcanza niveles a los cuales regularía el crecimiento de células de granulosa.

Se decidió analizar, si el medio condicionado por células de la granulosa era capaz de producir una estimulación autocrina del crecimiento, de manera comparable a la ejercida por el TGF- β .

Con este objetivo, cultivos de células de la granulosa de rata, se trataron con cantidades crecientes de medio condicionado (MC) sin tratar o activado con calor. Las curvas dosis-respuesta se analizaron comparándolas con las obtenidas utilizando concentraciones crecientes de TGF- β 1 (Figura 3.9). La presencia de MC estimuló la síntesis de ADN (8 veces para 10% MC activado y 5 veces para 40% de MC). Sin embargo, los MCs promovieron el crecimiento de una manera diferente a la realizada por TGF- β puro, teniendo las curvas distintas pendientes. Por otra parte, el MC activado dió una curva bifásica, mientras que el MC sin tratar alcanzaría, aparentemente, su efecto más alto en la máxima cantidad ensayada. En esta situación, sólo se alcanza aproximadamente un 50% del efecto observado para concentraciones saturantes de TGF- β .

Estos resultados indican que el TGF- β no fue la única sustancia activa presente en el MC. La presencia en el MC de compuestos inhibitorios de la acción de TGF- β explicaría este comportamiento. Estos factores presentan acción biológica sobre células de granulosa pero no interfieren en las acciones de TGF- β sobre las células CCL-64.

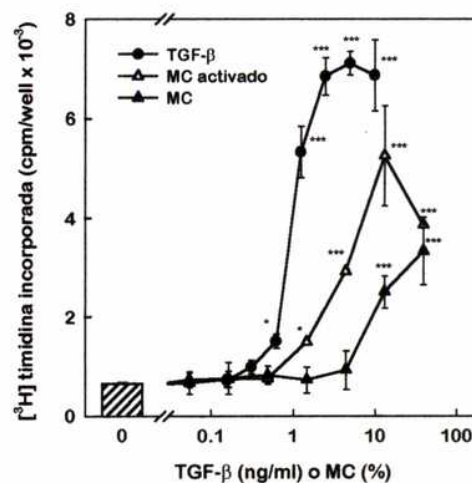


Figura 3.9. Efecto del medio condicionado sobre la síntesis de ADN en células de granulosa. Las células se cultivaron en presencia de FSH (20 ng/ml) y con cantidades crecientes de MC activado, MC sin activar o TGF- β 1. La incorporación de ³H-timidina se realizó entre las 24 y 48 hs. de cultivo. Los resultados son medias $\pm$ ES de determinaciones en triplicado.

Tabla 3.4
Actividad aparente de TGF- β en células de la granulosa

	Concentración de MC en el ensayo	Concentración aparente de TGF- β según ensayo en granulosa (ng/ml)	Concentración de TGF- β según ensayo en CCL-64 (ng/ml)
MC activado	40 %	2.47 $\pm$ 0.03	360 $\pm$ 50
	13.3 %	9.9 $\pm$ 4.0	
	4.4 %	19.2 $\pm$ 0.3	
	1.5 %	41.6 $\pm$ 0.5	
MC	40 %	2.3 $\pm$ 0.5	21 $\pm$ 2.4
	13.3 %	5.9 $\pm$ 0.7	
	4.4 %	8.3 $\pm$ 1.5	

Se determinaron las concentraciones aparentes de TGF- β en MCs según su actividad en células de la granulosa y se las compara con aquella determinada según el bioensayo de las células CCL-64 (Allfit)

Utilizando como referencia la respuesta de las células de la granulosa a TGF- β puro, se cuantificó la actividad aparente de TGF- β para cada una de las concentraciones de MC ensayadas. En la Tabla 3.4 se muestra la comparación de estos valores con aquellos obtenidos para los mismos MCs en el ensayo de las células CCL-64, encontrándose una disminución en la actividad aparente de TGF- β .

Por lo tanto la presencia de otros compuestos activos sobre células de granulosa, antagonizan la acción de TGF- β disminuyendo la respuesta máxima y atenuando la sensibilidad de las células de la granulosa a su acción.

Los datos de la Figura 3.9 se regraficaron teniendo en cuenta la cuantificación de TGF- β en los MCs que había sido realizada utilizando el bioensayo de las células CCL-64. En la Figura 3.10 se muestran los efectos sobre la síntesis de ADN en células de la granulosa en función de la concentración de TGF- β según el análisis en CCL-64. Las curvas de los MCs se encuentran desplazadas hacia mayores concentraciones que la curva de referencia de TGF- β , indicando una disminución en la sensibilidad de las células de la granulosa a TGF- β . Por otra parte, no hay coincidencia entre las curvas para el MC sin tratar y el MC activado. Este resultado indica que el

TGF- β latente del MC se activó durante su ensayo en el cultivo de células de la granulosa, señalando, una vez más, que las células de la granulosa son capaces de transformar el precursor latente en la forma con actividad biológica.

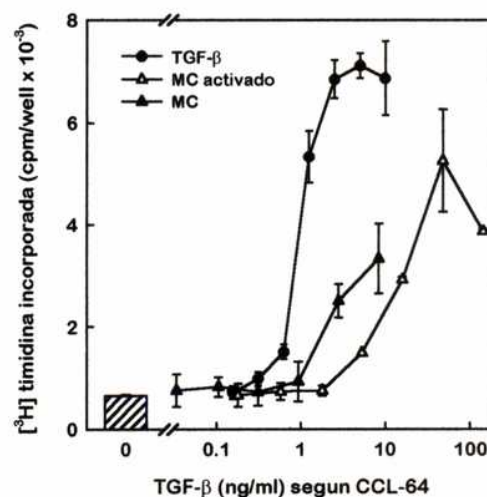


Figura 3.10
Efecto del medio condicionado sobre la síntesis de ADN en células de granulosa. La incorporación de ^3H -timidina en cultivos de células de la granulosa (Figura 3.9) se representa en función de la concentración de TGF- β en los MCs activado o sin activar determinada utilizando el bioensayo de las células CCL-64. La curva correspondiente al TGF- β se incluye como referencia.

Con el objeto de confirmar que la actividad presente en el MC, estimuladora sobre la síntesis de ADN, era debida a TGF- β , se realizaron experimentos de neutralización. La incubación con el anticuerpo anti-TGF- β disminuyó significativamente los efectos estimulatorios del MC sobre las células de la granulosa (Tabla 3.5). La actividad remanente (en presencia del anticuerpo), si bien fue cuantitativamente menor, podría deberse a la presencia de algún otro factor estimulatorio no identificado.

Se analizó la acción de los MCs sobre células tratadas hormonalmente. En la figura 3.11 se muestran los efectos de los MCs (activado o sin activar) sobre cultivos de granulosa tratados con FSH, estradiol o la combinación de ambas hormonas. Los efectos promovidos por los MCs fueron de similar tendencia a los obtenidos por TGF- β , aunque de menor magnitud.

Por último, se analizó la presencia de actividad tipo TGF- β en los medios condicionados obtenidos de células de la granulosa tratadas con FSH, estradiol o la combinación de ambos (Figura 3.12). Se encontró una correlación cualitativa entre las características estimulatorias de los MCs sobre las células de granulosa y las actividades cuantificadas en las células CCL-64 (Tabla 3.2). El tratamiento con FSH disminuyó la producción de TGF- β y la combinación de FSH y estradiol incrementó esta inhibición.

Tabla 3.5
Neutralización de la acción del MC por un anticuerpo anti-TGF- β

Tratamiento	Incorporación de timidina (cpm/well)	
	Control	anti-TGF β
Control	665 $\pm$ 60	629 $\pm$ 80
MC	1790 $\pm$ 110	1120 $\pm$ 110**
MC activado	2640 $\pm$ 130	1030 $\pm$ 20***

Células de la granulosa de rata se cultivaron en condiciones control, con MC (10%) o MC activado (10%) en ausencia o presencia de un anticuerpo anti-TGF- β . Los valores son medias $\pm$ ES. El tratamiento con anticuerpo revirtió significativamente los efectos de los MCs (**p<0.01, ***p<0.001).

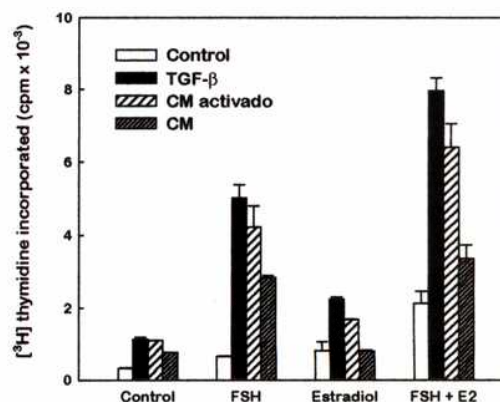


Figura 3.11

Efecto del medio condicionado de cultivos control sobre la proliferación de células de granulosa.

Las células se cultivaron en presencia de FSH (20 ng/ml), estradiol (100 ng/ml) o la combinación de ambas hormonas, con el agregado de 10% v/v de medio condicionado (activado o sin activar) o TGF- β (3 ng/ml). La incorporación de 3 H-timidina se realizó entre las 24 y 48 hs. de cultivo. Los resultados son medias $\pm$ ES de determinaciones en triplicado.

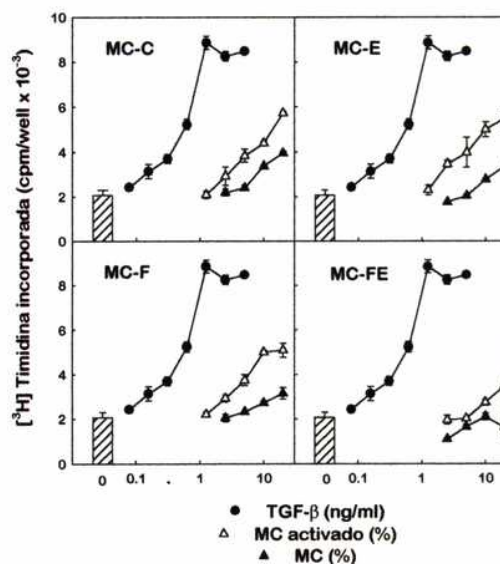


Figura 3.12.

Regulación de la producción de factores tipo TGF- β por FSH y estradiol

Las células de la granulosa se cultivaron en presencia de concentraciones variables de MCs que provenían de cultivos control (MC-C), tratados con FSH (20 ng/ml, MC-F), con estradiol (100 ng/ml, MC-E) o la combinación de las dos hormonas (MC-FE). Los ensayos se realizaron en medio conteniendo FSH y estradiol. La incorporación de 3 H-timidina se realizó durante 24 hs., comenzando 24 hs. luego de la estimulación. Los resultados son medias $\pm$ ES de triplicados de cultivo.

La producción de factores autocrinos que modulan o median la acción de otros mitógenos se ha demostrado en otros tipos celulares. La figura 3.13 muestra que el efecto de FSH y TGF- β sobre la síntesis de ADN, representado como veces de estimulación del control respectivo, es dependiente de la densidad celular en el cultivo. Estos resultados sugieren que el crecimiento se encuentra favorecida por el contacto célula-célula o la participación otros moduladores autocrinos de identidad desconocida. Sin embargo, en forma paralela al crecimiento, las células de la granulosa secretan al medio extracelular factores que son capaces de modular la acción de TGF- β , como demuestran los resultados previos.

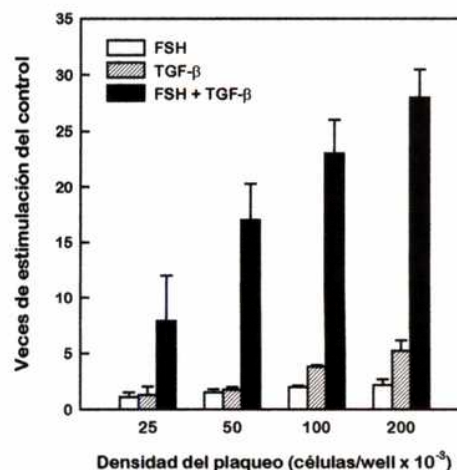


Figura 3.13. Efecto de la densidad celular sobre la síntesis de ADN

Las células de la granulosa de rata fueron cultivadas a diferentes densidades en condiciones control, con FSH (20 ng/ml), con TGF β (5 ng) o con FSH y TGF β (20 y 5 ng/ml). Los resultados se expresan como veces de estimulación de cada tratamiento con respecto al control respectivo.

Discusión

Los resultados presentados indican que el TGF- β es un modulador autocrino en el folículo ovárico. Se demostró la producción local del factor por células de la granulosa, la secreción regulada por hormonas, la acción autocrina regulando la función de las células de la granulosa y la modulación a nivel local de su formación a partir de una forma inactiva precursora.

Las células de granulosa secretan cantidades suficientes de TGF- β para producir estimulación autocrina de la síntesis de ADN, siempre que este factor sea convertido a su forma activa. Por lo tanto la activación del TGF- β latente parece ser el paso regulatorio clave en la participación de este factor de crecimiento como regulador local.

Para que la célula se divida, la síntesis de ADN debe ocurrir en la fase S del ciclo. La entrada en la fase S ocurre una vez que las células han recibido señales de factores de crecimiento que permitan la progresión a través de G1 y el pasaje a través del "punto de restricción" de la transición G1-S. En los casos en que las células se encuentran en el estado G₀, son necesarias señales generadas por factores de crecimiento que permitan la nueva entrada al ciclo celular (Sherr, 1994)

En la gran mayoría de los sistemas estudiados el TGF- β detiene el crecimiento inhibiendo los mecanismos celulares responsables de la progresión de la fase G1 del ciclo celular para su entrada en S (Saltis, 1996).

Para justificar la acción estimuladora de TGF- β sobre la proliferación en algunos tipos celulares, se ha propuesto que es el resultado de efectos indirectos mediados por cambios en los componentes de la matriz extracelular (Massagué, 1990). Resultados obtenidos en el laboratorio sugieren que TGF- β puede amplificar la regulación hormonal del crecimiento de células de la granulosa, parcialmente por un mecanismo que involucra la formación de matriz extracelular. Hemos demostrado que el

TGF- β estimula la producción de fibronectina y además es capaz de regular el "splicing" alternativo de la fibronectina, aumentando la inclusión del exón ED-I en cultivos primarios de células de granulosa bovinas y en la línea celular BGC-1 (Colman-Lerner et al., 1999).

Otro mecanismo descrito que ha explicado la acción estimuladora del crecimiento por TGF- β es la participación del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) como mediador autocrino (Battegay et al., 1990). Sin embargo, el PDGF no reproduce los efectos de TGF- β sobre células de granulosa de rata o bovinas, y atenúa el sinergismo entre FSH y TGF- β (resultados no mostrados). Por lo tanto, el PDGF no participa como intermediario de la acción de TGF- β en las células foliculares. A pesar de estos resultados, la posibilidad de mediaciones autocrinas por otros factores no debería excluirse. La producción de compuestos autocrinos que modulan o median la acción de otros mitógenos se ha demostrado en otros tipos celulares. La necesidad de altas densidades de cultivo, para evidenciar el sinergismo entre FSH y TGF- β sobre la síntesis de ADN en células de granulosa, podría indicar la participación de moduladores aún no identificados.

Hay una serie de ejemplos de acciones estimuladoras de TGF- β sobre la proliferación de células de origen mesenquimático. Por el contrario, el TGF- β es un potente inhibidor del crecimiento de muchas células epiteliales aunque también puede inhibir células mesenquimáticas (como fibroblastos embrionarios, células endoteliales y linfocitos B y T) (Sporn et al., 1987). La estimulación del crecimiento de células de granulosa es un hecho particular ya que estas células poseen características de células epiteliales.

La mayoría de los trabajos relacionados con los efectos de TGF- β en el ovario se han centrado en su capacidad de interactuar con FSH para modular la diferenciación. El TGF- β potencia la estimulación por FSH de la actividad de aromatasa en células de

granulosa de rata (Ying et al., 1986; Adashi, Resnick, 1986; Hutchinson et al., 1987) y resultados Capítulo II de esta tesis), aumenta la inducción de receptores para LH, así como la producción de progesterona (Knecht et al., 1987; Dodson, Schomberg, 1987).

El TGF- β promueve el crecimiento de las células de la granulosa y también estimula cambios clásicamente asociados a la diferenciación celular. Epstein-Almog y Orly (1985) demostraron la existencia de una correlación negativa entre crecimiento y diferenciación de células de granulosa de rata. Esta situación también podría ser la de los cultivos estudiados, ya que la incorporación de timidina es un evento más temprano, que ocurre entre las 24 y 48 hs, decreciendo luego de las 48 hs. La actividad de aromatasas es baja hasta las 48 hs, y los cambios mayores ocurren entre las 48 y 72 hs., persistiendo al menos hasta las 96 hs. La estimulación del crecimiento más temprana que la diferenciación es consistente con la serie de eventos que ocurren in vivo en la rata. El ciclo estral en la rata es de 5 días de duración y la fase folicular corta permitiría solamente una fase de proliferación limitada antes de la diferenciación.

El TGF- β estimuló la síntesis de ADN en células de granulosa e interactuó con FSH, de manera concordante con observaciones previas (Dorrington et al., 1988). En presencia de TGF- β , las curvas dosis respuesta tanto para FSH como para derivados del AMPc (no mostrada), fueron bifásicas de manera similar a lo observado en la interacción entre FSH y esteroides sexuales o factores de crecimiento intraováricos (Bley et al., 1997; Bley et al., 1992) y resultados Capítulo II y IV de esta tesis).

En trabajos previos (Bendell, Dorrington, 1991) se había propuesto que las acciones estimuladoras del estradiol sobre la síntesis de ADN en células de granulosa de rata eran mediadas por la producción de TGF- β . Sin embargo, los datos obtenidos indican que el estradiol no es estimulador per se, pero puede amplificar el efecto de dosis efectivas

máximas de TGF- β . Por otra parte aunque estradiol incrementó la producción de TGF- β , la magnitud de este efecto fue pequeña comparada con la amplificación de su acción. Las razones de estas discrepancias con otros autores pueden ser los tiempos relativamente largos utilizados previamente (suficientes para la acumulación y activación del TGF- β producido) o la utilización de preparaciones de granulosa con células tecales/intersticiales, condiciones en las cuales los efectos de estradiol son observables (Bley et al., 1991).

El TGF- β se secreta como un complejo latente inactivo y puede ser activado por enzimas proteolíticas como plasmina y uroquinasa (Lyons et al., 1990; Taipale et al., 1992). El activador de plasminógeno tipo uroquinasa y su receptor son producidos por las células de granulosa y se encuentran regulados hormonalmente (Wnag, Leung, 1983; Karakji, Tsang, 1995; Li et al., 1997). Asimismo, la trombospondina, una glicoproteína con múltiples funciones, es capaz de activar formas latentes del TGF- β (Schultz-Cherry et al., 1994). El péptido KRFK, presente en las repeticiones centrales de la trombospondina-1 (TRB-1), induce un cambio conformacional en el TGF- β , que posibilita la interacción con su receptor (Schultz-Cherry et al., 1995). Se ha propuesto que la TRB-1 sería el principal activador del TGF- β in vivo, ya que el ratón deficiente en TRB-1 presenta anomalías en varios tejidos similares a las observadas en el ratón knock-out de TGF- β 1 (Crawford et al., 1998).

Por otra parte, un estudio reciente, ha demostrado que el TGF- β latente se une y es activado por la integrina α v β 6 (Munger et al., 1999) lo que constituye un mecanismo original de activación del factor que involucra el sitio de unión correspondiente al péptido RGD.

La participación de la TRB como de la integrina α v β 6 en la activación del TGF- β intraovárico debe ser estudiada. Las células de la granulosa inmaduras sintetizan y secretan TRB. Su producción es inhibida durante la diferenciación inducida por FSH (Dreyfus et al., 1992), patrón coincidente con los niveles de TGF- β según las

determinaciones presentadas. Por otra parte, la expresión de integrina α_v también se ha descrito en células de la granulosa; (Honda et al., 1997; Fujiwara et al., 1998).

Una vez activado, el TGF- β maduro puede ser inactivado por unión a α_2 macroglobulina (Feige et al., 1996; Danielpour, Sporn, 1990), la cual, a nivel ovárico, es producida por las células de granulosa y la secreción de esta proteína se encuentra regulada hormonalmente (Dajee et al., 1996; Gaddy-Kurten et al., 1989; Mann et al., 1991).

La producción de TGF- β por células de granulosa y su presencia en el fluido folicular se determinó utilizando los ensayos biológicos basados en el crecimiento en agar blando de las células NRK y en la inhibición de la proliferación de las células CCL-64. La aplicación de este último ensayo presenta una ventaja sobre los métodos de detección inmunológica, ya que permite cuantificar tanto el TGF- β total, como el TGF- β biológicamente activo.

Si bien, el TGF- β activo constituyó una fracción de entre el 6 y 20 % del TGF- β total secretado por las células de la granulosa, los niveles de la forma activa fueron suficientes para ejercer regulación autocrina del crecimiento. Estos resultados indican que las células de la granulosa son capaces de activar el TGF- β secretado, el cual constituiría el paso limitante de su acción local. La FSH produjo una inhibición en la producción de TGF- β , en coincidencia con trabajos previos que indicaban una disminución en los niveles del ARNm para TGF- β_2 promovidos por gonadotrofinas (Mulheron, Schomberg, 1990). Por otra parte, el tratamiento con estradiol provocó un aumento en la secreción de TGF- β activo. Sin embargo, la magnitud de estos cambios es pequeña comparada con la amplificación

por estas hormonas de la acción de TGF- β sobre las mismas células.

La acción autocrina tipo TGF- β en los medios condicionados también se evidenció sobre las propias células de la granulosa. Sin embargo, estos ensayos revelaron la presencia de otros compuestos activos capaces de modular el crecimiento de las células de la granulosa pero que no presentarían efecto en el bioensayo de las células CCL-64. La comparación de la actividad tipo TGF- β determinada por los dos ensayos indicó que las células de la granulosa producen compuestos, de identidad no determinada, que atenuaron la sensibilidad al TGF- β , así como su efecto máximo.

Los factores peptídicos intraováricos regulan la función de células de la granulosa a través de una compleja red de la cual participaría una diversidad de moduladores autocrinos y paracrinos. La integración de múltiples vías de transducción activadas, que a menudo generan señales opuestas, determinará el resultado neto de su acción. El crecimiento y desarrollo del folículo ovárico será, por lo tanto, el resultado de la acción combinada de gonadotrofinas, esteroides y efectores locales peptídicos.

Los datos presentados indican que, además de los efectos previamente demostrados sobre la diferenciación de las células, el TGF- β modula el crecimiento de células de la granulosa y es capaz de amplificar la regulación hormonal. Los resultados presentados indican que el TGF- β es un regulador autocrino. Además de su acción sobre el crecimiento de células de la granulosa, se demostró la existencia local de todo el sistema TGF- β , es decir las células de la granulosa sintetizan, secretan y son capaces de realizar el procesamiento del TGF- β a la forma biológicamente activa.

4. Módulo II

***Efecto de activina sobre la función
de las células de la granulosa.***

Análisis comparativo con TGF- β

4.1. Introducción

La activina es una proteína que pertenece a la superfamilia del TGF- β , la cual debe su nombre a que promueve la secreción hipofisaria de FSH, de manera opuesta a la acción ejercida por la inhibina (Woodruff, Mather, 1995; Vale et al., 1991).

4.1.1. Estructura

Al igual que el resto de los factores de esta superfamilia, la activina es sintetizada como un precursor grande que contiene una secuencia señal, un pro-dominio y el segmento C-terminal maduro de 115-116 aa. Dentro del segmento maduro, están las 7 cisteínas características de las proteínas de la superfamilia. La activina está compuesta por dos subunidades β , unidas por puentes disulfuro, a diferencia de la inhibina formada por una subunidad α y otra β . Sin embargo, la activina es un homodímero en el sentido amplio, ya que existen distintos genes para subunidades β (A, B, C, E) y cada uno puede dar origen a múltiples formas de clivaje que podrían tener actividades biológicas distintas.

Hasta la actualidad, se han descrito cuatro tipos de cadenas β en mamíferos: β A, β B, β C y β E (Fang et al., 1997; Vale et al., 1991). Estos cuatro genes se han identificado en el ratón, mientras que en el humano sólo A, B y C y en *Xenopus* se encontró una forma adicional, β D. La comparación de las secuencias del segmento maduro indica entre 50 y 64 % de identidad.

La dimerización entre los distintos tipos de subunidad β genera activina A, activina B o activina AB, como se muestra en la Figura 4.1. Si bien la subunidad β C podría, teóricamente, unirse a otro tipo de cadena β , se conoce poco sobre su contribución a la formación de activina dimérica.

La subunidad β A se expresa en muchos tipos celulares, entre ellos, fibroblastos, células endoteliales, osteoclastos, monocitos de médula ósea, osteoblastos, células de Leydig y Sertoli, células de la granulosa y posiblemente gonadotropos. La cadena β B se expresa en gonadotropos de la hipófisis

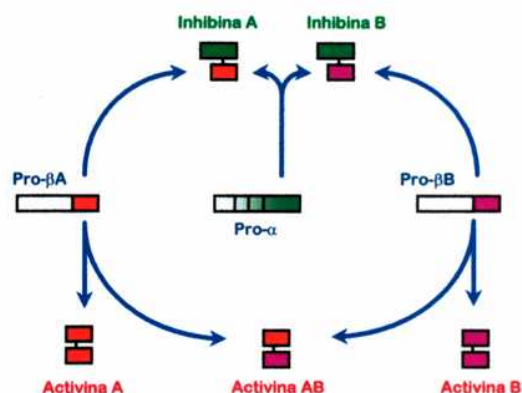


Figura 4.1. Esquema de la generación de inhibinas y activinas diméricas

anterior, células de Sertoli, células de Leydig e intersticiales de testículo y células de la granulosa (Mayo, 1994). Por otra parte, los estudios realizados indican que las cadenas β C y β E se restringen al hígado como único tejido de expresión (Fang et al., 1997).

4.1.2. Receptores

Los receptores de activina son proteínas transmembrana serina/treonina quinasas, con similar mecanismo de activación que el encontrado para otros miembros de la superfamilia del TGF- β (Hu et al., 1998). Es decir, existe un receptor tipo II (unión de ligando), un receptor de tipo I (de transducción de señal) y posiblemente un receptor tipo III (de presentación de ligando). Existen subtipos de los receptores de activina tipo I y II: denominados ACTRII y ACTRIIB y por otra parte ACTRI (o Alk-2) y ACTRIIB (o Alk-4). La unión de activina a sus receptores tipo II promueve la fosforilación del receptor tipo II, quien desencadena la activación por fosforilación de proteínas de señalización intracelular. Por lo tanto, los ActRI no unen activina directamente, sino que forman un complejo de señalización heteromérico con el receptor tipo I (Carcamo et al., 1994; Willis et al., 1996; Attisano et al., 1996). Algunos estudios sugieren la existencia de un receptor/aceptor tipo III de alto peso

molecular para activina, aunque a diferencia del receptor III de TGF- β , no se ha identificado su participación (Lopez-Casillas et al., 1993).

Los receptores de activina también son capaces de unir algunos otros factores de la familia del TGF- β . El ACTRII reconoce GDF-5, BMP-7 y BMP-2. Por otra parte, aunque el ACTRI no une directamente ligando, forma complejos heteroméricos con BMP-7/ActRII, y BMP-2/BMPRII (Hoodless et al., 1996; Yamashita et al., 1995). Por lo tanto, son posibles distintas combinaciones de ligando-receptor dentro del sistema receptor de activina.

4.1.3. Proteínas ligadoras

Tanto en sangre como en fluido extravascular, la activina e inhibina se encuentran unidas a dos proteínas ligadoras: α 2-macroglobulina y folistatina (Mather, 1996). La unión a α 2-M no afectaría la actividad biológica de la activina (Niemuller et al., 1995) y se cree que esta proteína, de alta concentración circulante, estaría involucrada en su transporte o "clearance", al igual que para el TGF- β y otros factores de crecimiento (Feige et al., 1996).

La folistatina es una proteína, originalmente aislada y caracterizada a partir de fluido folicular (Nakamura et al., 1990), capaz de unir activina con alta afinidad (Schneyer et al., 1994). Existen distintas formas proteicas de folistatina generadas por "splicing" alternativo (288 y 315 kD) y por procesamiento proteolítico (303 kD) (Nakamura et al., 1990). La folistatina es capaz de neutralizar la actividad biológica de activina, por formación de complejos, en casi la totalidad de los sistemas biológicos estudiados (Mather et al., 1997).

4.1.4. Transducción de señal

Las proteínas Smad son los mediadores intracelulares en la transducción de señales de los miembros de la familia del TGF- β , incluida la activina (Heldin et al., 1997; Massague, 1996). Sin embargo, las funciones específicas, así como las bases moleculares de la especificidad de las Smad por los distintos receptores no se conocen.

Recientemente, se ha reportado que el tipo de Smad involucradas en la acción de activina sería el mismo de aquellas activadas por TGF- β (Lebrun et al., 1999). La unión de activina a sus receptores promueve la formación de complejos con Smad-2 y -3. Este complejo es liberado al citoplasma, donde interactúa con la Smad 4. Estos complejos Smad son capaces de mediar la transcripción de genes inducidos por activina.

4.1.5. Acciones biológicas

Aunque inicialmente se describió a la activina como un regulador de la liberación de hormonas en la hipófisis, en la actualidad se conoce un amplio rango de efectos, tanto dentro como fuera del sistema reproductivo. Se ha demostrado que la activina en varios tejidos como es un mitógeno o un morfógeno y se encuentra implicada en procesos diversos, entre ellos la embriogénesis, osteogénesis, hematopoyesis y la fisiología reproductiva.

Durante el desarrollo, la activina actúa localmente y en diversos sitios en la embriogénesis de mamíferos (Ying et al., 1997). La subunidad β A se expresa y presumiblemente actúa en corazón, cerebro, médula y músculo esquelético, mientras que la β B se asocia a corazón y gonadas. La activina se ha propuesto como un factor inductor de mesodermo en diversas especies, desde *Xenopus* (Reilly, Melton, 1996) hasta ratón (Johansson, Wiles, 1995). Aunque con el ratón knock-out no se ha demostrado esta hipótesis de forma concluyente, se sugiere que la activina no utilizaría su receptor tipo II en el embrión, sino alguno relacionado, remarcando la complejidad en la especificidad de receptores de la familia del TGF- β (Matzuk et al., 1995; Bhushan et al., 1994). Por otra parte, en el modelo del ratón deficiente en el receptor ActRIIB, se demostró la importancia de los receptores de activina en el desarrollo (Oh, Li, 1997).

A nivel reproductivo, originalmente se consideró a la activina y la folistatina como factores endocrinos producidos por las gónadas que regulaban la liberación de FSH en la hipófisis. Sin embargo, el conjunto de evidencias acumuladas indica que su

principal función es la de reguladores paracrinós y autocrinos intraováricos e intratesticulares.

Numerosos experimentos han indicado que gonadotrofinas, esteroides y factores locales estimulan la expresión de las subunidades de activina y folistatina in vivo e in vitro (Mather et al., 1997).

En células de granulosa inmaduras, se ha demostrado que la activina induce la expresión de receptores de FSH (Minegishi et al., 1996; Nakamura et al., 1995; Xiao et al., 1992). La activina estimula la proliferación de células de la granulosa provenientes de folículos pequeños y folículos secundarios (Miró, Hillier, 1996; Li et al., 1995) y es capaz de promover el desarrollo del folículo ovárico in vitro (Li et al., 1995). A su vez, activina amplifica la acción de FSH sobre parámetros asociados a la diferenciación en células de granulosa inmaduras de rata, como la actividad de aromatasa (Xiao et al., 1990; Hutchinson et al., 1987), el número de receptores para LH (Sugino et al., 1988) y la síntesis de progesterona (Sugino et al., 1988; Xiao et al., 1990).

La folistatina fue originalmente aislada e identificada a partir de fluido folicular. En el

ovario, la expresión de folistatina se correlaciona con la expresión de la subunidad β y es regulada de igual forma por gonadotrofinas (Tano et al., 1995; Shintani et al., 1997). Como la folistatina tiene la característica de ligar activina, se ha demostrado que es capaz de neutralizar la actividad de ésta en células ováricas in vitro (Xiao et al., 1992; Xiao, Findlay, 1991; Li et al., 1995) y el efecto resultante de la interacción entre activina y folistatina, depende de la relación entre ambas proteínas, como se demostró para la función testicular (Mather et al., 1993).

4.2. Objetivo

El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio comparativo de la acción de activina y TGF- β , dos factores pertenecientes a la misma familia de péptidos sobre el crecimiento y diferenciación de células de la granulosa.

4.3. Resultados

4.3.1. Efectos de activina sobre la síntesis de ADN en células de la granulosa

Las células de la granulosa fueron tratadas con concentraciones crecientes de activina, observándose una fuerte estimulación en la síntesis de ADN (Figura 4.2). El efecto de activina produjo entre 50 y 70 veces de estimulación del basal ($ED_{50} \sim 50$ ng/ml). La acción estimuladora de activina fue amplificada por FSH (Figura 4.2), alcanzando un incremento de entre 1.4 y 2 veces con respecto a cultivos sin FSH.

La activina y otros miembros de la familia de TGF- β regulan la función celular compartiendo el mecanismo de acción (Derynck et al., 1998; Chen et al., 1996). Por lo tanto, se decidió estudiar comparativamente la regulación de la síntesis de ADN en células de la granulosa

por TGF- β y por activina. Los efectos estimuladores de la proliferación por activina en células de granulosa también se observaron en presencia de TGF- β (en concentraciones saturantes) o una combinación de FSH y TGF- β (Figura 4.3). El ajuste de las curvas dosis respuesta indicó que los valores alcanzados a concentraciones efectivas máximas de activina A resultaron independientes de la ausencia o presencia de TGF- β . Estos resultados indican que el efecto de activina sobre el crecimiento de células de la granulosa, sólo puede ser parcialmente reproducido por el TGF- β . En este sentido, se encontró una complementación diferente entre activina y TGF- β para la regulación de la síntesis de estradiol (sección 4.3.2)

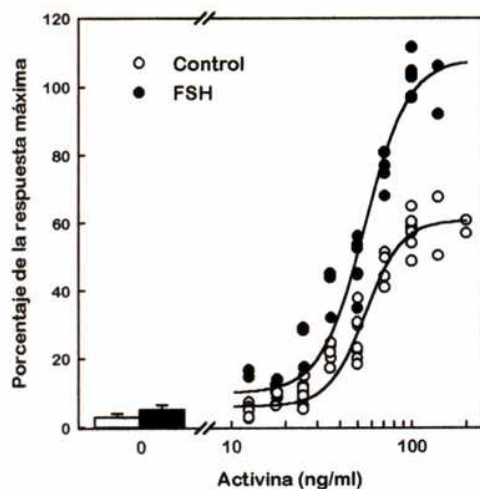


Figura 4.2
Efecto de activina A sobre la síntesis de ADN en células de la granulosa
Células de la granulosa se cultivaron en ausencia o con concentraciones crecientes de activina A en medio control, o con FSH (20 ng/ml). Los resultados se representan como porcentaje de las respuestas máximas de cuatro experimentos independientes. La incorporación de 3 H-timidina se llevó a cabo durante 24 hs. comenzando a las 24 hs. de la estimulación. Las curvas dosis-respuesta indicaron ED_{50} de 50 ng/ml para activina (Allfit); FSH amplificó la acción estimuladora de activina ($p < 0.001$)

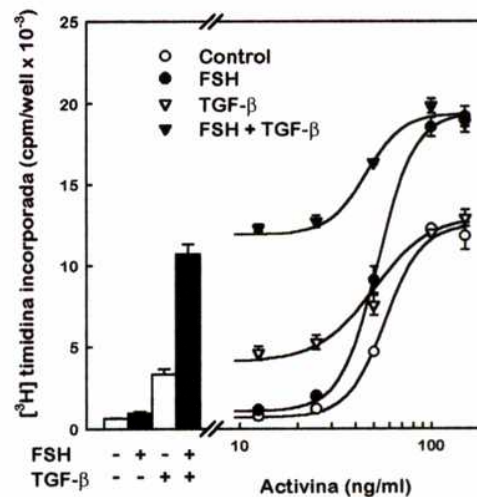


Figura 4.3
Efecto de activina sobre la síntesis de ADN estimulada por TGF- β
Células de granulosa se cultivaron en ausencia o con concentraciones crecientes de activina A en medio control, o con FSH (20 ng/ml), TGF- β 1 (3 ng/ml) o la combinación de ambos. Los resultados son medias $\pm$ ES de determinaciones realizadas por triplicado. La presencia de TGF- β no alteró los valores alcanzados a concentraciones mayores de 100 ng/ml activina.

En la Figura 4.4 se muestra que la amplificación por FSH de la acción de activina es bifásica, de manera semejante a lo encontrado para el efecto co-mitogénico de la gonadotropina y otros factores como TGF- β o factores derivados del ovocito. En presencia de concentraciones máximas de activina, no se observó efecto de TGF- β para ninguna de las concentraciones de FSH ensayadas.

La folistatina es una proteína ligadora de activina que es la responsable de la modulación de la actividad biológica de la misma. La presencia de folistatina se encuentra siempre asociada a la regulación autocrina o paracrina por activina en diversos tejidos, incluido el ovario. Por lo tanto, se decidió analizar el efecto de folistatina en la modulación del crecimiento de células de la granulosa. Como muestra la figura 4.5, la presencia de esta proteína disminuyó el Control y el leve efecto de

FSH. Asimismo atenuó la estimulación por TGF- β y el synergismo entre FSH y TGF- β . Las potentes acciones de activina fueron neutralizadas por folistatina y se alcanzaron los mismos valores de incorporación que en ausencia de activina.

Aún sin el agregado exógeno de activina, las acciones de folistatina resultaron inhibitorias de la síntesis de ADN, lo que sugiere que la activina producida por las células de la granulosa en el cultivo contribuiría a su propio crecimiento. En este sentido, es importante señalar que el synergismo entre FSH y TGF- β en la síntesis de ADN en células de la granulosa de rata es dependiente de la densidad celular en cultivo (como se mostró previamente).

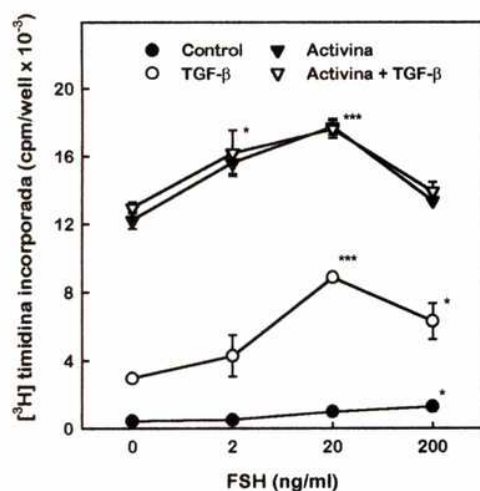


Figura 4.4
Acción de gonadotropinas sobre el efecto de activina

Células de granulosa de rata se cultivaron con en condiciones basales (Control) o con TGF- β 1 (5 ng/ml) en ausencia o presencia de concentraciones efectivas máximas de activina (100 ng/ml) y con dosis crecientes de FSH. La incorporación de 3 H-timidina se realizó por 24 hs., comenzando 24 hs. luego del plaqueo. Los resultados son medias $\pm$ ES de determinaciones en triplicado (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ comparado con los respectivos cultivos sin FSH).

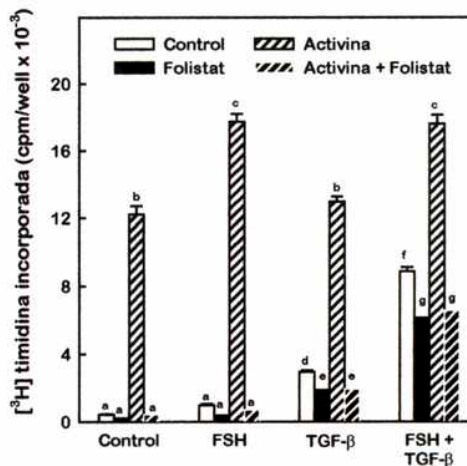


Figure 4.5
Efecto de folistatina sobre la síntesis de ADN en células de granulosa

Células de granulosa se cultivaron en medio control, con FSH (20 ng/ml), TGF- β (5 ng/ml) o una combinación de FSH y TGF- β en ausencia o presencia de folistatina (300 ng/ml), activina A (100 ng/ml) o el conjunto de activina y folistatina. La incorporación de 3 H-timidina se llevó a cabo entre las 24 y 48 hs. de cultivo. Los resultados son medias $\pm$ ES de determinaciones en triplicado. Los valores con distintas letras son significativamente diferentes, $p < 0.05$.

4.3.2. Efecto de activina y follistatina sobre la síntesis de estradiol en células de la granulosa

Las células de la granulosa inmaduras no son capaces de sintetizar estradiol, a menos que la expresión de la aromatasa sea estimulada por FSH y se provea de andrógenos, como sustratos aromatizables. Dentro del folículo, las células teca son quienes proveen del sustrato para esta enzima. Sin embargo, si bien la FSH es el principal estímulo para la producción de estrógenos, su acción se encuentra modulada por factores peptídicos y esteroides intrafoliculares.

En primer término, se analizó si la producción de estradiol estimulada por FSH era regulada por follistatina, la proteína ligadora de activina. En la figura 4.5 se muestra que el agregado de concentraciones crecientes de follistatina redujo la potencia estimuladora de FSH sobre la acumulación de estradiol (aproximadamente 50% del control), mientras que no hay modificación

de los niveles basales. Este experimento sugiere la participación de activina como regulador local en la estimulación, ya sea como mediador del efecto de FSH o como co-estimulador junto con la gonadotropina de la esteroidogénesis.

Dado que la activina es un miembro de la superfamilia del TGF- β se analizaron sus efectos, en forma comparada con aquellos producidos por TGF- β 1 (Figura 4.6). Tanto el TGF- β , como la activina A, potenciaron la acción de FSH sobre la síntesis de estradiol con diferentes ED₅₀ (0.09 ± 0.02 ng/ml TGF- β y 10 ± 2.5 ng/ml activina A).

El TGF- β y la activina amplificaron la acción de FSH sobre la producción de estradiol en similar magnitud (2.4 ± 0.3 veces sobre FSH sola), ya que, en ambos casos, se alcanzaron valores semejantes de

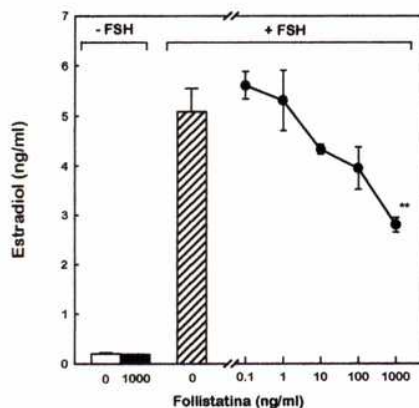


Figura 4.5 Efecto de follistatina sobre la producción de estradiol

Las células de la granulosa se cultivaron durante 68 hs. en condiciones control o con FSH (20 ng/ml) y con el agregado de concentraciones crecientes de follistatina.

Los niveles de estradiol acumulados en los medios de cultivo se determinaron por RIA. Se agregó androstenediona ($0.33 \mu\text{M}$) como sustrato aromatizable. Los valores son media $\pm$ ES. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del control (* $p < 0.05$).

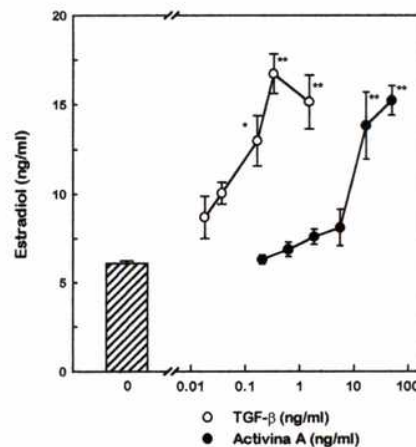


Figura 4.6 Efecto de TGF- β y activina A sobre la síntesis de estradiol estimulada por FSH

Las células de granulosa se cultivaron durante 64 hs. con FSH (20 ng/ml) en condiciones control o con dosis crecientes de TGF- β 1 o de activina A. Los valores son medias $\pm$ ES. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto del control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Los ajustes de las curvas dieron ED₅₀ de 0.09 ± 0.02 ng/ml para TGF- β y 10 ± 2.5 ng/ml para activina. No se encontraron diferencias significativas al comparar los efectos máximos alcanzados ($p > 0.05$).

estimulación máxima ($p > 0.05$, Figura 4.6), a diferencia de los efectos promovidos por estos factores sobre el crecimiento de células de la granulosa.

Con la hipótesis que el TGF- β y la activina compartían mecanismos de acción en la estimulación de la aromatasa, se analizó la acción conjunta de los dos factores en concentraciones efectivas máximas (Figura 4.7). Mientras que no existió alteración de la producción basal, la estimulación por FSH y TGF- β no se vió alterada por la presencia de activina. La follistatina, que es capaz de unir la activina y, como consecuencia, impedir sus acciones biológicas, provocó una disminución de los efectos de FSH y del conjunto FSH + activina. Este efecto podría explicarse por la neutralización de la activina agregada, o, que en ausencia de agregado exógeno, la activina producida por las mismas células que estaría actuando como factor autocrino. Sin embargo, cuando la acción estimulatoria de la activina es eliminada por follistatina, el TGF- β es capaz de reemplazar su efecto, potenciando la síntesis de estradiol. Estos resultados sugieren que TGF- β y activina compartirían mecanismos responsables de la potenciación de la acción de gonadotrofinas en la estimulación de la aromatasa.

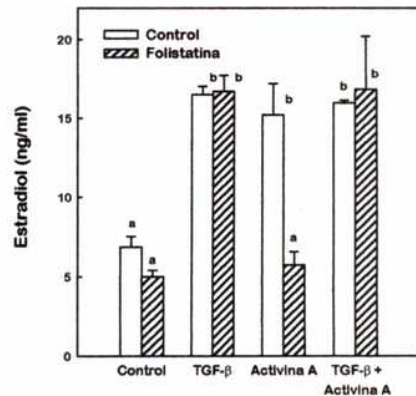


Figura 4.7. Efecto de TGF- β , activina y follistatina sobre la esteroidogénesis en células de granulosa.

Cultivos de células de granulosa se trataron durante 64 hs. con FSH (20 ng/ml) en condiciones control, con activina A (50 ng/ml), o con TGF- β (3 ng/ml) en ausencia o presencia de follistatina (200ng/ml). Los valores son medias $\pm$ ES. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.01$).

4.4. *Discusión*

Los resultados presentados muestran que la activina y su proteína ligadora, la follistatina, regulan la esteroidogénesis y la síntesis de ADN en cultivos de células de la granulosa de rata.

Las acciones de la activina se analizaron comparativamente con aquellas promovidas por el TGF- β , ya que ambos factores pertenecen a la misma familia de polipéptidos y ejercen sus efectos sobre las células blanco a través de mecanismos de señalización compartidos (Hu et al., 1998; Lebrun et al., 1999).

La inhibina (heterodímeros α - β) producida por las gónadas, se comporta como hormona, regulando la liberación hipofisaria de FSH, y a su vez como factor de acción local (Findlay, 1993). Sin embargo, el principal papel fisiológico de la activina y la follistatina, producidas por las células de la granulosa, sería el de moduladores intraováricos del desarrollo del folículo. A pesar de que la caracterización original de estas proteínas se realizó en función de su capacidad de regular la secreción de FSH por la pituitaria, esta actividad sería llevada a cabo por un sistema activina-follistatina hipofisario y de origen gonadal.

Publicaciones previas han demostrado que el TGF- β y la activina son capaces de aumentar la estimulación por FSH de la síntesis de estradiol (Hutchinson et al., 1987; Xiao et al., 1990; Ying et al., 1986; Adashi, Resnick, 1986; Hutchinson et al., 1987). En las condiciones de cultivo utilizadas en el presente estudio se obtuvieron resultados en concordancia con los previamente descritos. Sin embargo, los datos presentados en este módulo, indican que, tanto para el TGF- β como para la activina, la amplificación en la biosíntesis de estradiol fue de similar magnitud. La presencia conjunta de ambos factores no mostró alteración de los efectos individuales y no se observaron alteraciones en la síntesis basal del esteroide.

La follistatina neutralizó las acciones de activina, sin revertir significativamente aquellas promovidas por el TGF- β . Por lo

tanto, la activina y el TGF- β podrían cumplir funciones redundantes en la amplificación de la acción de gonadotrofinas sobre la esteroidogénesis en células de la granulosa.

Los estudios realizados in vivo han provisto información de difícil interpretación sobre los efectos potencialmente mitogénicos de activina en el ovario. Se han descrito que la activina no alteraba la proliferación celular (Schwall et al., 1989), que producía efectos inhibitorios (Woodruff et al., 1990) y que ejercía acciones estimuladoras (Doi et al., 1992). Para la adecuada interpretación de estos datos in vivo, debe tenerse en cuenta que la activina actúa sobre otros tejidos del organismo, principalmente la hipófisis, lo cual puede influenciar indirectamente su acción en el ovario. (Findlay, 1993; Doi et al., 1992; Schwall et al., 1989). Por lo tanto, el abordaje in vitro utilizado puede ser particularmente valioso, para analizar la acción de la activina específicamente sobre las células de la granulosa.

Publicaciones recientes indican que la activina es un potente mitógeno para las células de la granulosa (Miró, Hillier, 1996) y para una línea de células de granulosa (Li et al., 1997). Asimismo se ha demostrado que la combinación con FSH permite reconstruir in vitro la estructura y la función folicular, por lo que la activina podría también estar involucrada en la morfogénesis del folículo (Li et al., 1995).

En nuestras condiciones experimentales, la activina promovió la estimulación del crecimiento en forma dosis-dependiente. Es importante señalar, que el tratamiento con activina fue el estímulo individual más potente de todos los ensayos sobre la síntesis de ADN en el sistema de cultivo utilizado (entre 50 y 70 veces de estimulación). Esta acción fue amplificada por bajas concentraciones de FSH. El hecho que FSH se transformó en un mitógeno de células de la granulosa en presencia de activina, enfatiza la potencial relevancia fisiológica de esta acción de activina sobre la función ovárica.

Como se demostró en el módulo I de esta tesis, el TGF- β estimuló la síntesis de ADN en células de la granulosa, efecto que fue intensificado por FSH. Los efectos de activina resultaron cualitativamente similares, pero hemos encontrado una potencia distinta en la acción de ambos péptidos sobre la síntesis de ADN. Además, es posible observar efectos adicionales de activina sobre aquellos promovidos por concentraciones efectivas máximas de TGF- β , sobre la síntesis de ADN. Las curvas dosis respuesta indicaron que los valores de estimulación alcanzados a dosis máximas de activina A resultaron independientes de la ausencia o presencia de TGF- β .

Estos datos señalan que el TGF- β se comportó como un agonista parcial de activina sobre la síntesis de ADN. El término agonista debe interpretarse desde un punto de vista fisiológico, lo que no necesariamente implica que ambos compuestos compartan los mismos receptores. Por otra parte, cuando se analizó la amplificación de la acción de FSH sobre la síntesis de estradiol, se encontró que ambos ligandos presentaron similar potencia como agonistas. La posible contaminación de los preparados de activina con TGF- β debe excluirse ya que similares efectos se obtuvieron utilizando activina A recombinante como estímulo.

Según investigaciones recientes, la transducción de las señales de los miembros de la superfamilia del TGF- β se realiza a través de receptores con actividad serina y treonina quinasa que regulan la activación y traslocación al núcleo de las proteínas Smad (Hu et al., 1998). El TGF- β y la activina, a través de sus receptores, promueven la fosforilación del mismo tipo de proteínas Smad (Smad-2 y Smad-3) (Derynck et al., 1998; Lebrun et al., 1999; Nakao et al., 1997), mientras que otros factores de la superfamilia, como las BMPs, involucran a las Smad-1 y -5 (Derynck et al., 1998).

En base a la disociación de efectos de TGF- β y de activina sobre la estimulación de la esteroidogénesis y sobre la síntesis de ADN es posible plantear el siguiente modelo. Asumiendo que la unión de los ligandos a

sus receptores promueven la activación del mismo tipo de proteínas Smad, el TGF- β presentaría una menor eficiencia de transducción en este proceso que la correspondiente a la activina, lo cual explicaría la diferente potencia de los péptidos sobre la síntesis de ADN en células de la granulosa. Por otra parte, los niveles de activación de Smad necesarios para incrementar la producción de estradiol, serían menores que los requeridos para promover la síntesis de ADN. La estimulación realizada por TGF- β sería suficiente para alcanzar los efectos máximos a nivel del promotor de la aromatasa. Esta suposición está sustentada en el hecho que las curvas dosis respuestas para la amplificación de la síntesis de estradiol fueron más sensibles, es decir presentaron menor ED₅₀, que las de estimulación de la síntesis de ADN.

El TGF- β y la activina transducen sus señales a la célula por heterodimerización de receptores tipo II y tipo I. Los receptores tipo II determinan la especificidad de unión de ligando, y cada uno interactúa con un repertorio distinto de receptores tipo I, que son los que desencadenan las señales intracelulares. Sin embargo se ha demostrado que receptores tipo I de TGF- β también pueden asociarse con receptores tipo II de activina pero los tipo I de activina no lo hacen con los tipo II de TGF- β (Ebner et al., 1993; Attisano et al., 1993; Cárcamo et al., 1994). El reclutamiento de ambos tipos de receptores tipo I (T β RI y ACTRI I) por activina, pero no por TGF- β , podría explicar la diferencia en la efectividad de transducción propuesta para ambos factores.

Se ha descrito la expresión de receptores de activina (ACTRI, ACTRIB, ACTRII y ACTRIIB) y de TGF- β (T β RI y T β RII) en células de la granulosa de distintas especies (Roy, Kole, 1995; Schmid et al., 1994; Juneja et al., 1996; Peng et al., 1996; Aloï et al., 1997; Sidis et al., 1998).

Para comprender el papel fisiológico de los factores de la familia del TGF- β en el desarrollo del folículo, es necesario un conocimiento más profundo de los mecanismos de señalización involucrados. Hasta la actualidad, no se ha estudiado la

cooperación en la acción de los distintos tipos de receptores en células ováricas, ni se han analizado los patrones de activación de las proteínas Smad.

La proteína ligadora de activina, follistatina, cuya expresión en el ovario está ampliamente documentada, revirtió la acción de activina tanto sobre la síntesis de ADN como sobre la amplificación de la síntesis de estradiol. Sin embargo, aún en ausencia de agregado exógeno de activina a los cultivos, las acciones de follistatina resultaron inhibitorias. Estos resultados indicarían que bajas concentraciones de activina (en concentraciones subóptimas), serían producidas por las células de la granulosa en cultivo y ejercerían efectos autocrinos. Recientemente, se han demostrado respuestas diferenciales a la activina endógena o exógena en células de teratocarcinoma, acción regulada por follistatina asociada a la superficie celular (Delbaere et al., 1999). En este sentido, en el sistema de cultivo de células de la granulosa inmaduras, utilizado en estos experimentos, se encontró expresión de las subunidades βA y βB de activina/inhibina (módulo V de esta tesis) en concordancia con lo descrito en publicaciones previas (LaPolt et al., 1990; Eramaa et al., 1994; Aloï et al., 1995; Meunier et al., 1988).

Differential Response to Exogenous and Endogenous Activin in a Human Ovarian Teratocarcinoma-Derived Cell Line (PA-1): Regulation by Cell Surface Follistatin

No se han demostrado acciones biológicas de la follistatina distintas de su capacidad de unir activina. Si bien, no existen evidencias de la existencia de receptores para follistatina, esta proteína presenta la característica de interactuar con cadenas de heparan sulfato de proteoglicanos de la matriz extracelular (Nakamura et al., 1991; Sugino et al., 1993). La asociación a la superficie celular de follistatina promueve la endocitosis de la activina unida y un incremento en la degradación por enzimas

lisosomales (Hashimoto et al., 1997). Sin embargo, la regulación por follistatina de la producción de progesterona y el metabolismo de la misma en células de granulosa inmaduras, no pueden explicarse por su actividad de unión de activina (Xiao, Findlay, 1991; Xiao et al., 1990), lo que sugiere una posible acción biológica distinta, ya sea por efectos directos sobre la célula o por unión de otro factor perteneciente a la familia de péptidos.

Se ha establecido que activina y follistatina se encuentran presentes en altas concentraciones en el ovario y en el fluido folicular en diversas especies (McFarlane et al., 1996; Knight et al., 1996; Magoffin, Jakimiuk, 1997; Erickson et al., 1995; Wakatsuki et al., 1996; Evans et al., 1998). Por lo tanto, el rango de dosis de estas proteínas, en el que se observaron acciones sobre las células de la granulosa en los estudios presentados, se encuentra dentro de los niveles fisiológicos.

La expresión de las distintas las subunidades βA y βB presenta variaciones a lo largo del desarrollo del folículo (Meunier et al., 1988; Schwall et al., 1990) y se han encontrado patrones característicos para los cambios en las inhibinas diméricas A y B circulantes a lo largo del ciclo menstrual en la mujer o estral en la rata (Woodruff et al., 1996; Groome et al., 1996; Groome et al., 1994). Dependiendo del tipo de subunidad β que se exprese, se originarían diferentes formas de activina (A, B o AB), por lo que, se especula que distintas formas de activina podrían cumplir diferentes papeles en la regulación ovárica en las diferentes etapas de la foliculogénesis. Sin embargo, hasta la actualidad, todos los estudios sobre la regulación de la función folicular se han llevado a cabo mediante la utilización de activina A. La obtención de otros tipos de activinas recombinantes permitirá un análisis comparativo de la acción de las distintas formas, así como la especificidad del tipo de receptores para cada uno de ellas.

5. Módulo III

***Efecto del factor de necrosis
tumoral- α sobre función de las
células de la granulosa***

5.1. Introducción

5.1.1. Estructura y acción

El TNF- α es un polipéptido de 233 aminoácidos considerado el prototipo de una familia de proteínas relacionadas (como el NGF, el ligando CD40, el ligando de Fas y otros) (Beutler, van Huffel, 1994). Existe tanto como proteína de membrana como en forma soluble, siendo ambas formas biológicamente activas. El TNF- α soluble es creado por proteólisis, generándose la molécula de 17 kDa, de mayor potencia, que normalmente circula como homotrímero (Kriegler et al., 1988).

Esta citoquina se ha considerado clásicamente como una citoquina inflamatoria producida por macrófagos activados, aunque se ha demostrado su producción por una muy amplia diversidad de tipos celulares (Beutler, 1991). Además de su papel crucial en el shock séptico e inflamación (Beutler, van Huffel, 1994), es un modulador celular pleiotrópico que cumple una función importante en muchos eventos fisiológicos, incluyendo acciones a nivel endocrino (Kennedy, Jones, 1991; Vilcek, Lee, 1991). La amplia variedad de efectos que produce es atribuida a la ubicuidad de sus receptores, la activación de múltiples vías de transducción y su capacidad de inducir o suprimir la expresión de un vasto número de genes.

Existen dos receptores para TNF, TNFR1 (p55) y TNFR2 (p75) que guardan alta homología entre sí y comparten características comunes con otros receptores de la familia (Beutler, van Huffel, 1994). Además de las formas de membrana de los receptores existen formas solubles de los mismos que actúan como proteínas ligadoras, neutralizando las actividades biológicas. El dominio de muerte presente en la porción intracelular del TNFR1 sería el responsable de desencadenar las señales que conducen a la apoptosis, por activación de las caspasas (Ashkenazi, Dixit, 1998; Nagata, 1997). Sin embargo, este no es el único resultado de la unión de TNF- α ya que el TNFR1 también activa al factor de transcripción NF- κ B, desencadenando

acciones que en ciertas circunstancias inhiben la apoptosis (Nagata, 1997). Se presume que el TNFR1 es responsable de las actividades apoptóticas del TNF- α mientras que el TNFR2 sería responsable de la generación de señales regulatorias o proliferativas en linfocitos (Vandenabeele et al., 1995).

5.1.2. Presencia en el ovario

Varios estudios han demostrado su presencia en el ovario de diversas especies, tanto a nivel del ARNm, como de proteínas inmunoreactiva. El TNF- α se ha detectado en ovocitos y células foliculares en el ovario de rata (Marcinkiewicz et al., 1994); en el ratón en ovocito y células tipo macrófagos intersticiales (Chen et al., 1993). También se describió su presencia en el ovario humano, tanto en los compartimientos foliculares como luteales (Roby et al., 1990), así como en los ovocitos (Naz et al., 1997). Células de granulosa-luteínicas han sido también implicadas como productoras de TNF- α (Zolti et al., 1990). Sin embargo, la presencia de macrófagos en los preparados sería responsable de la secreción de esta citoquina en experimentos *in vitro*. Las citoquinas secretadas por los macrófagos del compartimiento ovárico intersticial (Hume et al., 1984), podrían tener efectos paracrin, constituyéndose en moduladores "*in situ*" de la función ovárica (Figura 5.1).

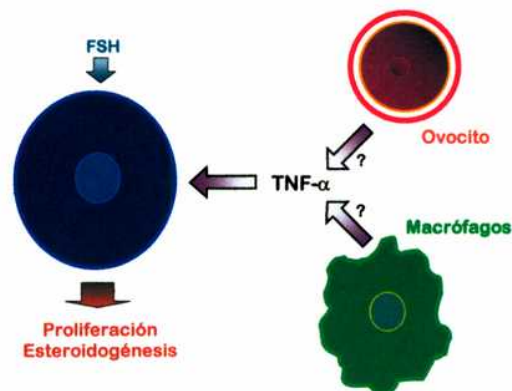


Figura 5.1
Posibles interacciones paracrin mediadas por TNF- α

5.1.3. Acciones de TNF- α en el desarrollo folicular

Una serie de estudios han indicado que el TNF- α afecta el desarrollo del folículo ovárico. Esta citoquina produce efectos estimulatorio o inhibitorio, sobre la función folicular, luteal y la ovulación. (Terranova, Rice, 1997; Adashi, 1990; Norman, Brännström, 1996; Terranova et al., 1995).

Las acciones de TNF- α sobre la función folicular, se evidencian fundamentalmente como un bloqueo de la diferenciación de células de la granulosa, estimulada por gonadotrofinas. El TNF- α regula la expresión de receptores para LH (Darbon et al., 1989), la producción de progesterona (Adashi et al., 1990; Darbon et al., 1989), la biosíntesis de estradiol (Adashi et al., 1989), el metabolismo de esteroides (Adashi et al., 1989) y la apoptosis (Witty et al., 1996; Kaipia et al., 1996).

La función de las células tecales también es alterada por el TNF- α , originando una inhibición en la síntesis de andrógenos (Zachow et al., 1993; Andreani et al., 1991) y una estimulación del agrupamiento entre células (Zachow et al., 1992).

5.2. Objetivo

El objetivo de este trabajo fue determinar la acción del TNF- α sobre la síntesis de ADN en células de la granulosa inmaduras y su interacción con hormonas y otros factores locales, como el factor de crecimiento transformante- β o activina.

5.3. Resultados

5.3.1. Efecto del $\text{TNF-}\alpha$ en el crecimiento de células de granulosa

Se analizó el efecto del $\text{TNF-}\alpha$ sobre la síntesis de ADN en cultivos de células de granulosa inmaduras. Como se observa en la figura 5.2, el $\text{TNF-}\alpha$ ejerció una leve estimulación sobre la incorporación de timidina en condiciones basales. Cuando las células de la granulosa se cultivaron en presencia de FSH (20 ng/ml) y $\text{TGF-}\beta$ (3 ng/ml), el agregado de $\text{TNF-}\alpha$ produjo una inhibición dosis-dependiente en la síntesis de ADN ($\text{ED}_{50}=3.2 \pm 0.9$ ng/ml). Por otra parte, la estimulación promovida por el $\text{TGF-}\beta$ (3 ng/ml) fue amplificada el $\text{TNF-}\alpha$ ($\text{ED}_{50}=3.4 \pm 0.8$ ng/ml).

Debe notarse, que en presencia de $\text{TNF-}\alpha$, en dosis entre 10 y 30 ng/ml, los niveles alcanzados en la estimulación de la acción

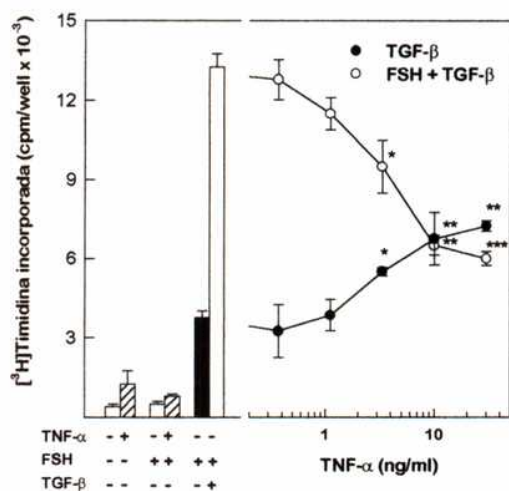


Figura 5.2

Efecto de $\text{TNF-}\alpha$ sobre la síntesis de ADN en células de la granulosa

Las células de granulosa se cultivaron en ausencia o con concentraciones crecientes de $\text{TNF-}\alpha$, en medio control, con FSH (20 ng/ml), con $\text{TGF-}\beta$ (3 ng/ml) o con la combinación de ambos. Los resultados son medias $\pm$ ES de determinaciones en triplicado (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparado con los respectivos controles, en ausencia de $\text{TNF-}\alpha$).

de $\text{TGF-}\beta$ por $\text{TNF-}\alpha$ y en la inhibición por la citocina del sinergismo entre FSH y $\text{TGF-}\beta$, no fueron significativamente diferentes ($p > 0.05$). Estos resultados, podrían indicar que el $\text{TNF-}\alpha$ realiza una inhibición sobre la acción de la gonadotropina o una disminución en la respuesta de las células a FSH.

Para estudiar más en detalle este efecto, se analizó la acción del $\text{TNF-}\alpha$ en presencia de concentraciones crecientes de FSH. Cuando se ensayó con $\text{TGF-}\beta$ (3 ng/ml), FSH incrementó la síntesis de ADN de manera bifásica. Sin embargo, en presencia de $\text{TNF-}\alpha$ (10 ng/ml) y $\text{TGF-}\beta$ (3 ng/ml), el agregado de concentraciones crecientes de FSH no alteró en forma significativa la estimulación por ambas citocinas (Figura 5.3)

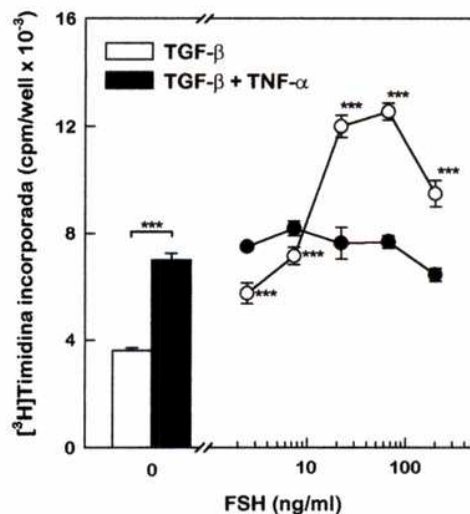


Figura 5.3

$\text{TNF-}\alpha$ bloquea la acción de gonadotropinas sobre la síntesis de ADN

Células de granulosa de rata se cultivaron con $\text{TGF-}\beta$ (3 ng/ml) en ausencia o presencia de concentraciones efectivas máximas de $\text{TNF-}\alpha$ (10 ng/ml) y con dosis crecientes de FSH. La incorporación de ^3H -timidina se realizó durante 24 hs., comenzando 24 hs. luego del plaqueo. Los resultados son medias $\pm$ ES de determinaciones en triplicado (***) $p < 0.001$ comparado con los respectivos cultivos sin FSH).

A continuación se determinó si la estimulación producida por FSH en combinación con estradiol o activina, era también afectada por $\text{TNF-}\alpha$. Cuando las células de la granulosa se cultivaron con FSH (20 ng/ml) y estradiol (100 ng/ml), el agregado de $\text{TNF-}\alpha$ inhibió completamente esta estimulación hormonal sobre la síntesis de ADN (Figura 5.4, panel A). Por otra parte, la amplificación por FSH del efecto de activina A (100 ng/ml) fue suprimida por el

$\text{TNF-}\alpha$. La aparente estimulación por $\text{TNF-}\alpha$ del efecto de activina resultó no significativa estadísticamente. Como se muestra en la Figura 5.4 panel B, la presencia de $\text{TNF-}\alpha$ tanto con activina como con la combinación de este péptido y FSH induce niveles similares de incorporación de timidina, de manera semejante a lo observado para la acción de $\text{TNF-}\alpha$ con $\text{TGF-}\beta$.

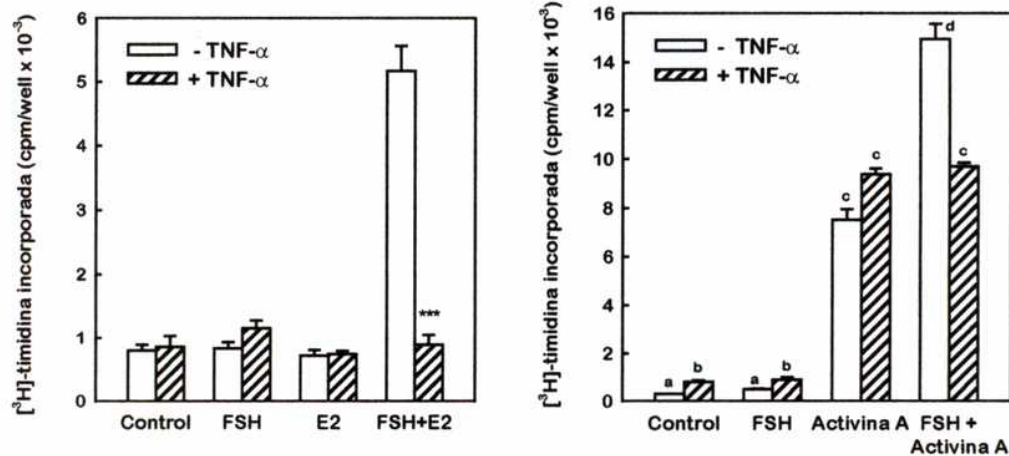


Figure 5.4

Efecto del $\text{TNF-}\alpha$ sobre la síntesis de ADN en células de la granulosa estimulada por estradiol o activina

Panel A (izquierda): Las células se cultivaron en ausencia o presencia de $\text{TNF-}\alpha$ (10 ng/ml), en medio control (Control) o con el agregado de FSH (20 ng/ml), estradiol (E2, 100 ng/ml) o una combinación de estas hormonas.

Panel B (derecha): Células de la granulosa se cultivaron en condiciones control, con FSH (20 ng/ml), activina (100 ng/ml) o la combinación de FSH y activina (20 y 100 ng/ml). La incorporación de ^3H -timidina se llevó a cabo durante 24 hs. comenzando 24 hs. después de la estimulación. Los resultados son medias $\pm$ ES de determinaciones en triplicado (***) $p < 0.001$ comparado con los respectivos cultivos control; los valores con distintas letras son significativamente diferentes, $p < 0.05$).

5.3.2. Efecto del TNF- α sobre la esteroidogénesis en células de granulosa

5.3.2.1. Regulación de la biosíntesis de estradiol y progestágenos

Se estudió el efecto del TNF- α sobre la producción de estradiol, y la biosíntesis de progestágenos en cultivos primarios de la granulosa de rata. En todos los casos, se utilizó androstenediona (0.33 μ M) como sustrato aromatizable, dado que las células de la granulosa no sintetizan andrógenos. En el folículo, los andrógenos son provistos por las células de la teca.

El aumento de los niveles de estradiol, estimulado por FSH, se produce entre las 48 y 72 hs. de cultivo, debido a la expresión de la aromatasa inducida por gonadotrofinas y andrógenos.

En nuestro sistema de cultivo de células, se comprobó una inhibición dosis-dependiente por el TNF- α en la acumulación de estradiol, promovida por FSH. El TNF- α , en una concentraciones de 10 ng/ml, inhibió completamente la producción de estrógenos, alcanzando valores comparables al control ($ED_{50} = 3.3 \pm 0.3$ ng/ml) (Figura 5.5, panel A). La síntesis basal de estradiol, es decir sin el estímulo hormonal, también resultó disminuida. El análisis del curso temporal de la producción de estradiol indicó efectos inhibitorios similares a todos los tiempos

analizados (48, 72 y 96 hs., datos no mostrados).

Se analizó, si dosis mayores de FSH que las utilizadas, eran capaces de revertir la inhibición producida por el TNF- α . Se realizaron incubaciones, en presencia de dosis crecientes de FSH (desde 2 hasta 200 ng/ml), sin o con el agregado de la citoquina al medio de cultivo (Figura 5.5, panel B). Se observó, en todas las condiciones, ensayadas que el TNF- α bloquea el efecto de FSH sobre la actividad de aromatasa.

La síntesis de progestágenos, promovida por FSH, se redujo en presencia de TNF- α , de manera similar a lo observado para estradiol, y a similares dosis efectivas (resultados no mostrados).

Dado que habíamos encontrado que el TGF- β o la activina A, podían interactuar con TNF- α promoviendo la síntesis de ADN, decidimos examinar si estos factores eran capaces de modular el efecto del TNF- α sobre la producción de estradiol. La activina aumentó la síntesis de estradiol promovida por FSH (como se discutió en el módulo 2 de esta tesis). Sin embargo, la inhibición producida por TNF- α , fue evidente en presencia de este péptido (Figura 5.6). Se encontraron similares resultados con el TGF- β (datos no mostrados).

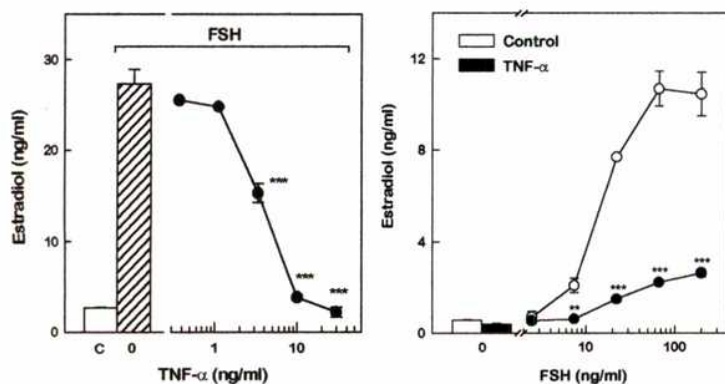


Figura 5.5
Efecto del TNF- α sobre la producción de estrógenos, promovida por FSH
Panel A (izquierda). Células de la granulosa se cultivaron durante 68 hs. con FSH (20 ng/ml) y con concentraciones crecientes de TNF- α .
Panel B (derecha). Los cultivos se realizaron en ausencia o presencia de TNF- α (10 ng/ml) y con cantidades crecientes de FSH.

Los niveles de estradiol se determinaron por RIA. Se agregó androstenediona (0.33 μ M) como sustrato aromatizable a los cultivos. Los valores son media $\pm$ ES. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto de los respectivos controles de FSH sin TNF- α (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

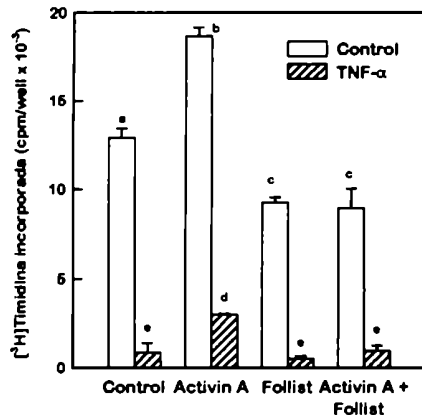


Figura 5.6

Efecto de activina sobre la inhibición por $\text{TNF-}\alpha$ de la síntesis de estradiol

Cultivos de células de granulosa se trataron durante 64 hs. con FSH (20 ng/ml) en condiciones control o con activina A (100 ng/ml), con follistatina (200ng/ml) o una combinación de ambas, en ausencia o presencia de $\text{TNF-}\alpha$ (10 ng/ml). Los valores son medias $\pm$ ES de triplicados de cultivo. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

5.3.2.2. Efectos sobre el metabolismo de esteroides

Con el objeto de estudiar el efecto del $\text{TNF-}\alpha$ sobre el metabolismo de esteroides en células de la granulosa, se realizaron estudios de los metabolitos de pregnenolona. Luego de 68 horas de cultivo, en presencia de los distintos estímulos, se incubó durante 3 hs con pregnenolona tritiada. Los productos del metabolismo se analizaron por cromatografía en capa delgada. Las células fueron preincubadas 3 hs con el inhibidor de la enzima $\text{P}_{450\text{scc}}$, aminoglutetimida (100 μM), para evitar la dilución de marca por pregnenolona producida en forma endógena.

En dicho tiempo, la pregnenolona se metabolizó totalmente a progesterona, acumulándose como 20 α -dihidroprogesterona. En la figura 5.7.A se muestra la fluorografía de la cromatografía y los resultados de la cuantificación de cada uno de los esteroides identificados, en la Tabla 5.1. En la figura 5.8 se observa un esquema

de las distintas rutas de los esteroides en el ovario.

El tratamiento con FSH promueve la formación de progestágenos. En la rata, la progesterona (P_4) se metaboliza principalmente a 20 α -dihidroprogesterona (20 α -DHP). Por otra parte, la FSH suprime la actividad de la 5 α -reductasa, lo que se evidencia como una inhibición de la conversión a 5 α -pregnan-3 α ,20 α -diol (pregnandiol o diol) con respecto a los cultivos en condiciones control (Figura 5.7 y Tabla 5.1). Esta disminución de la conversión a esteroides 5 α -reducidos ha sido propuesta como un cambio en la esteroidogénesis ovárica por gonadotrofinas en la etapa puberal (Payne et al., 1992). Como se muestra en la ruta metabólica en la figura 5.8, la conversión desde 20 α -DHP a pregnandiol involucra a las enzimas 5 α -reductasa y 3 α -HSD (3 α -hidroxi-esteroide deshidrogenasa). Sin embargo, no se observa el 5 α -pregnan-20 α -ol-3-ona como metabolito intermedio, ya que en el tiempo analizado su conversión a pregnandiol fue casi total por acción de la 3 α -HSD.

El $\text{TNF-}\alpha$ aumenta la aparición de pregnandiol sobre el control (54% contra 30% en condiciones basales). Por otra parte, en presencia de FSH, el $\text{TNF-}\alpha$ revierte, casi por completo, la inhibición de la 5 α -reductasa por FSH (Control: 30%, FSH: 6.5%, FSH+ $\text{TNF-}\alpha$: 26%, Tabla 5.1). En estas condiciones (FSH + $\text{TNF-}\alpha$) se observa un perfil de bandas similar al control (Figura 5.7).

La identificación de los metabolitos se realizó por comparación con patrones y mediante la inhibición de las enzimas con el agregado de otro sustrato no marcado. El agregado de testosterona no radioactiva competiría la 5 α -reductasa y el de dihidrotestosterona (DHT), la posterior conversión de los compuestos 5 α -reducidos. En la figura 5.7.C, se observa que la competencia con testosterona (calle 2), disminuyó la cantidad de pregnandiol generado con respecto a las condiciones control (calle 1). La presencia de exceso de DHT incrementó la presencia de 5 α -pregnan-20 α -ol-3-ona (calle 3) por competición de la 3 α -HSD.

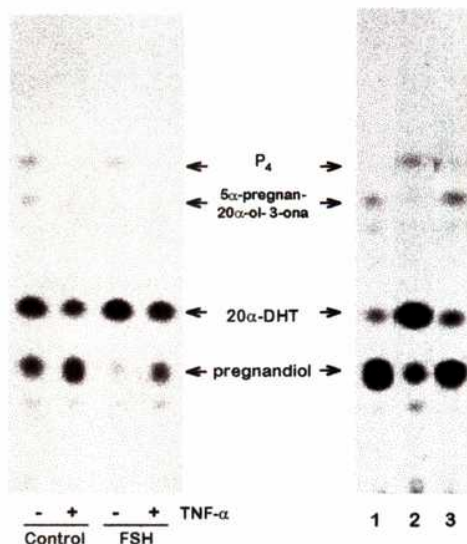


Figura 5.7

Acción del $\text{TNF-}\alpha$ sobre el metabolismo de esteroides

Panel A (izquierda). Células de granulosa se cultivaron en ausencia o presencia de $\text{TNF-}\alpha$ (10 ng/ml) en condiciones control o con FSH (20 ng/ml). Luego de 68 hs, se incubó con $[^3\text{H}]$ -pregnenolona (0.1 $\mu\text{Ci/pocillo}$).

Panel B (derecha). Cultivos tratados con FSH y $\text{TNF-}\alpha$ se incubaron con pregnenolona tritiada en medio control (calle 1) o con el agregado de testosterona (calle 2) o de DHT (calle 3), para competir distintos pasos enzimáticos de conversión. Se realizó preincubación e incubación con aminoglutetimida (100 μM). Los metabolitos, luego de 3 hs de incubación, se separaron por cromatografía en capa delgada y se detectaron por fluorografía.

Tabla 5.1. Efecto del $\text{TNF-}\alpha$ sobre el metabolismo de pregnenolona

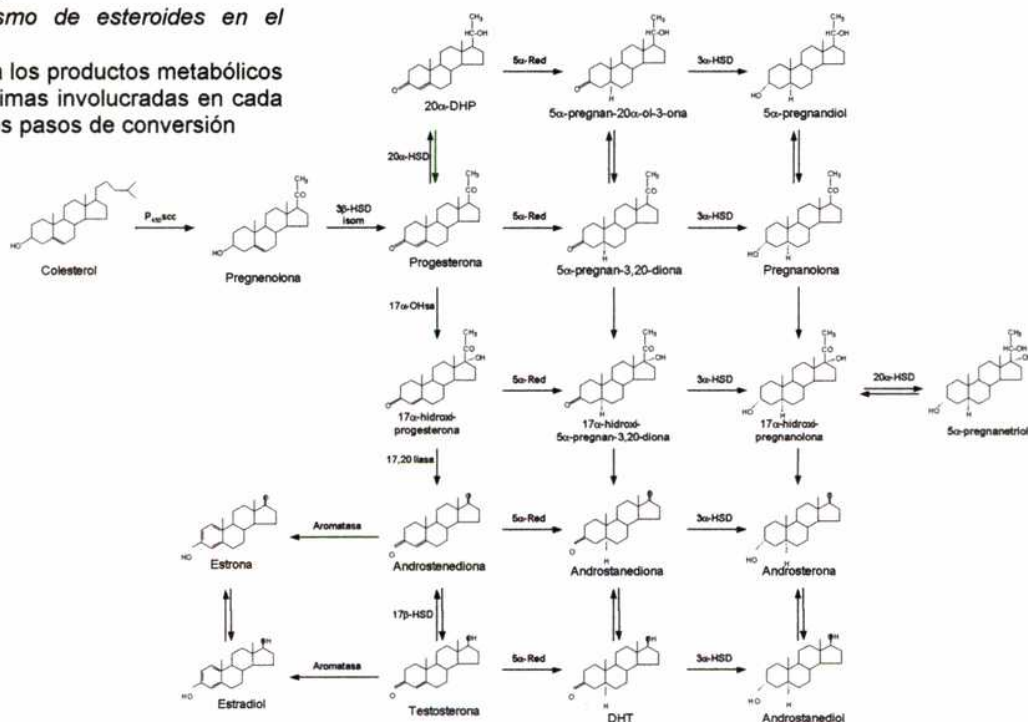
	Control	$\text{TNF-}\alpha$	FSH	FSH+ $\text{TNF-}\alpha$
Progesterona (P_4)	8.4	3.0	7.2	4.8
5 α -pregnan-20 α -ol-3-one	6.4	3.7	0.9	2.0
20 α -dihidroprogesterona (20 α -DHP)	50.6	33.6	82.8	61.1
5 α -pregnan-3 α ,20 α -diol	29.8	54.3	6.5	25.8
Probablemente 5 α -pregnan-3 α ,17 α ,20 α -triol	4.7	5.4	2.6	6.3

Cuantificaron los metabolitos identificados en la cromatografía de la figura 5.7.A. Cada uno de los compuestos se representa como porcentaje de la radioactividad total.

Figura 5.8

Metabolismo de esteroides en el ovario

Esquema los productos metabólicos y las enzimas involucradas en cada uno de los pasos de conversión



Dada la capacidad del $\text{TNF-}\alpha$ de incrementar la conversión hacia esteroides 5α -reducidos, resultaba posible pensar que la inhibición de la producción de estradiol por $\text{TNF-}\alpha$ no se debiera a la supresión de la expresión de la aromatasa, sino a una metabolización de los andrógenos hacia compuestos 5α -reducidos, es decir, no aromatizables (Figura 5.9.C). Se realizó un análisis de compuestos generados a partir de testosterona. El tratamiento con FSH incrementó la formación de androstenediona (Δ_4) y de estradiol, con una inhibición en la acumulación de androstanodiol (Figura 5.9.A y Tabla 5.2). Por otra parte, el tratamiento con $\text{TNF-}\alpha$ revirtió la inhibición de la 5α -reductasa originada por FSH, con el consecuente

aumento de la acumulación del androstanodiol. Este tratamiento revirtió por completo la estimulación de la síntesis de estrógenos. La confirmación de la identidad de los metabolitos se realizó por competición de la 5α -reductasa por un exceso de 20α -DHP (Figura 5.9.B y Tabla 5.2), resultando una disminución o desaparición de DHT, androstanodiol y androsterona. Es importante señalar que, aún en esta situación, en la cual la 5α -reducción de andrógenos se encontraba bloqueada, el $\text{TNF-}\alpha$ inhibió la biosíntesis de estrógenos estimulada por FSH. Se puede concluir entonces, que el $\text{TNF-}\alpha$ inhibe la activación de la aromatasa por gonadotrofinas.

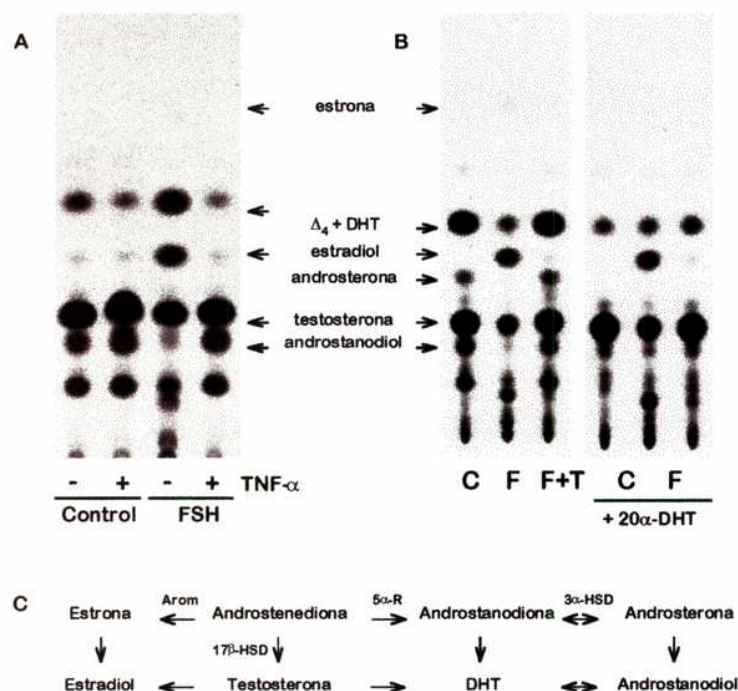


Figura 5.9
Acción del $\text{TNF-}\alpha$ sobre el metabolismo de andrógenos

Panel A. Células de granulosa se cultivaron en ausencia o presencia de $\text{TNF-}\alpha$ (10 ng/ml) en condiciones control o con FSH (20 ng/ml). Luego de 68 hs, se incubó con $[^3\text{H}]$ -testosterona

Panel B. La incubación con testosterona tritiada se realizó en ausencia o presencia de 20α -DHP para competir la 5α -reducción del trazador.

Se realizó preincubación e incubación con aminoglutetimida (100 μM). Los metabolitos, luego de 3 hs de incubación, se separaron por cromatografía en capa delgada y se detectaron por fluorografía.

Panel C. Resumen del metabolismo de andrógenos y las enzimas involucradas.

Tabla 5.2. Efecto del $\text{TNF-}\alpha$ sobre el metabolismo de andrógenos

A. Cuantificación de la cromatografía de figura 5.9.A.				
	Control	$\text{TNF-}\alpha$	FSH	FSH+ $\text{TNF-}\alpha$
Androstenediona	22	13	26	11
Estradiol	2.5	2.5	20	2.1
Androstanodiol	17	24	5.5	23

B.	20α -DHP	
	-	+
Androstenediona + DHT	27	14
Estradiol	0.1	0.1
Androsterona	11	0.5
Androstanodiol	15	6.5

B. Cuantificación de la cromatografía de la figura 5.9.B. Los cultivos se trataron con FSH y $\text{TNF-}\alpha$ y se incubó con el trazador en ausencia o presencia de 20α -DHP (calles 3 y 6). Cada uno de los compuestos se representa como porcentaje de la radioactividad total recuperada.

5.3.2.3. Controles de viabilidad celular

Dada la potencial actividad promotora de muerte celular del TNF- α , las acciones inhibitorias podrían ser el reflejo de efectos adversos de este compuesto sobre la función de células de granulosa. Sin embargo, no parece ser este el caso. En primer término, el TNF- α ejerció un efecto estimulador en la degradación de C21 esteroides, por incremento en la actividad 5 α -reductasa. En segundo término, los cambios morfológico en los cultivos (no mostrados) no correspondieron a patrones característicos de apoptosis. En tercer lugar, el TNF- α incrementó la biosíntesis de proteínas.

Luego de 3 días de cultivo con TNF- α , se incubó con [35 S]-metionina y se analizó la biosíntesis de proteínas, por incorporación del aminoácido marcado, en los sobrenadantes y en los extractos celulares. La síntesis de proteínas celulares (Tabla 5.3) mostró un aumento significativo (30-80%) con TNF- α (10ng/ml) en los distintos tratamientos examinados, mientras que el análisis de las proteínas secretadas, presentó similares incrementos en la radioactividad TCA precipitable. La evaluación del perfil de proteínas, no mostró la aparición diferencial de ninguna banda en SDS-PAGE de una dimensión y posterior autoradiografía (Figura 5. 10).

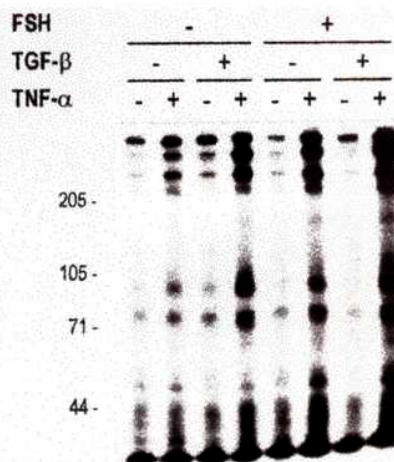


Figura 5.11

Patrón de proteínas secretadas

Los proteínas de los sobrenadantes de los cultivos tratados según se indica e incubados con [35 S]-metionina se analizaron por SDS-PAGE y fluorografía

Tabla 5.3. Efecto de TNF- α sobre la síntesis total de proteínas

Tratamiento	TNF- α	Incorporación de [35 S]-metionina (cpm x 10 $^{-3}$)	
		Proteínas secretadas	Proteínas celulares
Control	-	1.4 $\pm$ 0.1	14.0 $\pm$ 1.5
	+	2.3 $\pm$ 0.2	20.4 $\pm$ 1.7
TGF- β	-	1.7 $\pm$ 0.4	15.1 $\pm$ 0.7
	+	1.6 $\pm$ 0.3	11.4 $\pm$ 1.4
FSH	-	1.4 $\pm$ 0.2	15.8 $\pm$ 0.3
	+	2.0 $\pm$ 0.2	22.5 $\pm$ 1.2
FSH + TGF- β	-	1.6 $\pm$ 0.1	10.4 $\pm$ 1.3
	+	2.6 $\pm$ 0.3	24.2 $\pm$ 6.5

Las células de granulosa se cultivaron durante 68 hs en ausencia o presencia de TNF- α en condiciones basales, con TGF- β (3 ng/ml), FSH (20 ng/ml) o la combinación de FSH y TGF- β (en las mismas concentraciones). Al cabo de este tiempo, se cambió el sobrenadante por medio conteniendo [35 S]-metionina y se incubó durante 2.5 hs. Se analizó la radioactividad en el material precipitable con TCA en alícuotas de los medio de incubación (proteínas secretadas) y de los extractos celulares. Los valores son medias $\pm$ ES de triplicados de cultivos.

5.3.3. Acción antigonadotrófica del $\text{TNF-}\alpha$

Los efectos del $\text{TNF-}\alpha$ sobre la esteroidogénesis, sobre el metabolismo de esteroides, así como sobre el crecimiento celular sugieren que esta citoquina bloquea las acciones inducidas por FSH. Dado que la señalización central de la gonadotropina se efectúa a través del sistema del AMPc, se analizó si los niveles del nucleótido se modificaban cuando se trataba a las células con $\text{TNF-}\alpha$. Mientras que el AMPc intracelular, a la hora de la estimulación, no se vió significativamente afectado por $\text{TNF-}\alpha$ (datos no mostrados), el aumento por FSH de las concentraciones de AMPc extracelular a las 48 hs., fue inhibido por $\text{TNF-}\alpha$ (75 % de inhibición, Tabla 5.4).

Tabla 5.4. Efecto del $\text{TNF-}\alpha$ sobre la acumulación de AMPc estimulada por FSH

Tratamiento	AMPc extracelular (pmol/ml)
Control	0.37 ± 0.04^a
FSH	17.6 ± 1.0^b
FSH + $\text{TNF-}\alpha$	4.8 ± 0.2^c

Las células de granulosa fueron cultivadas en ausencia o presencia de $\text{TNF-}\alpha$ (10 ng/ml), en condiciones control (Control) o con el agregado de FSH (20 ng/ml) durante 48 hs. El medio de cultivo se recolectó y determinó el contenido de AMPc. Los valores son medias $\pm$ ES de triplicados de cultivos (a,b,c: $p < 0.001$)

Se analizó, si las acciones inhibitorias del $\text{TNF-}\alpha$ sobre la producción de estradiol estimulada por FSH, se manifestaban cuando se activaba este mecanismo utilizando un análogo de AMPc como el dibutilil AMPc (Bt_2AMPc). Sin embargo, en estas condiciones, la citoquina no sólo no fue inhibitoria, sino que en presencia de bajas concentraciones de AMPc (0.3 mM), su acción incrementó los niveles de estradiol (Figura 5.12.A).

Se decidió examinar entonces, si el bloqueo de la acción de FSH sobre el crecimiento de células de granulosa, podía también explicarse debido a efectos próximos a la generación de AMPc.

Sin embargo, cuando las células de la granulosa se estimularon con Bt_2AMPc , el resultado observado para el crecimiento celular fue completamente distinto a lo encontrado para la regulación de la biosíntesis de estradiol. La acción mitogénica de la combinación de bajas dosis del análogo de AMPc (0.2 mM) y $\text{TGF-}\beta$ (3 ng/ml) fue inhibida por $\text{TNF-}\alpha$ en igual medida que el resultado del tratamiento con FSH y $\text{TGF-}\beta$ (Figura 5.12.B). Por lo tanto, la inhibición de la síntesis de ADN por la citoquina, es debida a efectos posteriores o independientes del sistema de generación e hidrólisis de AMPc.

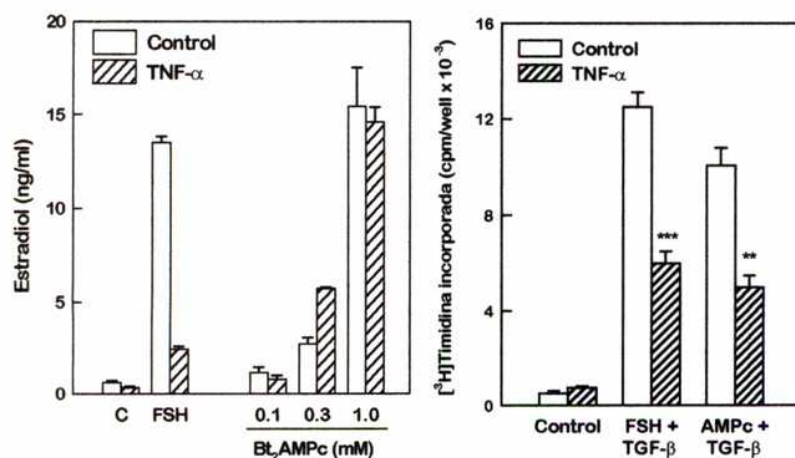


Figura 5.12
Efecto del $\text{TNF-}\alpha$ sobre la producción de estradiol y síntesis de ADN estimulada por AMPc

Panel A (izquierda): Las células de la granulosa se cultivaron en medio control (C), con FSH (20 ng/ml) o diferentes concentraciones de Bt_2AMPc (0.1, 0.3 o 1 mM), en ausencia o presencia de $\text{TNF-}\alpha$ (10 ng/ml). Se determinaron los niveles de estradiol en los medios de cultivo a las 72 hs. con androstenediona.

Panel B (derecha): Las células de granulosa de rata se cultivaron sin agregados (Control), con FSH y $\text{TGF-}\beta$ (20 ng/ml y 3 ng/ml, respectivamente), o con Bt_2AMPc y $\text{TGF-}\beta$ (0.2 mM y 3 ng/ml, respectivamente). La síntesis de ADN se evaluó entre las 24 y las 48 hs de cultivo. Los resultados son medias $\pm$ ES de triplicados (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparado con los respectivos cultivos control).

Recientemente, se ha descrito en varios sistemas celulares que al menos, algunas de las acciones de TNF- α podrían atribuirse a la activación de la enzima esfingomielinasa y su consecuente generación de ceramida. Este compuesto actuaría como mediador intracelular de la citoquina (Dressler et al., 1992; Wiegmann et al., 1994; Kolesnick, Golde, 1994)

Si éste fuera el caso, el aumento de los niveles de ceramida en los cultivos debería reproducir los efectos de TNF- α . Con este objetivo, se emplearon dos estrategias: el agregado de un análogo permeable, la N-acetil-esfingosina (C2-ceramida), o el tratamiento con la enzima esfingomielinasa (SMAse, de *Bacillus Subtilis*), que a partir de esfingolipidos de membrana, genera ceramida que es capaz de entrar a la célula. El efecto de estos tratamientos sobre la incorporación de timidina, en presencia de distintos estímulos, se muestran en la figura 5.13. En todos las condiciones ensayadas, el efecto encontrado fue siempre inhibitorio sobre la síntesis de ADN. La ceramida no reprodujo totalmente la acción del TNF- α : en presencia de TGF- β también resultó inhibitorio, mientras que el TNF- α interactuó con este factor de crecimiento. Si bien en la figura 5.13 se muestran concentraciones únicas de C2-ceramida y esfingomielinasa (1 μ M y 0.03 U/ml), resultados similares se obtuvieron utilizando otras dosis (10 a 0.1 μ M y 0.1 a 10⁻⁵ U/ml respectivamente).

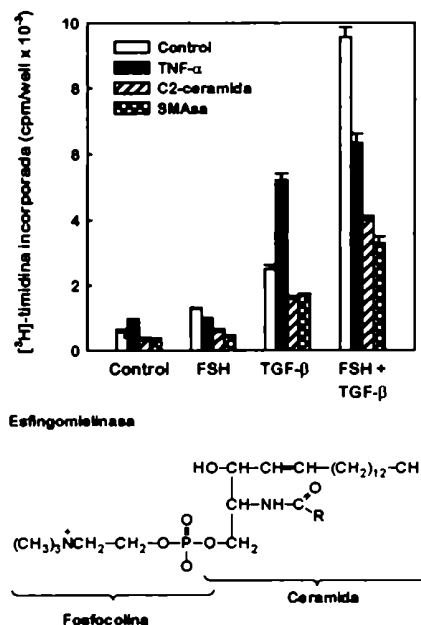


Figura 5.13

Acciones comparativas de TNF- α y C2-ceramida sobre la síntesis de ADN

Las células de la granulosa se cultivaron en medio control, con TNF- α (10 ng/ml), C2-ceramida (1 μ M) o esfingomielinasa (SMAse, 0.03 U/ml), en condiciones basales o tratadas con FSH (20 ng/ml), TGF- β (3 ng/ml) o FSH y TGF- β (20 y 3 ng/ml, respectivamente). La incorporación de ³H-timidina se realizó durante 24 hs, comenzando a las 24 hs de cultivo. Los resultados son medias $\pm$ ES de determinaciones por triplicado.

5.4. *Discusión*

Utilizando un sistema definido de cultivo para células de la granulosa, se encontró que, además de las acciones sobre el desarrollo folicular previamente reportadas, el TNF- α regula la síntesis de ADN.

Los efectos de TNF- α sobre la síntesis de ADN, en células de granulosa varían de inhibitorios a estimulatorios, dependiendo de la co-estimulación con hormonas u otros factores de acción local. El TNF- α estimuló la síntesis de ADN en condiciones basales y amplificó la acción de TGF- β . Sin embargo, el sinergismo entre TGF- β y FSH fue bloqueado por la citoquina. Por otra parte, el TNF- α también inhibió la interacción entre FSH y estradiol y atenuó la amplificación por FSH en presencia de activina. Estos resultados sugieren que la acción inhibitoria del TNF- α se debe a un bloqueo o a una disminución en la respuesta a FSH.

En presencia de TGF- β , FSH aumentó la síntesis de ADN de manera bifásica, requiriéndose bajas concentraciones de FSH para evidenciar su acción mitogénica. Sin embargo, en presencia de TNF- α y TGF- β , concentraciones crecientes de FSH no fueron capaces de promover una estimulación adicional a la alcanzada por ambas citoquinas. Por lo tanto, el efecto inhibitorio del TNF- α se debería, principalmente, a una acción antigonadotrófica. Esta acción dual, podría indicar distintas funciones regulatorias en distintos momentos del desarrollo folicular, dependiendo de los factores que están ejerciendo efectos biológicos en los diferentes estadios.

Varios trabajos han descrito la acción inhibitoria de TNF- α sobre la esteroidogénesis promovida por gonadotrofinas (Adashi et al., 1990; Darbon et al., 1989; Adashi et al., 1989). En nuestras condiciones de cultivo de células de granulosa inmaduras, el TNF- α inhibió la biosíntesis de estradiol, al igual que la de progestágenos. El TNF- α disminuyó los niveles de AMPc acumulados a las 48 hs. La

utilización de un análogo de AMPc parece disociar los efectos del TNF- α sobre la síntesis de estradiol y sobre la proliferación celular. Cuando la estimulación de la síntesis de estradiol se realiza usando dibutiril-AMPc, el TNF- α no es capaz de inhibir esta estimulación. Este resulta indica que el mecanismo responsable de esta acción antigonadotrófica, sería la disminución en los niveles intracelulares de AMPc, principal vía de señalización intracelular de la hormona. Sin embargo un sitio de acción diferente parece estar involucrado en la inhibición del crecimiento de las células de la granulosa dependiente de FSH. El TNF- α inhibe también la estimulación cuando se utiliza dibutiril-AMPc, sugiriendo que la citoquina, además de regular la síntesis o hidrólisis de AMPc estimulada por la hormona, también actúa más adelante en la serie de señales intracelulares (Figura 5.14, panel B).

Se ha demostrado que la enzima esfingomielinasa, que cataliza la ruptura de esfingomielina para generar ceramida, es un blanco de acción de TNF- α y se ha indicado a este compuesto como mediador en la vía de señalización de TNF- α (Dressler et al., 1992; Michell, Wakelam, 1994; Obeid et al., 1993). Sin embargo, estudios más recientes, indicarían que el incremento de ceramida durante la activación por TNF- α sería uno de los cambios que acompañan su efecto, más que un mediador intracelular de su acción (Nagata, 1997).

A nivel ovárico, se ha demostrado un aumento en la generación de ceramida en respuesta al tratamiento con TNF- α y se ha atribuido a la ceramida, un papel mediador en la inhibición de la aromatasa (Santana et al., 1995) y en la inducción de apoptosis por la citoquina (Witty et al., 1996; Kaipia et al., 1996). Sin embargo, para otros autores, la acción de TNF- α no involucra a este compuesto como mediador (Machelon et al., 1997). En los resultados presentados, el análogo permeable de ceramida, N-acetil-esfingosina o C2-ceramida, al igual que TNF- α , inhibe la síntesis de ADN en células

de granulosa tratadas con FSH. La interacción de $\text{TNF-}\alpha$ y $\text{TGF-}\beta$ no es reproducida por este análogo, indicando, que si la ceramida esta involucrada, no es el único mediador de la acción del $\text{TNF-}\alpha$.

El metabolismo de esteroides en células de la granulosa también se encontró influenciado por $\text{TNF-}\alpha$. El análisis de los compuestos generados a partir de pregnenolona en células de granulosa de rata, demostró que el producto principal del metabolismo estimulado con FSH es la 20α -DHP (existen diferencias entre especies) (Goldring, Orly, 1985). La gonadotropina inhibe la actividad de la 5α -reductasa, visualizado como una disminución en la acumulación de pregnandiol. La inhibición de esta enzima por gonadotropinas ha sido señalada como la responsable del cambio en el tipo de esteroidogénesis que ocurre en la pubertad (Adashi et al., 1989; Payne et al., 1992). El $\text{TNF-}\alpha$ incrementó la acumulación de 5α -pregnandiol y antagonizó la inhibición de la 5α -reducción por FSH.

Por otra parte, la identificación de los compuestos generados a partir de testosterona, indicó, que el $\text{TNF-}\alpha$ actúa a dos niveles inhibiendo la síntesis de estradiol: antagoniza la acción de FSH en la inducción de la aromatasa e induce la metabolización de andrógenos hacia productos 5α -reducidos, que no son aromatizables. La inducción de la 5α -reductasa por $\text{TNF-}\alpha$ parece ser un efecto específico de este factor, ya que no se han observado modulaciones de esta enzima por otros factores de crecimiento (datos no mostrados).

Un esquema de las acciones de $\text{TNF-}\alpha$ sobre la síntesis de estradiol y el metabolismo de esteroides se muestra en la Figura 5.14, panel A.

La regulación de la esteroidogénesis por el $\text{TNF-}\alpha$ no es una característica exclusiva de las células de granulosa inmaduras, ya que esta citoquina modula la producción de progesterona estimulada por LH en células de granulosa diferenciadas, parcialmente luteinizadas (Adashi et al., 1990). Asimismo, la biosíntesis de andrógenos promovida por LH en las células tecales es inhibida por $\text{TNF-}\alpha$ (Zachow et al., 1993; Andreani et al.,

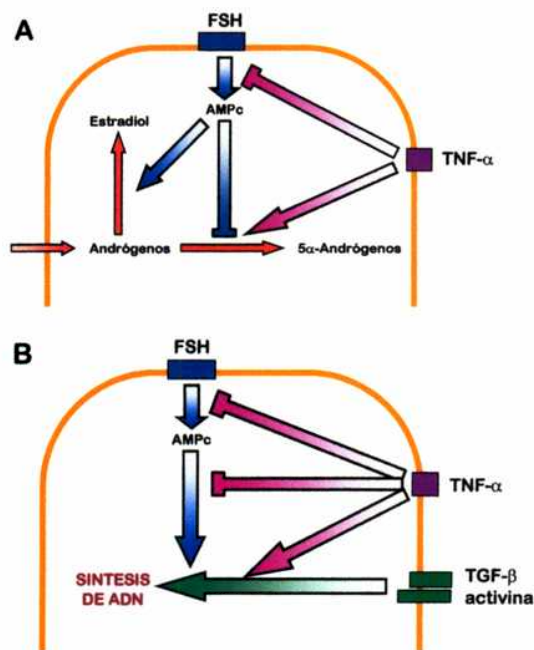


Figura 5.14

Acciones de $\text{TNF-}\alpha$ sobre la función de las células de granulosa

A. Resumen sobre estradiol y metabolismo

B. Resumen sobre síntesis ADN

1991). Se ha demostrado que el $\text{TNF-}\alpha$ modula la acción de las hormonas tróficas sobre la esteroidogénesis en otros tejidos endocrinos: adrenal, afectando la síntesis de mineralo y glucocorticoides estimulada por ACTH (Jäättelä et al., 1991; Nussdorfer, Mazzocchi, 1998); testículo, células de Leydig, inhibiendo la síntesis de testosterona promovida por LH (Xiong, Hales, 1993; Mauduit et al., 1998) y células Sertoli reduciendo la actividad de aromatasa (Mauduit et al., 1993).

La presencia de $\text{TNF-}\alpha$ en el ovario, ha sido analizada por una diversidad de métodos experimentales. El origen celular de esta citoquina, a nivel local, podría ser desde células del sistema inmune hasta el propio ovocito dentro del folículo.

Se ha detectado la presencia de $\text{TNF-}\alpha$ en ovocitos de diversas especies (Naz et al., 1997; Marcinkiewicz et al., 1994; Chen et al., 1993) y se ha propuesto que el $\text{TNF-}\alpha$ proveniente del ovocito, regularía la función de las células de la granulosa durante el desarrollo folicular. Asimismo, se ha

detectado actividad biológica tipo TNF- α en extractos de ovocitos, utilizando el ensayo de las células L929 (Marcinkiewicz et al., 1994). Sin embargo, estos resultados, deben tomarse como preliminares, ya que no se demostró la secreción por el ovocito sino en extractos y la identidad de TNF- α no fue corroborada por neutralización de la actividad (por ejemplo por depleción con anticuerpos). Hemos descrito que el crecimiento de células de granulosa está modulado por factores derivados del ovocito (ver capítulo correspondiente de esta tesis). Sin embargo, esta actividad no puede ser asignada a TNF- α , ya que los efectos del co-cultivo de células de granulosa con ovocitos también se manifiestan en presencia de concentraciones efectivas máximas de la citoquina.

Los macrófagos constituyen un importante componente celular del compartimiento ovárico intersticial (Hume et al., 1984). Se ubican en el estroma ovárico, cerca de los capilares perifoliculares, pero se sabe poco sobre la función de su presencia, aparentemente constante, en el ovario. Se supone, que los macrófagos intersticiales, podrían ejercer efectos paracrin, constituyéndose en moduladores "*in situ*" de la función ovárica. Esta acción podría ejercerse a través de la secreción local de citoquinas regulatorias (Adashi, 1990), e inclusive, a través de modulación yuxtacrina, es decir célula-célula, ya que el TNF- α se encuentra también asociado a membrana de macrófagos.

Por otra parte, el TNF- α podría ejercer acciones en el ovario en situaciones patológicas, dado que es liberado por macrófagos luego de la exposición a endotoxinas bacterianas y se ha observado una reducción de la función ovárica en la sepsis. En las células de granulosa de rata, la síntesis de progesterona, inducida por gonadotrofinas, es inhibida marcadamente por el co-cultivo con macrófagos y en mayor medida, cuando los macrófagos fueron preactivados con lipopolisacáridos (LPS). Asimismo, animales tratados con LPS in vivo, mostraron una disminución en la respuesta a hormonas in vitro (Shakil, Whitehead, 1994). Los efectos inhibitorios

por endotoxinas sobre la esteroidogénesis ovárica y del desarrollo folicular, son mediados por TNF- α , y también por acciones directas de LPS sobre las células ováricas (Terranova, Rice, 1997).

Las citoquinas de la familia del TNF, como el TNF- α y el ligando de Fas (FasL), por unión a sus receptores de membrana son capaces de inducir apoptosis en distintos tipos celulares. Los receptores de estos factores, guardan también similitud estructural como los dos receptores de TNF- α (TNFR1 y TNFR2), Fas (también conocido como APO-1 o CD95), el receptor de NGF (p75) y otros. El TNF- α induce apoptosis y activa el factor de transcripción NF- κ B y la proliferación de timocitos. Aunque tanto el TNFR1 como el TNFR2 pueden transducir señales para la apoptosis y la activación de NF- κ B, es el TNFR1 el responsable de estas señales en la gran mayoría de los casos, mientras que es el TNFR2 quien media las señales proliferativas inducidas por TNF- α (Vandenabeele et al., 1995). La región citoplasmática de Fas y TNFR1 contiene un dominio de muerte conservado. Este es un componente esencial de las vías de señal que desencadenan la apoptosis, por activación de las cascadas de caspasas (Ashkenazi, Dixit, 1998; Nagata, 1997). Las señales originadas por Fas, se restringen exclusivamente a la apoptosis, mientras que las generadas por TNFR1, son también capaces de activar NF- κ B. La expresión de proteínas que inhiben la apoptosis, probablemente pertenecientes a la familia de Bcl-2, son reguladas positivamente este factor de transcripción (Nagata, 1997; Van Antwerp et al., 1998).

Dado que el proceso degenerativo de la atresia folicular ocurre por apoptosis de las células de granulosa, se ha asociado la acción de Fas (Sakamaki et al., 1997) y TNF- α (Kaipia et al., 1996) con este evento. Utilizando un sistema in vitro de cultivo de folículos de rata, la inhibición de la apoptosis espontánea por FSH es revertida por TNF- α y también por análogos de ceramida (Kaipia et al., 1996), sugiriendo un posible papel del TNF- α en la regulación de la atresia.

La posible relación causal entre la modulación de la síntesis de ADN, demostrada en el presente trabajo y la inducción de la muerte celular por apoptosis no puede establecerse claramente. Un conjunto de evidencias, nos indican que las acciones del TNF- α analizadas no son consecuencia de un efecto promotor de la muerte celular. En primer lugar, a diferencia de los experimentos con folículos en cultivo, en las condiciones usadas en este trabajo (cultivos de células de granulosa inmaduras), hemos observado una baja proporción en la fragmentación espontánea del ADN y si bien el TNF- α incrementó el patrón de degradación, sólo constituiría una muy baja proporción de células

En segundo lugar, la evaluación morfológica de los cultivos, a lo largo de 3 días, no reveló la aparición de células picnóticas características de la apoptosis. Por el contrario, el TNF- α mejoró la adhesión al sustrato, sin disminución de la viabilidad.

En tercer lugar, luego de 72 hs. de cultivo, se encontró un incremento en la tasa de síntesis total de proteínas, lo que indicaría la conservación de un fenotipo secretorio, característico de células de granulosa inmaduras.

Por último, el TNF- α ejerció un efecto estimulador en la metabolización de esteroides, por incremento en la actividad 5 α -reductasa (ensayado en el tercer día luego del tratamiento).

También es posible que el TNF- α desencadene apoptosis por un mecanismo distinto o bien, que su acción se encuentre alterada por otros factores actuando sobre la célula. En este sentido, se ha demostrado en algunos tipos celulares, que el TGF- β o la activina son capaces de prevenir la muerte celular inducida por TNF- α (Chang, 1995; Arsura et al., 1996; Kuo et al., 1997).

Los datos presentados indican que, además de la inhibición de la diferenciación celular, el TNF- α es capaz de regular la proliferación de células de granulosa inmaduras.

Estas observaciones aportan evidencias adicionales sobre el papel fisiológico que juega el TNF- α como modulador paracrino o autocrino del desarrollo folicular, pudiendo, asimismo, ser relevante en las alteraciones de la función ovárica, durante procesos fisiopatológicos, como la inflamación o la infección.

6. Módulo IV

***Factores derivados del ovocito
regulan el crecimiento de células
de la granulosa***

6.1. Introducción

6.1.1. Comunicación entre el ovocito y las células somáticas

En el desarrollo del folículo ovárico existe una estrecha coordinación entre el crecimiento y la maduración del ovocito y la proliferación y diferenciación de las células somáticas que lo rodean.

El crecimiento del ovocito está estimulado por el ligando de c-kit, que es producido por las células de la granulosa (Packer et al., 1994; Eppig et al., 1996). Este tipo de señales intrafoliculares de la granulosa al ovocito, como las mediadas por el ligando de kit (Steel factor) y el receptor c-kit, son críticas para el desarrollo del folículo preantral. En ratones con mutaciones espontáneas en el locus Steel, que permiten el desarrollo ovárico prenatal, el crecimiento folicular se arresta en estadios tempranos (Huang et al., 1993; Kuroda et al., 1988). Por otra parte, la administración de anticuerpos contra el receptor c-kit también inhiben el crecimiento del folículo (Yoshida et al., 1999).

Posteriormente, el mantenimiento del ovocito en el estadio dictyate de la primera profase meiótica, depende de un complejo balance entre factores intracelulares como el AMPc, purinas y calmodulina y comunicaciones intercelulares con las células del cumulus (Eppig, 1993). Se ha demostrado, que las células de la granulosa producen inhibidores y activadores de la activación meiótica del ovocito, cuya identidad no se ha determinado (Guoliang et al., 1994; Ismail et al., 1996). Las comunicaciones a través de uniones "gap" entre el ovocito y las células de la granulosa, serían importantes en fases más avanzadas del desarrollo folicular. Los ratones deficientes en conexina-37, contienen ovocitos que no son capaces de reanudar la meiosis y presentan fallas en la ovulación (Simon et al., 1997)

Por el otro lado, estudios iniciales de El-Foury et al. (1970) mostraron que la remoción del ovocito de folículos de Graaf en ovarios de conejo induce la luteinización

prematura de las células de la granulosa. Se han acumulado evidencias que fundamentan la idea de que el ovocito juega un papel activo en la regulación del desarrollo folicular.

6.1.2. Expansión del cumulus

En diversas especies, se ha demostrado que el ovocito regula la función de las células del cumulus (Vanderhyden, 1993; Buccione et al., 1990; Salustri et al., 1990). La expansión del cumulus *in vitro* es inducida por FSH mediante mecanismos dependientes de AMPc. Sin embargo, la remoción del ovocito de los complejos cumulus-ovocito (COC), inhibe la capacidad de expansión y la síntesis de ácido hialurónico por parte de las células del cumulus en respuesta al estímulo con FSH o AMPc. Estos resultados indican que el ovocito produce un factor específico que permite la expansión del cumulus. Aunque la expansión de las células del cumulus de porcinos o bovinos, no dependen de la presencia de factores derivados del ovocito, se ha establecido la existencia de los mismos usando sistemas heterólogos (Vanderhyden, 1993; Singh et al., 1993; Ralph et al., 1995).

El ovocito produce compuestos que afectan también otros parámetros de la diferenciación de las células de granulosa vecinas. La remoción del ovocito de los complejos cumulus-ovocito disminuye la producción de estradiol y aumenta la síntesis de progesterona (Vanderhyden, Tonary, 1995; Vanderhyden et al., 1993). Además, se han caracterizado, de manera preliminar, factores del ovocito de alto peso molecular que inhiben la producción de activador de plasminógeno estimulada por FSH, en células de granulosa (Canipari et al., 1995).

6.1.3. Regulación de la foliculogénesis por el ovocito

Hay, asimismo, evidencias experimentales de efectos estimulatorios del ovocito en la proliferación de células de la granulosa y en

el mantenimiento de la organización folicular. La síntesis de ADN es mayor en células más próximas al ovocito (Hirshfield, 1986) y se han demostrado acciones mitogénicas de factores secretados por ovocitos de ratón sobre células de granulosa de folículos preantrales y antrales (Vanderhyden et al., 1992).

Hasta el presente, ninguno de estos factores ha sido identificado, si bien, un estudio reciente ha demostrado que el factor de crecimiento/diferenciación-9 (miembro de la superfamilia del TGF- β) se expresa específicamente en el ovocito (Dong et al., 1996) y es requerido en las etapas

tempranas de la foliculogénesis (McGrath et al., 1995).

6.2. Objetivo

El objetivo de este trabajo fue determinar si el ovocito produce factores capaces de regular la proliferación de células somáticas ováricas, participando de forma activa en la regulación del desarrollo del folículo (Figura 6.1).

6.3. Resultados

6.3.1. Efecto del co-cultivo con ovocitos sobre la síntesis de ADN en células de granulosa

Considerando que los ovocitos bovinos son de aislamiento relativamente sencillo y que se puede controlar *in vitro* la reanudación de la meiosis de manera efectiva, se utilizó un modelo de cocultivo heterólogo: ovocitos bovinos con células de granulosa de rata, para estudiar la interacción entre FSH y factores derivados del ovocito en la regulación de la proliferación de células de la granulosa de rata.

Las células de granulosa fueron co-cultivadas con ovocitos inmaduros, clasificados morfológicamente como de buena calidad. Como se muestra en la Figura 6.2, la presencia de ovocitos estimuló la síntesis de ADN de manera dependiente de su número.

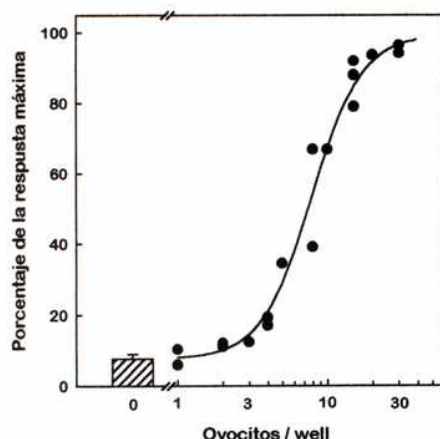


Figura 6.2. Efecto de ovocitos bovinos sobre la síntesis de ADN en células de la granulosa de rata.

Las células fueron cocultivadas en presencia de un número creciente de ovocitos bovinos. Los resultados se representan como porcentaje de las respuestas máximas de tres experimentos independientes.

Con el objeto de dar validez al método de incorporación de timidina debido a este estímulo y para descartar posibles efectos sobre la tasa de entrada del nucleótido, se determinó el contenido de ADN en los cultivos (Tabla 6.1)

Tabla 6.1
Efecto del co-cultivo con ovocitos sobre el contenido de ADN.

Tratamiento	Contenido ADN (µg/well)
Control	0.96 ± 0.04
FSH	1.14 ± 0.03
Ovocito	1.45 ± 0.09 **
FSH + Ovocito	1.59 ± 0.05 **

Las células de granulosa se co-cultivaron con ovocitos (15/pocillo) en ausencia o presencia de FSH (20ng/ml). A las 72 hs de cultivo, se determinó el contenido de ADN en respuesta a los distintos tratamientos. Los asteriscos representan diferencias significativas con el Control ($p < 0.001$). No se encontraron diferencias significativas entre los cultivos Control (72 hs) y el contenido inicial de ADN (hora 0, 1.09 ± 0.08 µg/well).

6.3.2. Especificidad del tipo celular

Para analizar si el efecto estimulador de la síntesis de ADN resultaba ser específico del tipo celular, se analizó el efecto del co-cultivo sobre distintos tipos celulares. El co-cultivo con ovocitos no modificó la incorporación de timidina en otros tipos celulares no relacionados, tales como fibroblastos Swiss 3T3 o células epiteliales CCL-64. Sin embargo, sí lo hizo sobre la línea de células de la granulosa bovina BGC-1 y sobre cultivos primarios de granulosa bovina (Tabla 6.2). Por lo tanto, la actividad derivada del ovocito parece presentar cierta especificidad de tipo celular, ya que produjo efecto sobre células de la granulosa de distintos orígenes y a su vez no lo tuvo sobre otros tipos celulares ensayados.

Tabla 6.2
Efecto específico de ovocitos sobre la incorporación de timidina.

Tipo celular	Tratamiento	Incorporación de ^3H -timidina (cpm/well)
BGC-1	Control	2370 $\pm$ 390
	Ovocito (15/well)	3760 $\pm$ 60 *
	EGF	5547 $\pm$ 130 **
	EGF + IGF-I	6630 $\pm$ 180 **
Cultivo primario de células de la granulosa bovinas	Control	1245 $\pm$ 160
	Ovocito (15/well)	2245 $\pm$ 90 *
	IGF-I	4875 $\pm$ 685 **
CCL-64	Control	4000 $\pm$ 450
	Ovocito (20/well)	4010 $\pm$ 100
	TGF- β (0.1ng/ml)	3280 $\pm$ 160 *
	TGF- β (0.3ng/ml)	2020 $\pm$ 300 **
	TGF- β (1 ng/ml)	800 $\pm$ 60 **
Swiss 3T3	Control	6060 $\pm$ 790
	Ovocito (20/well)	5840 $\pm$ 700
	EGF	22920 $\pm$ 750 **
	PG F2 α	56700 $\pm$ 3900 **

Los distintos tipos celulares fueron cultivados en presencia o ausencia de ovocitos en las condiciones que se detallan en la sección Materiales y Métodos. Se utilizaron estímulos específicos para evaluar la respuesta celular: factor de crecimiento epidérmico (EGF, 10ng/ml), factor de crecimiento tipo insulina (IGF-I, 100ng/ml), TGF- β (0.1-1 ng/ml) y prostaglandina F2 α (PG F2 α , 400 ng/ml). Los valores son medias $\pm$ ES de cultivos realizados por triplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas comparadas con los respectivos controles (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

6.3.3. Efecto de FSH sobre la acción del co-cultivo

Se analizó la modulación por gonadotrofinas de la estimulación de la síntesis de ADN promovida por los ovocitos. Con este objetivo, se cultivaron células de granulosa con concentraciones crecientes de FSH, en ausencia o presencia de ovocitos (15 ovocitos/pocillo). En el panel A de la Figura 6.3 se muestra que FSH produjo una amplificación bifásica sobre la incorporación de timidina, con efectos máximos (1.5 veces de aumento) entre 20 y 60 ng/ml. Esta acción amplificatoria de FSH pudo reproducirse por el agregado de un análogo de AMPc, dibutilil-AMPc (Bt₂cAMP, 0.2mM) (Figura 6.3, panel B).

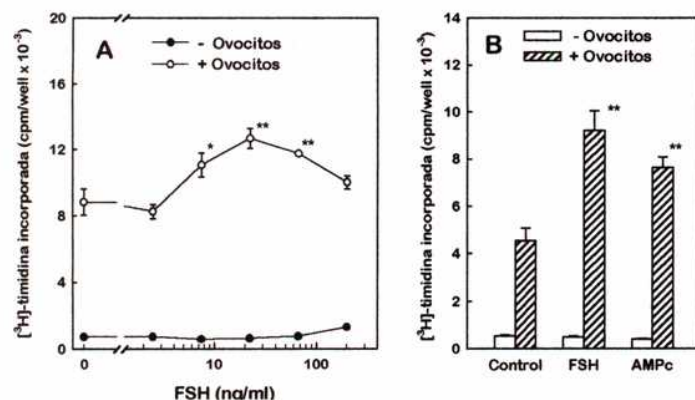
En presencia de la gonadotrofina, el co-cultivo con ovocitos indujo un aumento

significativo en el número de células (36 % de incremento, $p < 0.005$, Tabla 6.3). Este resultado indica que los incrementos en la síntesis de ADN van acompañados por mitosis.

Tabla 6.3. Efecto del co-cultivo con ovocitos sobre el número de células.

Tratamiento	Número de células (células/well)
Control	59.7 $\times 10^3 \pm 2.3 \times 10^3$
Ovocito	81.5 $\times 10^3 \pm 5.0 \times 10^3$ ***

Las células de granulosa se co-cultivaron con ovocitos (15/pocillo) en presencia de FSH (20ng/ml) y luego de 72 hs de cultivo se determinó el número de células. Los asteriscos representan diferencias significativas con el Control ($p < 0.005$). No se encontraron diferencias significativas entre los cultivos Control (72 hs) y el número de células inicial ($63.0 \times 10^3 \pm 2.5 \times 10^3$).

**Figura 6.3**

Efecto de FSH y AMPc sobre la síntesis de ADN de células de granulosa de rata estimuladas por ovocitos.

Las células de la granulosa de rata fueron cultivadas en ausencia o presencia de ovocitos bovinos (15/pocillo) con concentraciones crecientes de FSH (panel A). La acción amplificatoria de FSH se reprodujo por el agregado de dibutilil-AMPc (Bt₂cAMP, 0.2mM) (panel B). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a los respectivos cultivos control (*p<0.05, ** p<0.01).

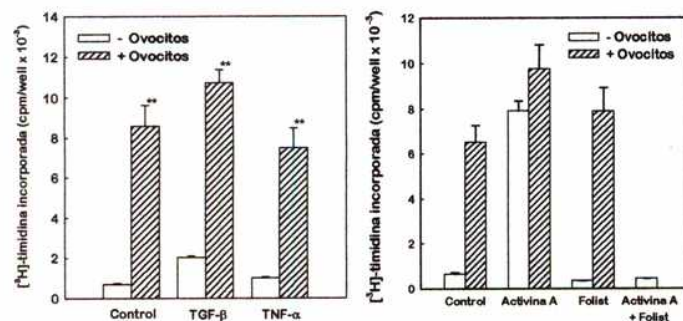
6.3.4. Caracterización de los factores derivados del ovocito

Se realizaron una serie de experimentos tendientes a determinar si la acción de ovocitos bovinos sobre la síntesis de ADN podía atribuirse a algunos de los factores ya caracterizados. Previamente se ha descrito la presencia en ovocitos de TNF- α y TGF- β . Por lo tanto, se analizó la posibilidad de que alguno de estos factores fuera el responsable de la actividad del co-cultivo.

El efecto estimulador de ovocitos fue evidente aún en presencia de dosis efectivas máximas de TGF- β o TNF- α (5 ng/ml y 10 ng/ml respectivamente) (Figura 6.4A). Este resultado indica que ninguno de estos factores es responsable del efecto observado. Además, el efecto estimulador no fue neutralizado por un anticuerpo anti-TGF- β (datos no mostrados) y no se detectó

efecto de ovocitos sobre las células CCL-64, utilizadas para la detección de este tipo de factores (Tabla 6.2).

Por otra parte, debido a que las acciones del ovocito sobre las células de la granulosa son similares a las ejercidas por miembros de la familia del TGF- β , se analizó el efecto del co-cultivo en presencia de activina o folistatina. En la Figura 6.4, panel B se observa que aunque los ovocitos no aumentaron de forma significativa la respuesta en presencia de dosis saturantes de activina A, su efecto no fue alterado por la incubación con folistatina. Como control se incluyó la neutralización de la acción de activina por folistatina. Estos resultados indican que la actividad derivada del ovocito tampoco es atribuible a la producción de activina.

**Figura 6.4.**

El efecto estimulador de los ovocitos no se debió a TGF- β , ni a TNF- α , ni a activina

A. El efecto del cocultivo con ovocitos fue evaluado en presencia de dosis saturantes de TGF- β (5 ng/ml) o de TNF- α (10 ng/ml). **p<0.01 comparado con los controles respectivos.

B. Las células fueron co-cultivadas con ovocitos con el agregado de dosis saturantes de activina A (200 ng/ml) o folistatina (300 ng/ml).

Se preparó medio condicionado por ovocitos (MC-O) y se ensayó (10%, cantidad equivalente a 28 ovocitos) sobre células de granulosa. Si bien el medio condicionado estimuló de manera significativa la síntesis de ADN, tanto en ausencia como en presencia de FSH (Tabla 6.4), no fue capaz de reproducir en similar magnitud el efecto del co-cultivo con ovocitos.

Sin embargo, como se muestra en la Tabla 6.5, el efecto estimulador resultó ser proporcional a la relación entre el número de ovocitos y el volumen de incubación en el cultivo. Utilizando para el co-cultivo una cantidad de 10 ovocitos en 200 μ l de cultivo, se obtuvieron similares resultados que cuando el cultivo se realizó con 5 ovocitos en 100 μ l. Para este experimento se eligió un rango de dosis en el cual hay sustanciales variaciones del efecto estudiado (Tabla 6.5 y Figura 6.2). Estos resultados indican la participación de factores solubles derivados del ovocito, pero de naturaleza lábil, razón por la cual, el MC-O no conserva totalmente la actividad.

6.3.5. Presencia de la actividad en ovocitos de otras especies

En los ensayos anteriores se utilizó un sistema heterólogo de ovocitos bovinos y células de granulosa de rata. Se realizaron experimentos con el objetivo de determinar que la actividad estimuladora derivada de ovocito no era exclusiva de ovocitos bovinos. Se co-cultivaron células de granulosa de rata con ovocitos homólogos. La presencia de ovocitos promovió un aumento en la síntesis de ADN de 2.5 veces y a su vez, este efecto fue amplificado por FSH. La actividad estimuladora de ovocitos homólogos fue evidente también en presencia de TGF- β o la combinación de este factor de crecimiento y FSH (Figura 6.5), obteniéndose similares resultados a los logrados con el co-cultivo con ovocitos bovinos.

Tabla 6.4: Efecto del medio condicionado de ovocito.

Condiciones de cultivo	Incorporación de ^3H -timidina (cpm/well)	
	Control	FSH
Control	900 $\pm$ 125 ^a	725 $\pm$ 50 ^a
MC-O (10%)	1570 $\pm$ 130 ^b	1775 $\pm$ 135 ^b
Ovocito (15/well)	7900 $\pm$ 500 ^c	12200 $\pm$ 250 ^d

Las células de la granulosa se cultivaron en presencia o ausencia de FSH (20 ng/ml) con 15 ovocitos/well o 10% de MC-O (equivalente a 28 ovocitos/well). El MC-O se obtuvo incubando 140 ovocitos denudados en 50 μ l de medio durante 24 h. Los superíndices a, b y c indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Tabla 6.5. Efecto del volumen de incubación sobre la síntesis de ADN estimulada por ovocitos

Oocytes/pocillo	Volumen incubación (μ l)	Incorporación de ^3H -timidina (cpm/pocillo)
0	100	695 $\pm$ 30 ^a
0	200	620 $\pm$ 35 ^a
10	100	12335 $\pm$ 530 ^b
10	200	6875 $\pm$ 795 ^c
5	100	6465 $\pm$ 465 ^c

Las células de la granulosa se cultivaron en ausencia o presencia de ovocitos (10 o 5 ovocitos/pocillo) en volúmenes de incubación de 100 o 200 μ l. A las 24 hs se igualaron los volúmenes de todos los cultivos y se evaluó la incorporación de timidina. Los valores son media $\pm$ ES de cultivos en triplicado. Distintos superíndices indican diferencias significativas ($p < 0.01$).

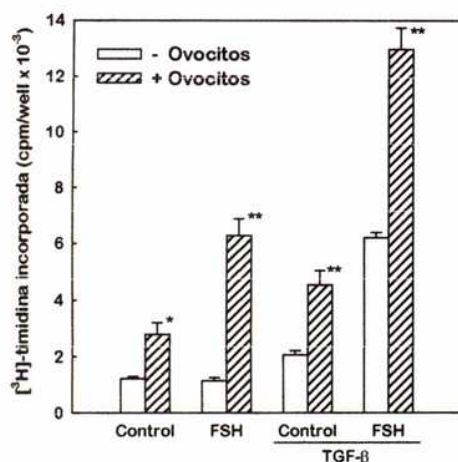


Figura 6.5

Efecto de ovocitos de rata en la síntesis de ADN de células de la granulosa homólogas.

Las células de la granulosa fueron cultivadas en ausencia o presencia de ovocitos de rata (25/well) en condiciones control (C), con FSH (20 ng/ml), TGF-β (5 ng/ml) o una combinación de FSH y TGF-β (20 ng/ml y 5 ng/ml respectivamente). Los valores corresponden a la media ± error estándar de triplicados de cultivos.

Por otra parte, se determinó que ovocitos de ratón y ovocitos humanos (datos no mostrados) también ejercen un efecto estimulador similar sobre las células de granulosa, sugiriendo que la capacidad de regular la función de las células de granulosa es una característica de los ovocitos de mamíferos.

6.3.6. Comparación de la actividad mitogénica con el factor de expansión del cumulus

El proceso de expansión del cumulus ocurre in vivo en respuesta al pico pre-ovulatorio de gonadotrofinas y se caracteriza por la activa secreción de ácido hialurónico por las células del cumulus. Para que el proceso de mucificación del cumulus estimulado por gonadotrofinas ocurra, se ha demostrado in vitro, la necesaria la participación de factores derivados del ovocito (Vanderhyden, 1993; Buccione et al., 1990; Salustri et al., 1990).

El objetivo de la siguiente serie de experimentos fue determinar si el efecto estimulador de los ovocitos sobre la síntesis de ADN de las células de la granulosa de rata, se debía al mismo factor que permite la mucificación.

Como experimento control, complejos cumulus-ovocito (COCs), obtenidos de ovarios de ratón, se cultivaron en ausencia o presencia de FSH. Como se observa en la Figura 6.5, la presencia de la gonadotrofina promovió la expansión del cumulus desde 4.4% hasta 99%, indicando que para que ocurra la mucificación del cumulus, es necesaria la presencia de FSH.

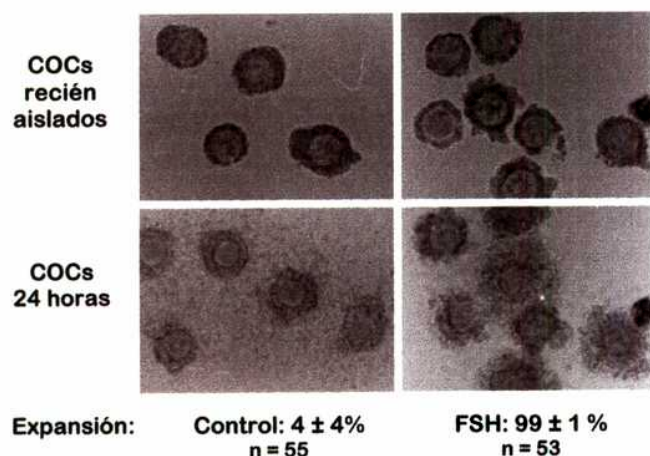


Figura 6.5: Expansión del cumulus en respuesta a FSH

Los complejos cumulus-ovocito (COCs) fueron cultivados durante 24 hs en ausencia o presencia de FSH (500 ng/ml). Las fotos superiores corresponden a los complejos recién aislados y las inferiores, a COCs luego de 24 hs. de cultivo. Al cabo de ese tiempo se determinaron los porcentajes de expansión (n: número de COCs analizados, 5 repeticiones; $p < 0.001$ ANOVA y test de comparaciones múltiples Tukey-Kramer luego de la transformación arco seno de las proporciones)

Por otra parte, mediante micromanipulación, se procedió a la eliminación del ovocito de los COCs, lo que resultó en complejos ovocitectorizados (OOX), en los cuales, el contenido del ovocito fue removido, quedando las células de la granulosa alrededor de la zona pelúcida vacía (Figura 6.6).

Cuando los complejos OOX se cultivaron en presencia de FSH (500 ng/ml), no se observaron las modificaciones características de la expansión. Por el contrario, en estas condiciones, las células tendieron a adherirse a la placa de cultivo (Figura 6.7). Cuando el ensayo de expansión se realizó en presencia de ovocitos separados del cumulus (denudados) y FSH se lograron proporciones de expansión similares a las obtenidas con los COCs recién aislados (95 %). Los ovocitos bovinos, al igual que ovocitos de otras especies (Vanderhyden, 1993), producen el factor de expansión del cumulus (Figura 6.7 y Tabla 6.6).

El cultivo de los complejos OOX con MC-O (1 ovocito/ μ l) estimuló la expansión del cumulus (Figura 6.7 y Tabla 6.6), mientras que, como se demostró previamente, el mismo medio condicionado no es capaz de reproducir el efecto mitogénico sobre las células de granulosa.

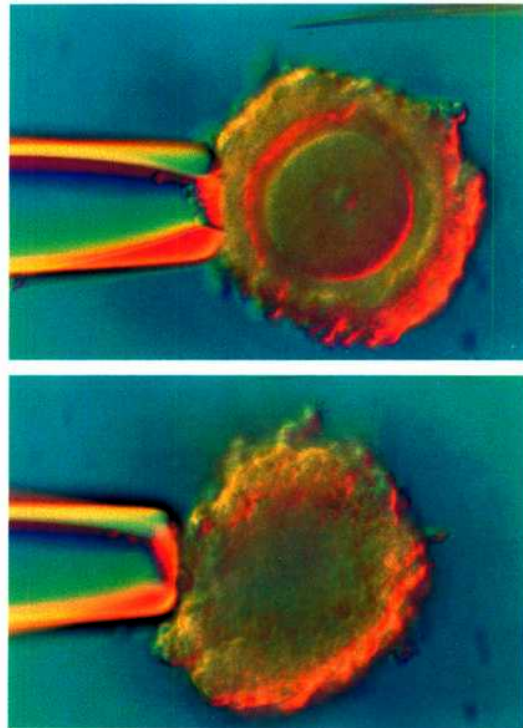
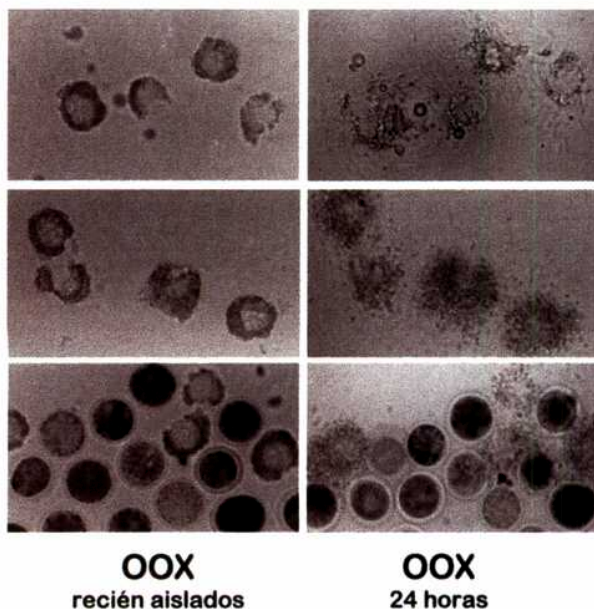


Figura 6.6. *Ovocitectorización.*

Procedimiento de remoción del contenido del ovocito de los complejos cumulus-ovocito por micromanipulación. La foto superior muestra un COC sostenido con la pipeta antes del procedimiento y la inferior corresponde al complejo OOX.



Control

Figura 6.7.

Efecto del co-cultivo con ovocitos denudados o del MC-O sobre la expansión del cumulus

+ MC

Complejos OOX se cultivaron con FSH (500 ng/ml) en condiciones Control, con MC-O (1 ovocito/ μ l) o con ovocitos bovinos recién obtenidos. La expansión del cumulus se evaluó a las 24 hs (paneles derecha).

+ ovocito

OOX
recién aislados

OOX
24 horas

El análisis de la producción del factor mitogénico durante la maduración meiótica de los ovocitos bovinos, indicó una disminución de esta actividad estimuladora de la proliferación de las células de granulosa con la maduración (datos no mostrados). Sin embargo, cuando complejos OOX fueron co-cultivados con ovocitos bovinos recién aislados u ovocitos madurados *in vitro*, la expansión de los

cumulus fue máxima tanto con ovocitos inmaduros como con ovocitos que sufrieron la ruptura de vesícula germinal (95% y 92% respectivamente, Tabla 6.6).

Este conjunto de evidencias sugiere que la actividad mitogénica derivada del ovocito que regula la función de las células de granulosa, es distinta del factor que permite la expansión de las células del cumulus.

Tabla 6.6
Expansión de OOX estimulados con FSH en presencia de ovocitos bovinos o MC-O.

Condiciones de cultivo	% Complejos expandidos (n, repeticiones)
Control	0 ± 0 (n=19, 3 repeticiones) ^a
Ovocitos inmaduros (15/gota)	95 ± 5 (n=17, 3 repeticiones) ^b
Ovocitos madurados (15/gota)	92 ± 5 (n=21, 3 repeticiones) ^b
MC-O	67 ± 16 (n=18, 3 repeticiones) ^b

Los complejos OOX se cultivaron con FSH (500 ng/ml) en medio (Control), con ovocitos recién aislados (Ovocitos inmaduros), con ovocitos madurados *in vitro* o con MC-O (15µl, obtenido de incubar 1ovocito/µl). La expansión fue determinada como se indicó en Materiales y Métodos (n: número de complejos analizados y número de repeticiones). Los superíndices a y b indican diferencias significativas ($p < 0.05$). La evaluación de la maduración meiótica de los ovocitos se realizó por determinación de la ruptura de la vesícula germinal (inmaduros 0% GVBD, madurados 100%GVBD).

6.4. Discusión

La utilización de sistemas heterólogos y homólogos permitió demostrar que los ovocitos promueven la proliferación de células de la granulosa.

Los ovocitos bovinos son fáciles de obtener y la técnica implementada para denudarlos de las células del cumulus resulta sumamente sencilla. Por otra parte, el sistema de cultivo definido utilizado para las células de granulosa de rata ha sido caracterizado en detalle en lo que respecta a su respuesta diferencial a hormonas y factores de crecimiento (Bley et al., 1992; Saragüeta et al., 1996; Barañao et al., 1993).

Vanderhyden et al. (1992) describieron que los ovocitos de ratón promueven la proliferación de células de la granulosa homólogas, aisladas de folículos preantrales y antrales. Por otra parte, determinaron que la ovocitotomía produce una disminución en la proliferación, que puede revertirse con el agregado de medio condicionado por ovocito.

Utilizando una aproximación experimental diferente, se determinó que este efecto puede evidenciarse bajo condiciones definidas, utilizando un sistema homólogo o uno heterólogo. El cocultivo de ovocitos de rata o bovinos con células de granulosa de rata promovió la síntesis de ADN de estas células y fue amplificado por FSH en forma bifásica. También se ha descrito que la interacción de esta hormona gonadotrófica con esteroides sexuales, IGF-I o TGF- β (Bley et al., 1992; Saragüeta et al., 1996; Barañao et al., 1993) incrementa la incorporación de timidina. Esta interacción puede reproducirse con bajas dosis de dibutiril-AMPC, indicando, que la actividad del ovocito sobre las células de la granulosa no está mediada por este mensajero intracelular.

El efecto estimulador de los ovocitos sobre la síntesis de ADN parece ser específico para células de la granulosa, dado que no se observó respuesta alguna en otros tipos celulares: fibroblastos Swiss 3T3 y células

epiteliales de pulmón CCL-64. Por otra parte, el efecto mitogénico se reprodujo en cultivos primarios de células de la granulosa bovina y en la línea celular de granulosa bovina BCG-1.

Para identificar el factor(es) responsable del efecto estimulador producido por los ovocitos, se comparó su efecto con los de TGF- β y TNF- α . Se ha demostrado que ambos factores están presentes en ovocitos de diferentes especies (Ghiglieri et al., 1995; Chen et al., 1993; Marcinkiewicz et al., 1994), y que estos compuestos modulan la síntesis de ADN en células de la granulosa de rata (como se analiza en los capítulos correspondientes de esta tesis). Más aún, se ha demostrado que TGF- β 1 es capaz de reproducir el efecto del factor soluble producido por el ovocito en la estimulación de la síntesis de ácido hialurónico (Salustri et al., 1989; Tirone et al., 1997). Sin embargo, si bien los ovocitos reproducen algunos de los efectos de miembros de la familia del TGF- β sobre las células de la granulosa de rata (Dorrington et al., 1988; Saragüeta et al., 1997), este factor no es responsable del efecto observado, ya que: 1) los ovocitos estimularon la síntesis de ADN aún en presencia de dosis máximas de TGF- β , 2) el efecto de los ovocitos no fue neutralizado con anticuerpos anti-TGF β , 3) la acción no fue atenuada por folistatina y 4) no se detectó actividad TGF- β con el bioensayo específico (CCL64).

Recientemente, se ha identificado un nuevo miembro de la superfamilia del TGF- β , el factor de crecimiento y diferenciación-9 (GDF-9), que se expresa específicamente en el ovario de ratón (McPherron, Lee, 1995). El ARNm de GDF-9 ha sido identificado en ovocitos en todos los estadios de desarrollo folicular, con la excepción de los folículos primordiales (McGrath et al., 1995). Un patrón similar de expresión y homología de secuencia, se ha encontrado para el GDF-9 en humanos, ovinos y bovinos (Bodensteiner et al., 1999). La generación de ratones con la delección del gen que codifica para el

GDF-9, di como resultado hembras homocigotas estériles. En el ovario de este ratón knock-out, los ovocitos crecen y secretan normalmente la zona pelúcida, pero están rodeados por una única capa de células de la granulosa, lo que indica que el GDF-9 es necesario para la foliculogénesis normal (Dong et al., 1996). La ausencia de este factor de crecimiento produce un bloqueo en el desarrollo folicular, en el cual las células de la granulosa no proliferan in vivo y experimentos in vitro demostraron que el GDF-9 aumenta el crecimiento de folículos en cultivo (Hayashi et al., 1999). De esta manera, el GDF-9 es el primer factor de crecimiento derivado del ovocito identificado que es requerido para el correcto funcionamiento de las células somáticas in vivo.

Relacionando nuestros experimentos, con estos conocimientos recientes, se podría postular que este factor sería el responsable de la actividad estimuladora producida por el ovocito. También recientemente, se identificó otro miembro de la familia del TGF- β , la proteína morfogenética osea-15 (BMP-15), que al igual que el GDF-9, se expresa específicamente en ovocitos humanos y de ratón con un patrón similar al del GDF-9 (Dube et al., 1998). Si bien no se han demostrado efectos biológicos de este péptido, se especula que podría cumplir un papel importante en el desarrollo del folículo ovárico.

Se ha sugerido, que la actividad regulatoria de la esteroidogénesis podría deberse a un compuesto esteroideo (Vanderhyden, Tonary, 1995). Esto podría explicar el estricto requerimiento del co-cultivo para la manifestación de los efectos en nuestro sistema, ya que precursores putativos serían producidos por las células de la granulosa. Para analizar si los ovocitos bovinos eran capaces de metabolizar esteroides producidos por la granulosa, se incubaron cocultivos con pregnenolona tritiada y los productos se analizaron por cromatografía. Solamente se encontraron pequeñas diferencias cuantitativas de los metabolitos producidos (datos no mostrados), indicando que no parece un esteroide estar involucrado en la interacción paracrina.

Por otra parte, se ha descripto (Vanderhyden, Tonary, 1995) que el ovocito inhibe la producción de progesterona, a la vez que aumenta la síntesis de estradiol. En nuestro sistema el estradiol sinergiza con FSH para estimular la síntesis de ADN, mientras que la progesterona no tiene efecto (Bley et al., 1997). Sin embargo, en ausencia de andrógenos aromatizables, las células de la granulosa no pueden sintetizar estrógenos, por lo cual los efectos del ovocito no se explican por un incremento en los niveles de estradiol.

No se han establecido los mecanismos de la actividad estimuladora del crecimiento. Dado el sinergismo con FSH, podría especularse que las señales desencadenadas por el factor derivado del ovocito podrían complementar el incremento de ciclina D2 que es uno de los elementos claves de la regulación del ciclo celular controlados por gonadotrofinas en células de granulosa (Sicinski et al., 1996).

Durante el proceso de mucificación, FSH es necesaria para promover la expansión del cumulus y la síntesis de ácido hialurónico. Sin embargo, la FSH no induce la expansión de las células del cumulus en ausencia del ovocito o del factor producido por éste (Buccione et al., 1990; Salustri et al., 1990). Esta actividad fue caracterizada en forma preliminar (Eppig et al., 1993), pero no se ha establecido su identidad.

Los resultados indican que el factor mitogénico derivado del ovocito es distinto del factor que produce la expansión de las células del cumulus. Mientras que la maduración de los ovocitos disminuye significativamente el efecto proliferativo sobre las células de la granulosa (ML Fischman, tesis), no afecta la expansión de las células del cumulus. Por otra parte, el medio condicionado de ovocito sólo reprodujo parcialmente el efecto sobre la síntesis de ADN, mientras que lo hizo totalmente en la expansión de las células del cumulus. La falta de cambios asociados con el proceso de maduración de la actividad de expansión del cumulus en ovocitos bovinos es consistente con estudios en el ratón, que mostraron una producción similar tanto por

ovocitos arrestados en meiosis como maduros (Salustri et al., 1990; Eppig et al., 1993; Buccione et al., 1990; Vanderhyden et al., 1990).

Nuestros resultados mostraron un descenso marcado en el efecto estimulatorio al precultivar los ovocitos y ensayar el medio condicionado. Recientemente, Eppig y colaboradores (#10969) mostraron que el cocultivo con ovocitos es necesario para la supresión de la expresión del receptor de LH en células de granulosa de ratón, efecto que sería debido a un factor lábil.

De manera similar, los resultados indican que existe una relación entre el número de ovocitos y el volumen de incubación, lo cual sugiere que un factor soluble pero lábil, esta involucrado en la regulación del crecimiento de células de granulosa. La aparente labilidad del(los) factor(es) activo(s), producido por ovocitos en estadio GV, podría ser una consecuencia de su naturaleza

química o bien de su degradación activa por las células de granulosa. Esta labilidad es consistente con una naturaleza transiente esperada de la señal y la restricción de su acción a las células más próximas.

Luego de la ovulación, las células de granulosa dejan de proliferar y la posible ausencia de mitógenos derivados del ovocito podría ser responsable del arresto que precede a la luteinización. Para comprender uno de los procesos centrales de la reproducción en mamíferos es esencial el esclarecimiento de la compleja interacción entre estos reguladores locales.

Los resultados obtenidos aportan información original sobre el conocimiento de la comunicación bidireccional entre el ovocito y las células de la granulosa que lo circundan. Además, indican la participación del ovocito, en forma activa, en la regulación del desarrollo folicular.

7. Módulo V

***Producción de inhibinas diméricas
por células de la granulosa.***

Regulación por hormonas y factores locales

7.1. Introduction

El concepto de una relación recíproca entre la hipófisis y las gonadas surgió de observaciones en las que el tratamiento con radiación del testículo estaba asociado a hipertrofia hipofisaria. McCullagh (1932) encontró que en ratas macho castradas dicha hipertrofia hipofisaria era evitada por inyección de extractos acuosos de testículo, mientras que ese extracto acuoso no presentaba efecto sobre la atrofia de los órganos sexuales accesorios. El principio activo del extracto acuoso fue denominado inhibina.

Un gran número de observaciones fisiológicas le dió apoyo conceptual a la hipótesis que señalaban a la inhibina como un selectivo regulador de la secreción de FSH (Findlay, 1993; Woodruff, Mather, 1995; Burger, 1993). Una obvia predicción de esta hipótesis era que debería existir una relación inversa entre los niveles séricos de FSH e inhibina.

7.1.1. Estructura de la inhibina

La inhibina es una glicoproteína perteneciente a la superfamilia del TGF- β , compuesta por 2 subunidades (α y β) unidas por puente disulfuro. La heterodimerización de la subunidad α con alguna de las dos formas de subunidad β , βA o βB , da origen a la inhibina A o inhibina B, respectivamente (Figura 7.1).

La activina es una proteína constituida por dos subunidades β , generadas por dimerización combinatorial, activina A (βA - βA), activina B (βB - βB) o activina AB (βA - βB). A diferencia de otros miembros de la familia del TGF- β , hasta el momento, no se ha encontrado ningún homólogo de la subunidad α de inhibina en especies que no sean mamíferos. Este hecho, sugiere que esta subunidad y la proteína dimerica de inhibina podría haber surgido más recientemente cubriendo las demandas de comunicación entre los distintos tejidos del eje reproductivo en mamíferos.

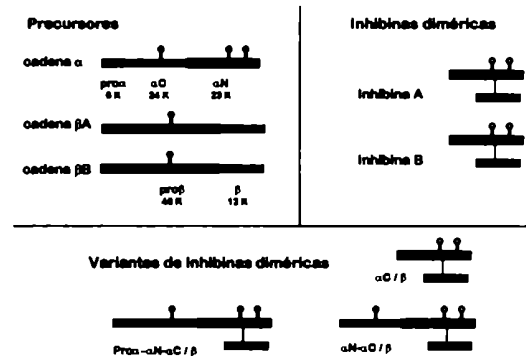


Figura 7.1.

Estructura de inhibinas

Estructura de los precusores de las subunidades α y β . Generación de inhibinas dimericas A y B por unión de la subunidad α con la subunidad βA o βB . Variantes de inhibinas dimericas por distinto procesamiento de la subunidad α . Adicionalmente existen otras variantes originadas en la cadena β (pro- β - β o β) o por grado de glicosilación.

Se han identificado un gran número de formas de inhibina con distinto peso molecular, lo que se atribuye a procesamientos de los precusores de sus subunidades y a una glicosilación diferencial, con la presencia de una o dos cadenas de carbohidratos en la región carboxi de la subunidad α (Robertson et al., 1996). La actividad biológica de muchas de las formas de inhibina parece residir en la forma madura de 30 kD. Las formas identificadas de la subunidad α son Pro- αN - αC (50-60 K), αN - αC (45 K), Pro- αC (26-30 K) y algunas de las inhibinas A y B dimericas son Pro- αN - αC / pro- β - β (90-105 K), αC / pro- β - β (75 K), Pro- αN - αC / β (55-66 K), αC / β (30-34 K) (Figura 7.1).

7.1.2. Mecanismos celulares de acción

Aunque el conocimiento relacionado con la acción de activina (y otros miembros de la familia del TGF- β) se ha expandido enormemente en los últimos años, la comprensión de los mecanismos celulares

de la acción de la inhibina ha sido comparativamente lento. La ausencia de homólogos de inhibina en organismos inferiores que permitan su manipulación genética, la restricción de los tejidos blanco y la dificultad de producir inhibina purificada o recombinante, hicieron que ,actualmente, no se conozcan los receptores de inhibina, ni genes blanco regulados por la hormona (Woodruff, 1999).

Estudios recientes han demostrado la existencia de sitios de unión de alta afinidad en la membrana de los gonadotropos, en células de tumores gonadales del ratón knock-out de inhibina con especificidad para inhibina y no para activina ni para TGF- β . (Draper et al., 1998; Hertan et al., 1999). A pesar de que estos trabajos indicarían la existencia de un receptor de inhibina, no se han logrado clonar posibles receptores para esta hormona, por homología con los otros receptores serina/treonina quinasa. Alternativamente, en algunos sistemas, existen evidencias experimentales que indican que la inhibina actúa por un mecanismo dominante negativo de los receptores de activina, antagonizando su transducción de señales (Martens et al., 1997; Lebrun, Vale, 1997).

7.1.3. Las Inhibinas diméricas A y B: actividad biológica y métodos de detección

Con el desarrollo de inmunoensayos para la determinación de inhibina en suero se abrió un campo de aplicación a la fisiología de los sistemas reproductivos así como, al diagnóstico de patologías en los mismos (Bhasin et al., 1996).

Los ensayos para medir los niveles circulantes de inhibinas, utilizados ampliamente en un comienzo, fueron los radioinmunoensayos heterólogos, desarrollados por Robertson y col. (1986). En ellos se utilizaba anticuerpos policlonales generados contra inhibina bovina de 31 kDa e inhibina bovina de 31 kD como trazador. Estudios posteriores revelaron que además de reconocer las inhibinas diméricas A y B, estos ensayos reconocían la subunidad α

libre, lo que limitó su utilización (Bhasin et al., 1996; Schneyer et al., 1990). Se ha demostrado que las gónadas producen exceso de precursores de la subunidad α que se encuentran en circulación en altos niveles tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Knight et al., 1989). Tanto las subunidades α como β no poseen actividad biológica, al menos en términos de la inhibición de la secreción hipofisaria de FSH (Robertson et al., 1997; Robertson et al., 1996).

Las determinaciones mediante este ensayo mostraron un incremento luego del tratamiento con gonadotrofinas en humanos y animales de experimentación (Burger et al., 1990; Robertson et al., 1988). Asimismo, se determinaron cambios en las concentraciones circulantes en las distintas fases del ciclo menstrual, incluyendo una disminución de inhibina en mujeres premenopáusicas, en las cuales los niveles de FSH muestran un aumento recíproco (Lenton et al., 1991).

Sin embargo no se podía explicar la ausencia de una relación inversa entre niveles circulantes de inhibina y FSH en hombres con una variedad de desórdenes testiculares (De Kretser et al., 1989). Estos datos sugerían una considerable heterogeneidad de las especies inmunoreactivas en el plasma y subrayaban la necesidad de desarrollar métodos más específicos de determinación que no presentaran reacción cruzada con otras proteínas estructuralmente relacionadas, que tienen otro efecto biológico (como la activina) o que no son bioactivas (como la subunidad α libre).

Recientemente, estos problemas parecen haber sido resueltos mediante la utilización de sistemas de ELISA de dos sitios altamente sensibles y específicos para las inhibinas diméricas (A o B), así como para los precursores de la subunidad α desarrollados por Groome y col. (Groome et al., 1996; Groome et al., 1995; Groome, O'Brien, 1993; Groome, 1991).

Utilizando estos métodos, se demostró una correlación negativa entre inhibina B y FSH

en hombres sin desórdenes reproductivos, infértiles o con concentraciones elevadas de FSH (Illingworth et al., 1996).

En la mujer se han descrito los cambios seriales de inhibina A e inhibina B circulantes durante las diferentes fases del ciclo menstrual. La inhibina A permanece baja durante la fase folicular temprana y media y predomina en la fase luteal del ciclo. Los niveles de inhibina B son máximos en la fase folicular temprana y descienden en la fase folicular previa a la ovulación, permaneciendo bajos durante la fase luteal (Groome et al., 1996; Groome et al., 1994).

En la rata hembra adulta, se han observado patrones diferentes de circulación de inhibinas A y B durante el ciclo estral. Los niveles de inhibina A alcanzan un máximo en proestro, mientras que altos niveles de inhibina B se observan en metaestro, diestro y proestro (Woodruff et al., 1996). Estas diferencias podrían ser debidas a diferentes fuentes dentro del folículo o a una regulación diferencial de la secreción de cada dímero.

7.1.4. La inhibina como regulador intraovárico

Además de su función como hormona endocrina, regulando secreción de FSH por la pituitaria, existen evidencia para asignarle a la inhibina también un rol paracrino en el folículo ovárico, particularmente sobre las células tecales. La inhibina potencia la biosíntesis de andrógenos inducida por LH in vitro en células de la teca de humanos y de rata, efecto que es antagonizado por

activina (Hillier et al., 1991b; Hillier et al., 1991b; Hsueh et al., 1987b).

El modelo de ratón "knock-out" de la subunidad α de inhibina enfatiza el conocido papel de la inhibina en disminuir la liberación de FSH, ya que los niveles de la gonadotropina se encuentran elevados. Por otra parte, la generación de este modelo, revelaría la importancia de la inhibina como agente antiproliferativo y de supresión de tumores gonadales. Esencialmente el 100% de los animales deficientes en inhibina desarrollan tumores de células de granulosa-Sertoli (Matzuk et al., 1992), lo que implicaría que la inhibina posee una función como regulador intragonadal. Sin embargo, estos fenotipos en las gonadas podrían ser resultado de la acción de activina, ya que al eliminar la subunidad α , existe una producción notablemente elevada del dímero β - β por las células del ovario y del testículo.

7.2. Objetivo

El objetivo de este estudio fue determinar la regulación de la producción de inhibinas A y B en el ovario por gonadotropinas y putativos reguladores intraováricos como esteroides o factores de crecimiento peptídicos.

El conocimiento adecuado de la modulación de la síntesis de ambas inhibinas aportaría datos precisos acerca de los mecanismos de comunicación intercelular involucrados en las distintas etapas del desarrollo del folículo ovárico

7.3. Resultados

7.3.1. Efecto de FSH

Utilizando ELISAs específicos para cada una de la inhibinas diméricas, se analizó su producción por células de granulosa in vitro.

Las células de la granulosa cultivadas en condiciones basales produjeron entre diez y quince veces más inhibina A que inhibina B (inhibina A: 2.02 ± 0.34 , inhibina B: 0.14 ± 0.02 ng/ml).

En la Figura 7.2 se muestra que dosis crecientes de FSH estimularon de manera dosis-dependiente ambas inhibinas, con un efecto más pronunciado sobre inhibina A (9.9 y 4.7 veces de incremento sobre la producción basal de inhibina A y B, respectivamente, a una concentración de 20 ng/ml). Este efecto preferencial sobre

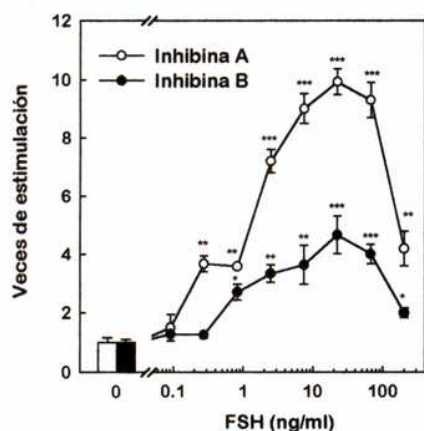


Figura 7.2
Efecto de FSH sobre la producción de inhibinas diméricas

Las células de granulosa se cultivaron con concentraciones crecientes de FSH por 72 hs. Los niveles de inhibinas A y B se determinaron en los medios condicionados. Los datos se presentan como veces de estimulación de las respectivas producciones basales (Control: 2.02 ± 0.34 ng/ml inhibina A y 0.14 ± 0.02 ng/ml inhibina B). Los valores son medias $\pm$ error standard de cultivos por triplicado. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparado con los respectivos cultivos Control). Análisis de las curvas dosis-respuesta para FSH indicaron ED_{50} : 1.7 ± 0.7 ng/ml para inhibina A y 1.5 ± 0.9 ng/ml para inhibina B (Allfit).

inhibina A determinó un aumento en la relación inhibina A/inhibina B desde 14 ± 4 (Control) hasta 34 ± 2 (FSH 20 ng/ml).

7.3.2. Efecto de estradiol e IGF-I

Se analizó la regulación de la secreción de inhibinas por estrógenos y otros factores de acción local.

El agregado de estradiol estimuló la producción de inhibina A entre 3 y 6 veces, mientras que cambios menores fueron observados sobre inhibina B (entre 1.2 y 1.8 veces) (Figura 7.3). En presencia de este esteroide, FSH ejerce una estimulación mayor sobre ambas inhibinas. No se observó interacción entre estradiol y FSH (ANOVA de dos factores).

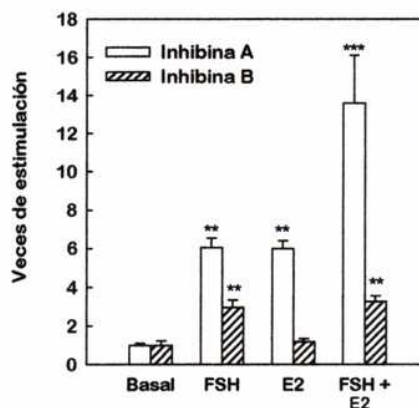


Figura 7.3
Efecto de estradiol sobre la secreción de inhibinas A y B

Células de la granulosa se cultivaron en ausencia o presencia de estradiol (E2, 100 ng/ml) y con el agregado de FSH (20 ng/ml). Las inhibinas se determinaron luego de 72 hs de cultivo. Los datos se presentan como veces de estimulación de las respectivas producciones basales. Los valores son medias $\pm$ error standard de cultivos por triplicado. (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparado con los respectivos cultivos Control). Los efectos de estradiol y FSH no fueron supra-aditivos ($p > 0.05$, ANOVA dos factores).

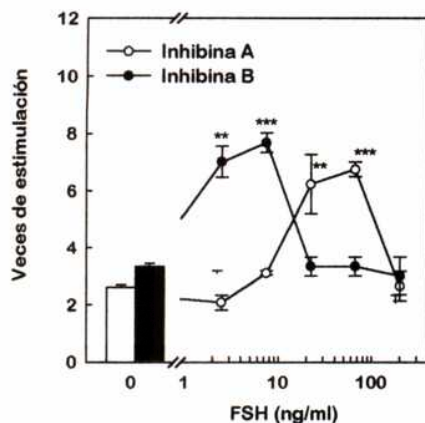


Figura 7.4

Efecto de IGF-I en la producción de inhibinas diméricas

Las células de granulosa se cultivaron con concentraciones crecientes de FSH en presencia de IGF-I (100 ng/ml, ED_{50} : 40 ± 8). Los resultados se presentan como veces de estimulación de la producción de inhibinas en cultivos control (sin estímulo). Los valores son medias $\pm$ error standard de cultivos por triplicado (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparado con los niveles obtenidos en ausencia de FSH). ED_{50} : 12 ± 3 ng/ml para inhibina A y < 1 ng/ml para inhibina B.

Por otra parte, el factor de crecimiento similar a insulina (IGF-I), en una concentración de 100 ng/ml, produjo una estimulación similar de ambas inhibinas (inhibina A: 2.6 e inhibina B: 3.3 veces de estimulación de los respectivos controles).

Sin embargo, este factor de crecimiento indujo una marcada disociación en la sensibilidad de inhibina A y B a la estimulación por FSH. Como se muestra en la Figura 7.4, aunque ambas curvas son bifásicas para FSH, la máxima estimulación de inhibina B se observó a concentraciones comparativamente menores de la gonadotrofina.

7.3.3. Efecto de TGF- β

El factor de crecimiento transformante- β (TGF- β , 5 ng/ml) tuvo un efecto estimulador más pronunciado sobre la producción de inhibina B que sobre la de inhibina A (entre 7 y 14 veces de estimulación para inhibina A y entre 2 y 5 veces para inhibina B). Debido a

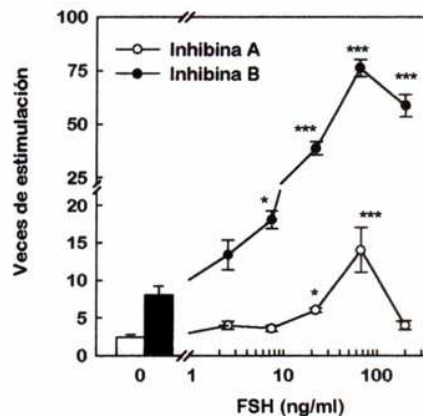


Figura 7.5

Efecto de FSH sobre la secreción de inhibinas diméricas estimulada por TGF- β

Las células de granulosa se cultivaron con TGF- β (5 ng/ml) y concentraciones crecientes de FSH. Las inhibinas se determinaron en los medios de cultivo luego de 72 hs. Los resultados se presentan como veces de estimulación de la producción de inhibinas en cultivos control (sin estímulo). Los valores son medias $\pm$ error standard de cultivos por triplicado (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ comparado con los niveles obtenidos en ausencia de FSH). Análisis de las curvas para FSH indicaron ED_{50} : 25 ± 5 ng/ml para inhibina A y 22 ± 3 ng/ml para inhibina B.

esta estimulación diferencial, la relación entre inhibina A e inhibina B disminuyó (Tabla 7.1).

Esta aparente estimulación específica de inhibina B por TGF- β fue amplificada por la presencia de FSH (Figura 7.5). Como se observa en la Figura 7.5, una combinación de 60 ng/ml de FSH y TGF- β produjo un incremento de 75 veces en los niveles de inhibina B, mientras que los de inhibina A fueron aumentados solamente 14 veces. En esta última condición, ambas inhibinas diméricas fueron producidas aproximadamente en las mismas cantidades (relación inhibina A/inhibina B: 0.9- 1.8, Tabla 7.1).

7.3.4. Efecto de activina

Esta estimulación diferencial de inhibina B por TGF- β también fue promovida por otro miembro de esta superfamilia. El efecto de activina A sobre la producción de inhibinas se muestra en la Figura 7.6 y en la Tabla

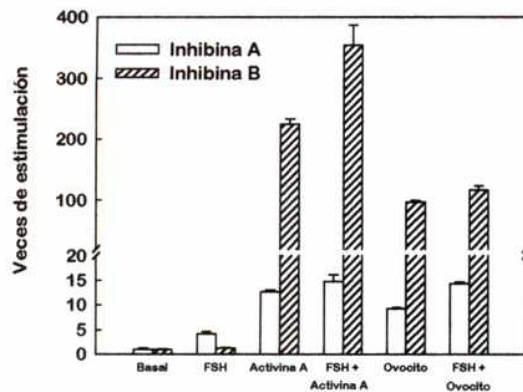


Figura 7.6

Efecto de activina y co-cultivo con ovocitos sobre la secreción de inhibinas por células de granulosa
Células de la granulosa de rata se cultivaron en ausencia o presencia de FSH (20ng/ml) en condiciones control (Control), con activina A (100 ng/ml) o se co-cultivaron con ovocitos bovinos (15/well) por 72 hs. Los resultados se presentan como veces de estimulación de la producción de inhibinas en cultivos control. Los valores son medias $\pm$ error standard de cultivos triplicado.

7.1. Esta acción fue cuantitativamente más pronunciada que la ejercida por TGF- β y también fue amplificada, aunque en menor magnitud, por el agregado de FSH.

7.3.5. Efecto de co-cultivo con ovocitos

El co-cultivo de células de granulosa con ovocitos bovinos inmaduros estuvo asociado a una marcada estimulación de la producción de inhibina B (aproximadamente 100 veces de incremento) y una estimulación comparativamente menor de inhibina A (Figura 7.6 y Tabla 7.1). En algunos experimentos se encontró una leve estimulación de este efecto por FSH pero no fue consistente.

Tabla 7.1
Efecto de TGF- β , activins u ovocito sobre la relación inhibina A/ inhibina B

Tratamiento	FSH	Inhibina A (ng/ml)	Inhibina B (ng/ml)	Relación aparente Inhibina A/ Inhibina B
Control	-	0.99 $\pm$ 0.16 ^a	0.10 $\pm$ 0.01 ^a	10.1 $\pm$ 2.5
	+	4.11 $\pm$ 0.29 ^b	0.13 $\pm$ 0.01 ^a	32.4 $\pm$ 3.3
TGF- β	-	14.60 $\pm$ 0.22 ^c	7.25 $\pm$ 0.36 ^b	2.01 $\pm$ 0.17
	+	15.38 $\pm$ 0.61 ^c	10.20 $\pm$ 0.29 ^c	1.51 $\pm$ 0.07
Activina	-	14.52 $\pm$ 1.03 ^c	22.03 $\pm$ 0.60 ^d	0.66 $\pm$ 0.07
	+	12.95 $\pm$ 0.25 ^c	34.74 $\pm$ 2.24 ^e	0.37 $\pm$ 0.03
Ovocito	-	9.20 $\pm$ 0.10 ^d	9.49 $\pm$ 0.18 ^c	0.97 $\pm$ 0.03
	+	14.17 $\pm$ 0.24 ^c	11.45 $\pm$ 0.44 ^c	1.24 $\pm$ 0.07

Las células de la granulosa se cultivaron en ausencia o presencia de FSH (20 ng/ml) en medio control (Control), con el agregado de TGF- β (5 ng/ml), activina A (100 ng/ml) o co-cultivadas con ovocitos bovinos recién aislados (15/well). Las inhibinas se midieron en los medios condicionados luego de 72 hs de cultivo y se determinó la relación inhibina A/ inhibina B. Los valores en cada columna con superíndices diferentes presentan diferencias significativas ($p < 0.05$).

7.3.6. Concentraciones séricas

A diferencia de lo observado en los medios condicionados por células de la granulosa purificadas, cuando se determinaron los niveles circulantes de inhibinas A y B en ratas tratadas con estrógenos (como las utilizadas para la obtención de las células de granulosa), la inhibina B fue el dímero predominante (Tabla 7.2).

La proporción entre inhibina A y B (relación A/B: 0.13 ± 0.02) fue marcadamente diferente de la observada en células de granulosa cultivadas en condiciones basales (relación A/B: 12 ± 3 , leyenda Figura 7.2 y Tabla 7.1).

Sin embargo, esta discrepancia entre las relaciones de inhibinas diméricas in vivo e in vitro se atenúan marcadamente por acción de factores de la familia del TGF- β (TGF- β 1 o activina) y factores derivados del ovocito.

Tabla 7.2
Concentraciones circulantes de inhibinas

	Concentración (ng/ml)	Relación Inh A/ Inh B
Inhibina A	0.74 ± 0.36	0.13 ± 0.02
Inhibina B	5.50 ± 1.45	

Se determinaron los niveles circulantes de inhibinas diméricas en suero de rata. Los mismos animales en los que se realizaron estas determinaciones, fueron utilizados para la obtención de las células de granulosa.

7.3.7. Regulación de los niveles de ARNm de las subunidades de activina e inhibina

Se analizaron los niveles de ARN mensajero correspondientes a las subunidades α , β A y β B de activina e inhibina mediante northern blot.

La subunidad α de inhibina aumentó su expresión en respuesta a FSH o a TGF- β , sin encontrarse efectos adicionales en presencia de ambos estímulos (Figura 7.7). Similares resultados se encontraron para la regulación de la subunidad β A de activina e inhibina.

Sin embargo la regulación de la subunidad β B mostró un efecto diferencial. Mientras que FSH sólo ejerció un leve efecto positivo, TGF- β provoca una importante estimulación, acción que se ve amplificada por FSH (Figura 7.7).

El TGF- β ejerció su efecto estimulatorio aumenta principalmente los niveles del ARNm de la subunidad β B de mayor tamaño. La existencia de dos mensajeros, que codifican para la cadena β B (3.3 y 4.3 kb), se ha descrito previamente en el ovario y testículo (Feng et al., 1995; Dykema, Mayo, 1994). En la figura 7.8 se muestra un esquema de la regulación de la expresión de genes correspondientes a las cadenas de activina e inhibina por FSH y TGF- β .

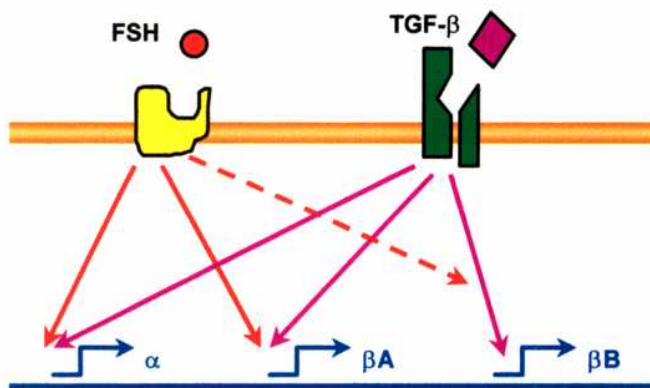


Figura 7.8
Esquema de la regulación de las subunidades α , β A y β B de activina e inhibina por FSH y TGF- β

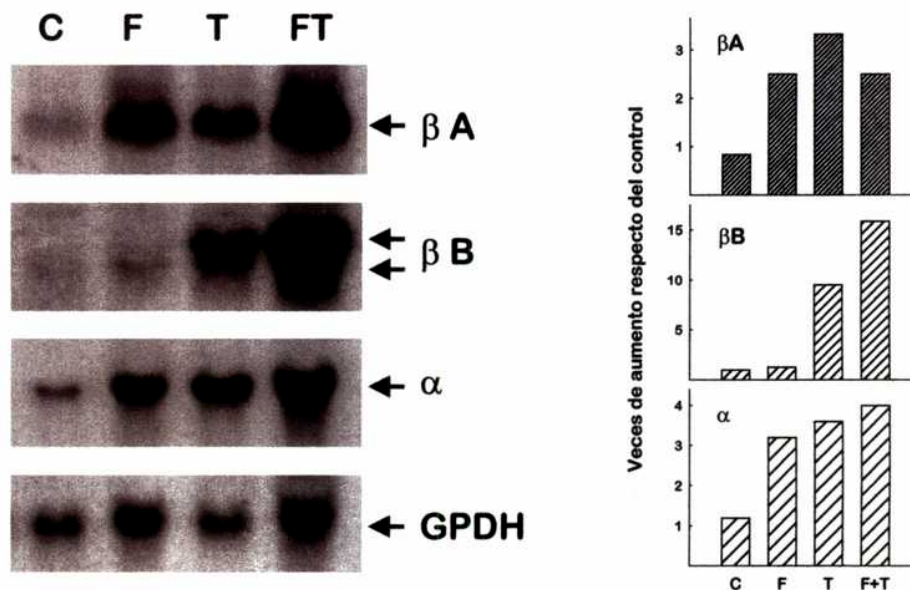


Figura 7.7

Regulación de la expresión de las subunidades de activina e inhibina.

Se determinaron por Northern blot, los niveles de los ARNm correspondientes a las subunidades α , βA y βB en células de la granulosa cultivadas en condiciones control (C), con FSH (F, 20 ng/ml), TGF- β (T, 5 ng/ml) o la combinación de ambos (FT). El panel inferior muestra la hibridización con una sonda de GPDH como referencia de normalización.

Sobre la derecha se muestran los resultados de la cuantificación de cada banda relativos a la señal de GPDH.

7.4. Discusión

Mediante la utilización de ensayos específicos para inhibinas A y B, se encontró que las células de la granulosa de rata, cultivadas en un sistema completamente definido, secretan inhibinas diméricas y que esta producción y la relación entre inhibina A y B, es regulada por FSH, estrógenos y factores de crecimiento.

Existían evidencias experimentales indicando que la producción de inhibinas por el ovario se encontraba controlada por FSH y reguladores locales (Findlay, 1993; Woodruff, Mather, 1995). Sin embargo, estos resultados fueron obtenidos utilizando radioinmunoensayos heterólogos que no discriminaban entre ambos tipos de inhibinas diméricas y la subunidad α libre (Xiao et al., 1992; Zhiwen et al., 1988; Bhasin et al., 1996). Más recientemente, se realizaron estudios midiendo los niveles de los ARNm de las distintas subunidades (α , β A y β B) en varias condiciones experimentales (Erämaa, Ritvos, 1996; LaPolt et al., 1990; Aloï et al., 1995; Eramaa et al., 1994; LaPolt et al., 1990; Turner et al., 1989; Meunier et al., 1988), pero estas determinaciones no reflejan, necesariamente, la producción real de inhibina, ya que las cadenas β pueden dimerizar para formar activina.

En la actualidad no están disponibles inhibinas de rata purificadas o recombinantes para utilizar como referencia. Por lo tanto, los niveles absolutos de ambos dímeros no pueden determinarse, y los valores se expresan en términos de los respectivos standards humanos. El patrón de la secreción de inhibinas por células de granulosa estudiado, se presenta como veces de incremento de los basales correspondientes. Esta es una expresión más ajustada de la estimulación selectiva de cada inhibina por los factores ensayados, ya que los cambios en las relaciones deberían mantenerse cuando se determinen contra standard de inhibina de rata.

La producción de ambas inhibinas fue estimulada por FSH, con un efecto más pronunciado sobre inhibina A. Estudios

previos mostraban que las subunidades de inhibina son reguladas por esta gonadotrofina, actuando por una vía dependiente de AMPc (Eramaa et al., 1994; LaPolt et al., 1990; Turner et al., 1989).

La estimulación de la secreción de inhibinas por FSH fue bifásica. Este tipo de efectos bifásicos se ha observado para la interacción entre esta gonadotrofina e IGF-I, esteroides sexuales, TGF- β o activina sobre la proliferación de células de granulosa (Miró, Hillier, 1996; Bley et al., 1997; Bley et al., 1992). Por otra parte, se ha comunicado previamente una modulación bifásica de niveles de ARNm de las subunidades de inhibinas por PMSG (Michel et al., 1991). Este tipo de respuestas bifásicas para FSH se han atribuido a la activación de diferentes proteínas G por el receptor de FSH, un mecanismo que parece estar involucrado en la transducción de las acciones pleiotrópicas de isoformas de FSH (Arey et al., 1997). Los datos presentados sugerirían que, en el rango de concentraciones fisiológicas de FSH, cambiarían no sólo los niveles totales de inhibinas, sino también, la relación entre los dímeros.

El estradiol también fue capaz de estimular la producción de inhibina A con un efecto menor sobre inhibina B. Acciones estimuladoras de estrógenos sobre los niveles de ARNm de las subunidades α y β se han descrito previamente (Aloï et al., 1995).

La sensibilidad relativa de inhibina A y B a la estimulación por FSH fue afectada en forma marcada por IGF-I. El agregado de este factor de crecimiento, en presencia de dosis bajas de la gonadotrofina, provocó una disminución en la relación inhibina A/inhibina B. Li et al. (1998) han postulado que la señalización por IGF-I es obligatoria para la estimulación de la expresión de inhibina α por FSH en células de granulosa de rata. Los resultados presentados sugieren, además, que IGF-I puede regular la expresión relativa de ambas inhibinas por

modulación de la acción de FSH sobre los genes de la subunidad- β .

El TGF- β induce la secreción de ambas inhibinas pero con una clara estimulación preferencial por el dímero B. Se ha mostrado que el TGF- β aumenta la producción basal y estimulada por FSH de ambas inhibinas (Zhiwen et al., 1988), así como el contenido de ARNm de las subunidades α y βA en cultivos de células de granulosa de rata inmaduras. Más recientemente, Eramaa y Ritvos (1996) encontraron que el TGF- β induce la expresión de la subunidad βB en células granulosa-luteales humanas, sin afectar los niveles de los ARNm para las subunidades α y βA .

Los resultados presentados sugieren que las células de granulosa de rata difieren de las células de granulosa-luteales en que el efecto estimulador de TGF- β sobre la expresión de la subunidad βB debe ir acompañado de un aumento en la subunidad α para formar inhibina dimérica B. Asimismo, se encontró que la estimulación promovida por TGF- β fue amplificada por FSH. La regulación por TGF- β de la producción de inhibinas correlacionó con los niveles de ARNm correspondientes a las distintas subunidades de activina e inhibina.

Los transcriptos de las subunidades α y βA fueron estimuladas de manera similar por FSH y por TGF- β , mientras que el aumento de los niveles de ARNm de la subunidad βB mostró un efecto diferencial para TGF- β . Se han descrito previamente, dos mensajeros, que codifican para la cadena βB de 3.3 y 4.3 kb, tanto en el ovario como en el testículo. Estos dos transcriptos se originan a partir de sitios alternativos de la iniciación de la transcripción (Feng et al., 1995; Dykema, Mayo, 1994). El TGF- β ejerció su efecto estimulador principalmente sobre el ARNm de la subunidad βB de mayor tamaño.

La activina A fue aún más potente que TGF- β en la estimulación de la producción de inhibina B. Xiao y colaboradores (1992) demostraron que activina A recombinante incrementa de manera dosis-dependiente la producción de inhibina en células de granulosa de rata. Activina A es también

capaz de estimular la expresión de subunidad α en granulosa de rata (Kubo et al., 1998) mientras que en células de granulosa/luteales humanas, la activina puede, selectivamente, inducir la transcripción de βB (Eramaa et al., 1995).

El co-cultivo con ovocitos inmaduros también estuvo asociado a una estimulación selectiva de inhibina B, de forma similar a los efectos encontrados con TGF- β o activina. Como se describió en el capítulo correspondiente, un factor aún no identificado, probablemente perteneciente a la familia del TGF- β , producido por el ovocito, regula la función de células de granulosa. En particular, recientemente se ha demostrado que un nuevo miembro de esta superfamilia, el factor de crecimiento / diferenciación-9 (GDF-9) se expresa específicamente en el ovocito y se requiere para la folliculogénesis normal (Dong et al., 1996). El GDF-9 estimula el crecimiento del folículo y se ha descrito que es capaz de inducir la producción de la subunidad α de inhibina (Hayashi et al., 1999).

En el testículo, se ha descrito el papel de las células germinales en la regulación de la producción de inhibinas. La secreción de inhibina por las células de Sertoli es estimulada por la presencia de células germinales (Foucault et al., 1994; Pineau et al., 1990) y los niveles de subunidad α fluctúan en los estadios de espermatogénesis (Mather et al., 1997).

Sin embargo, los resultados presentados constituyen la primera demostración de un efecto específico del ovocito en la secreción de inhibinas por las células de granulosa, indicando que, regulaciones paracrinas similares existen en el ovario.

En las ratas inmaduras tratadas con estrógenos, de las cuales se aislaron las células de granulosa utilizadas para los estudios in vitro, la inhibina B fue la forma dimérica predominante. Esto contrasta con la alta relación inhibina A/B observada en cultivos de células de granulosa no tratados. Los valores séricos determinados coinciden con los niveles circulantes de inhibina A y B descritos (Woodruff et al., 1996).

Esta discrepancia entre las proporciones de inhibinas en suero y las producidas en células de granulosa aisladas sugiere que factores intraováricos, como los que fueron analizados, son capaces de desplazar la relación hacia la predominancia de la inhibina B.

Es importante señalar que el tratamiento con TGF- β , activina o el factor(es) derivado(s) del ovocito resultaron las únicas condiciones experimentales en las cuales la proporción relativa entre inhibina A y B disminuyó. Estos resultados podrían sugerir que el gen de la subunidad β B es un blanco específico de los péptidos de esta superfamilia.

Utilizando cultivos de células de granulosa de rata en estadios tempranos de diferenciación, se encontró que la producción de inhibina A es predominante. Se ha postulado que la inhibina B es característica de folículos preantrales tempranos, mientras que la inhibina A es preferencialmente secretada por células más diferenciadas de folículos antrales (Smitz, Cortvrindt, 1998; Fahy et al., 1995; Meunier et al., 1988; Woodruff et al., 1996). Los resultados que se obtuvieron indican que el cambio en la relación de inhibinas podría ser un reflejo del cambio en la concentración de reguladores intrafolículos.

Las inhibinas A y B podrían ejercer un efecto endócrino diferencial o tener acciones autocrinas/paracrinas diferentes. Sin embargo, hasta el momento, no se han descrito actividades biológicas diferenciales de ambos dímeros. Las inhibinas A y B son igualmente potentes en la atenuación de la secreción de FSH en bioensayos in vitro de células de hipófisis de rata, aunque células hipofisarias ovinas son relativamente insensibles a la inhibina B humana (Robertson et al., 1997). Si bien, a nivel ovárico, una comunicación preliminar indica que células tecales humanas presentan respuesta similar a ambos dímeros en la regulación de la producción de andrógenos (Hillier et al., 1997), son necesarios estudios adicionales para determinar si las inhibinas díméricas A y B

ejercen los mismos efectos paracrinos o autocrinos.

A diferencia de otros miembros de la familia del TGF- β , el conocimiento actual de los mecanismos celulares involucrados en la transducción de las señales por inhibina es limitado (Woodruff, 1999). En este sentido, la caracterización de sitios de unión de inhibina se realizaron utilizando inhibina A recombinante como trazador (Hertan et al., 1999; Draper et al., 1998). Estos sitios de unión resultan específicos para inhibina, no se compiten por TGF- β , ni por activina, pero no se analizó la especificidad para las distintas formas díméricas por competencia con inhibina B.

La pregunta que surge es, cuál podría ser el significado fisiológico de los cambios tan marcados en la relación de dos formas, con actividades aparentemente idénticas.

Una posibilidad sería que las inhibinas A y B fueran mediadores responsables de la sincronización de diferentes eventos durante el desarrollo folicular. De esta manera, cada inhibina respondería a diferentes señales ambientales actuando sobre las células de granulosa. La inhibina A sería más sensible a la estimulación por FSH durante etapas tardías del crecimiento folicular, mientras que la inhibina B reflejaría la acción de miembros de la superfamilia del TGF- β en folículos preantrales.

En este sentido es importante indicar que hemos encontrado una marcada estimulación de la producción de inhibina por ovocitos. En las mismas condiciones experimentales, los ovocitos pueden estimular el crecimiento de las células de la granulosa y este efecto decae con la maduración meiótica. Si ambas actividades son ejercidas por el mismo factor(es) se espera una observación similar, en la maduración meiótica del ovocito sobre la producción de inhibinas.

Por otra parte, se ha demostrado que las inhibinas pueden modular la maduración meiótica de ovocitos bovinos (Stock et al., 1997) y que en el cerdo los niveles de inhibina en el fluido folicular están

relacionados con el estadio de los ovocitos (Miller et al., 1991).

Estos datos, tomados en conjunto, apoyarían la idea de que la inhibina no sólo sirve como un marcador periférico para la progresión de la gametogénesis, regulando los niveles de FSH, sino también como un efector paracrino, mediando la interacción entre el ovocito y las células somáticas, durante la maduración meiótica.

8. Conclusiones

- El TGF- β es producido y convertido en su forma biológicamente activa por las células de la granulosa. La producción de este factor se encuentra regulada por gonadotrofinas y estrógenos. Por otra parte, actividad similar a TGF- β fue detectada en extractos de fluido folicular.
- El TGF- β estimula la síntesis de ADN en células de la granulosa, siendo este efecto amplificado por FSH.
- Las acciones mitogénicas autocrinas del medio condicionado por células de la granulosa son, al menos en parte, debidas al TGF- β . Otros factores secretados son capaces de modular sus efectos.
- La activina y el TGF- β compartirían mecanismos de señalización en células de la granulosa. Mientras que ambos péptidos ejercen similar acción sobre la esteroidogénesis, la activina promueve una respuesta mayor que el TGF- β sobre el crecimiento celular.
- Las células de la granulosa expresan los ARNm de las subunidades de activina y la acción autocrina de la proteína secretada se evidencia por la inhibición con follistatina.
- Las acciones mitogénicas de FSH sobre células de la granulosa sólo se evidencian cuando se encuentra en bajas concentraciones y en presencia de factores intraováricos.
- El TNF- α actúa como bloqueante de la acción de gonadotrofinas, tanto sobre la esteroidogénesis, como sobre el crecimiento de células ováricas.
- El ovocito cumple un rol activo en el desarrollo del folículo. Factores derivados del ovocito ejercen acciones paracrinas sobre las células de la granulosa, estimulando su proliferación.
- La actividad derivada del ovocito, si bien es similar a la de miembros de la familia del TGF- β , no es debida a factores de crecimiento conocidos, ni tampoco es idéntica al factor que promueve la expansión del cumulus.
- La secreción de inhibinas diméricas A y B es regulada de manera diferencial por hormonas y factores intrafoliculares.
- El TGF- β , la activina y el factor derivado del ovocito son los únicos estímulos encontrados que *in vitro* estimulan selectivamente la producción de inhibina B. La acción de miembros de la familia del TGF- β sería la responsable de la predominancia de la inhibina B encontrada *in vivo*.

9 Referencias

- Adashi EY (1990). The potential relevance of cytokines to ovarian physiology: The emerging role of resident ovarian cells of the white blood cell series. *Endocr Rev* 11: 454-464.
- Adashi EY (1993). The Intraovarian Insulin-Like Growth Factor System. In Adashi EY, Leung PCK(eds): "The Ovary". New York. Raven Press, Ltd. pp 319-335.
- Adashi EY, Hsueh AJW (1982). Estrogens augment the stimulation of ovarian aromatase activity by follicle-stimulating hormone in cultured rat granulosa cells. *J Biol Chem* 257: 6077-6082.
- Adashi EY, Resnick CE (1986). Antagonistic interactions of transforming growth factors in the regulation of granulosa cell differentiation. *Endocrinology* 119: 1879-1881.
- Adashi EY, Resnick CE, Croft CS, Payne DW (1989). Tumor Necrosis Factor α inhibits gonadotropin hormonal action in nontransformed ovarian granulosa cells. A modulatory noncytotoxic property. *J Biol Chem* 264: 11591-11597.
- Adashi EY, Resnick CE, D'Ercole J, Svoboda ME, van Wyk JJ (1985). Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocrine Reviews* 6: 400-419.
- Adashi EY, Resnick CE, Hernandez ER, Svoboda ME, van Wyk JJ (1988a). In vivo regulation of granulosa cell somatomedin-C/insulin-like growth factor I receptors. *Endocrinology* 122: 1383-1389.
- Adashi EY, Resnick CE, Hernandez ER, Svoboda ME, van Wyk JJ (1988b). 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.
- Adashi EY, Resnick CE, Packman JN, Hurwitz A, Payne DW (1990). Cytokine-mediated regulation of ovarian function: Tumor necrosis factor α inhibits gonadotropin-supported progesterone accumulation by differentiating and luteinized murine granulosa cells. *Am J Obstet Gynecol* 162: 889-899.
- Adashi EY, Rohan RM (1992). Intraovarian regulation: Peptidergic signaling systems. *Trends Endocrinol Metab* 3: 243-248.
- Aloi JA, Dalkin AC, Schwartz NB, Yasin M, Mann B, Haisenleder DJ, Marshall JC (1995). Ovarian inhibin subunit gene expression: Regulation by gonadotropins and estradiol. *Endocrinology* 136: 1227-1232.
- Aloi JA, Marshall JC, Yasin M, Gilrain JT, Haisenleder DJ, Dalkin AC (1997). Ovarian activin receptor subtype and follistatin gene expression in rats: reciprocal regulation by gonadotropins. *Biol Reprod* 56: 1565-1569.
- Amsterdam A, Koch Y, Lieberman ME, Lindner HR (1975). Distribution of binding sites for human chorionic gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat. *J Cell Biol* 67: 894-901.
- Andreani CL, Payne DW, Packman JN, Resnick CE, Hurwitz A, Adashi EY (1991). Cytokine-mediated regulation of ovarian function. Tumor necrosis factor α inhibits gonadotropin-supported ovarian androgen biosynthesis. *J Biol Chem* 266: 6761-6766.
- Arey BJ, Stevis PE, Deecher DC, Shen ES, Frail DE, Negro-Vilar A, Lopez FJ (1997). Induction of promiscuous G protein coupling of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor: a novel mechanism for transducing pleiotropic actions of FSH isoforms. *Mol Endocrinol* 11: 517-526.
- Armstrong DT, Papkoff H (1976). Stimulation of aromatization of exogenous and endogenous androgens in ovaries of hypophysectomized rat in vivo by follicle stimulating hormone. *Endocrinology* 99: 1144-1148.
- Arsura M, Wu M, Sonenshein GE (1996). TGF beta 1 inhibits NF- κ B/Rel activity inducing apoptosis of B cells: transcriptional activation of I kappa B alpha. *Immunity* 5: 31-40.
- Ashkenazi A, Dixit VM (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281: 1305-1308.
- Attisano L, Carcamo J, Ventura F, Weis FMB, Massague J, Wrana JL (1993). Identification of human activin and TGF- β type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell* 75: 671-680.
- Attisano L, Wrana JL, Montalvo E, Massagué J (1996). Activation of signalling by the activin receptor complex. *Mol Cell Biol* 16: 1066-1073.
- Baker TG (1963). A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc R Soc Lond [Biol]* 158: 417-428.
- Baker TG, Franchi LL (1967). The fine structure of oogonia and the oocytes in human ovaries. *J Cell Sci* 2: 213-221.
- Barañao JL, Bley MA, Batista FD, Glikin GC (1991). A DNA topoisomerase I inhibitor blocks the differentiation of rat granulosa cells induced by follicle-stimulating hormone. *Biochem J* 277: 557-560.

- Baraňao JL, Saragüeta PE, Colman Lerner A (1993). Effect of transforming growth factor beta (TGF- β) on granulosa cell DNA synthesis: modulation by hormones, growth factors and GnRH. *Endoc Soc 75 Ann.Meet.*: 491 (Abstract)
- Baraňao JLS, Hammond JM (1984). 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.
- Battegay EJ, Raines EW, Seifert RA, Bowen-Pope DF, Ross R (1990). TGF- β induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop. *Cell* 63: 515-524.
- Beers WH (1975). Follicular plasminogen and plasminogen activator and the effect of plasmin on ovarian follicle wall. *Cell* 6: 379-386.
- Bendell JJ, Dorrington J (1991). Estradiol-17 β stimulates DNA synthesis in rat granulosa cells: Action mediated by transforming growth factor- β . *Endocrinology* 128: 2663-2665.
- Bernath VA, Muro AF, Vitullo AD, Bley MA, Baraňao JL, Komblitt AR (1990). Cyclic AMP inhibit fibronectin gene expression in a newly developed granulosa cell line by a mechanism that suppresses cAMP-responsive element-dependent transcriptional activation. *J Biol Chem* 265: 18219-18226.
- Beutler B (1991). Cachectin/ tumor necrosis factor and lymphotoxin. In Sporn MB, Roberts AB (eds): "Peptide growth factors and their receptors". New York, Berlin, Heidelberg, London. Springer-Verlag; pp 39-70.
- Beutler B, van Hufel C (1994). Unraveling function in the TNF ligand and receptor families. *Science* 264: 667-668.
- Bhasin S, De Kretser DDM, Drew CR (1996). Measurement of circulating inhibin levels: Revisiting the inhibin hypothesis (Editorial). *J Clin Endocr Metab* 81: 1318-1320.
- Bhushan A, Lin HY, Lodish HF, Kintner CR (1994). The transforming growth factor β type II receptor can replace the activin type II receptor in inducing mesoderm. *Mol Cell Biol* 14: 4280-4285.
- Billig H, Furuta I, Hsueh AJW, Hsueh AJ (1993). Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 133: 2204-2212.
- Bley MA, Saragüeta PE, Baraňao JL (1997). Concerted stimulation of rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis by sex steroids and follicle-stimulating hormone. *J Steroid Biochem Mol Biol* 62: 11-19.
- Bley MA, Simón JC, Estévez AG, Jiménez de Asúa L, Baraňao JL (1992). Effect of follicle-stimulating hormone on insulin-like growth factor-I-stimulated rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology* 131: 1223-1229.
- Bley MA, Simón JC, Saragüeta PE, Baraňao JL (1991). Hormonal regulation of rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis: Effects of estrogens. *Biol Reprod* 44: 880-888.
- Bodensteiner KJ, Clay CM, Moeller CL, Sawyer HR (1999). Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biol Reprod* 60: 381-386.
- Bradbury JT (1960). Direct action of estrogen on the ovary of the immature rat. *Endocrinology* 68: 115-120.
- Brown PD, Wakefield LM, Levinson AD, Sporn MB (1990). Physicochemical activation of recombinant latent transforming growth factor-beta's 1, 2, and 3. *Growth Factors* 3: 35-43.
- Buccione R, Vanderhyden BC, Caron PJ, Eppig JJ (1990). FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus *in vitro* is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. *Dev Biol* 138: 16-25.
- Bugge TH, Kombrinck KW, Flick MJ, Daugherty CC, Danton MJ, Degen JL (1996). Loss of fibrinogen rescues mice from the pleiotropic effects of plasminogen deficiency. *Cell* 87: 709-719.
- Burger HG (1993). Evidence for a negative feedback role of inhibin in follicle stimulating hormone regulation in women. *Hum Reprod* 8 (Suppl 2): 129-132.
- Burger HG, Tiu SC, Bangah ML, De Kretser DM (1990). Human chorionic gonadotrophin raises serum immunoreactive inhibin levels in men with hypogonadotrophic hypogonadism. *Reprod Fertil Dev* 2: 137-144.
- Burghardt RC, Matheson RL (1982). Gap junction amplification in the rat ovarian granulosa cells. *Dev Biol* 94: 206-209.
- Butcher RL, Collins WE, Fugo NW (1974). Plasma concentrations of LH, FSH, prolactin, progesterone, and estradiol-17B throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 94: 1704-1708.
- Byers M, Kuiper GG, Gustafsson JA, Park-Sarge OK (1997). Estrogen receptor-beta mRNA expression in rat ovary: down-regulation by gonadotropins. *Mol Endocrinol* 11: 172-182.
- Byskov AG, Hoyer PE (1994). Embryology of Mammalian Gonads and Ducts. In Knobil E, Neill

- J, et al.(eds): "The Physiology of Reproduction." New York. Raven Press; pp 487-541.
- Canipari R, Epifano O, Siracusa G, Salustri A (1995). Mouse oocytes inhibit plasminogen activator production by ovarian cumulus and granulosa cells. *Dev Biol* 167: 371-378.
- Carcamo J, Weis FM, Ventura F, Wieser R, Wrana JL, Attisano L, Massague J (1994). Type I receptors specify growth-inhibitory and transcriptional responses to transforming growth factor beta and activin. *Mol Cell Biol* 14: 3810-3821.
- Carnegie JA (1990). Secretion of fibronectin by rat granulosa cells occurs primarily during early follicular development. *J Reprod Fertil* 89: 579-589.
- Carson RS, Findlay JK, Clarke IJ, Burger HG (1981). Estradiol, testosterone, and androstenedione in ovine follicular fluid during growth and atresia of ovarian follicles. *Biol Reprod* 24: 105-113.
- Chang N-S (1995). Transforming growth factor- β 1 induction of novel extracellular matrix proteins that trigger resistance to tumor necrosis factor cytotoxicity in murine L929 fibroblasts. *J Biol Chem* 270: 7765-7772.
- Channing CP, Bae I, Stone SL, Anderson LB, Edelson S, Fowler SC (1981). Porcine granulosa and cumulus cell properties. LH/hCG receptors, ability to secrete progesterone and ability to respond to LH. *Mol Cell Endocrinol* 22: 359-362.
- Chen H-L, Marcinkiewicz JL, Sancho-Tello M, Hunt JS, Terranova PF (1993). Tumor necrosis factor- α gene expression in mouse oocytes and follicular cells. *Biol Reprod* 48: 707-714.
- Chen X, Rubock MJ, Whitman M (1996). A transcriptional partner for MAD proteins in TGF-beta signalling. *Nature* 383: 691-696.
- Chen X, Weisberg E, Fridmacher V, Watanabe M, Naco G, Whitman M (1997). Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor. *Nature* 389: 85-89.
- Chen Y, Lebrun JJ, Vale W (1996). Regulation of transforming growth factor beta- and activin-induced transcription by mammalian Mad proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 12992-12997.
- Chiquoine HD (1960). The development of the zona pellucida of the mammalian ovum. *Am J Anat* 106: 149-153.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156-159.
- Chun S-Y, Billig H, Tilly JL, Furuta I, Tsafiri A, Hsueh AJW (1994). Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: Mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 135: 1845-1853.
- Clemmons DR (1990). Insulinlike growth factor binding proteins. *TEM* 1: 412-417.
- Colman-Lerner AA, Fischman ML, Lanuza GM, Bissell DM, Kombliht AR, Baraño JL (1999). Evidence for a role of the alternatively spliced ED-I sequence of fibronectin during ovarian follicular development. *Endocrinology* 140: 2542-2548.
- Corps AN, Brown KD (1993). Induction of DNA synthesis and cell division in quiescent cells in response to small peptide growth factors. In McKay I, Leigh I(eds). "Growth Factors. A Practical Approach." New York: Oxford University Press, pp 35-54.
- Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP, Bouck N (1998). Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell* 93: 1159-1170.
- Dain LB, Bley MA, Baraño JL, Tesone M (1993). Evidence for the production of a growth-inhibitory factor by human granulosa-luteal cells. *Mol Reprod Dev* 36: 159-163.
- Dajee M, Kazansky AV, Raught B, Hocke GM, Fey GH, Richards JS (1996). Prolactin induction of the α_2 -macroglobulin gene in rat ovarian granulosa cells: Stat 5 activation and binding to the interleukin-6 response element. *Molecular Endocrinology* 10: 171-184.
- Dallas SL, Miyazono K, Skerry TM, Mundy GR, Bonewald LF (1995). Dual role for the latent transforming growth factor- β binding protein in storage of latent TGF- β in the extracellular matrix and as a structural matrix protein. *J Cell Biol* 131: 539-549.
- Danielpour D, Dart LL, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB (1989). Immunodetection and quantitation of the two forms of transforming growth factor-beta (β 1 and β 2) secreted by cells in cultures. *J Cell Physiol* 138: 79-86.
- Danielpour D, Sporn MB (1990). Differential inhibition of transforming growth factor β 1 and β 2 activity by α_2 -macroglobulin. *J Biol Chem* 265: 6973-6977.
- Daopin S, Piez KA, Ogawa Y, Davies DR (1992). Crystal structure of transforming growth factor- β 2: An unusual fold for the superfamily. *Science* 257: 369-373.
- Darbon JM, Oury F, Laredo J, Bayard F (1989). Tumor necrosis factor- α inhibits follicle-stimulating hormone-induced differentiation in cultured rat

- granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 163: 1038-1046.
- De Kretser DM, McLachlan RI, Robertson DM, Burger HG (1989). Serum inhibin levels in normal men and men with testicular disorders. *J Endocrinol* 120: 517-523.
- Delbaere A, Sidis Y, Schneyer AL (1999). Differential Response to Exogenous and Endogenous Activin in a Human Ovarian Teratocarcinoma-Derived Cell Line (PA-1): Regulation by Cell Surface. *Endocrinology* 140: 2463-2470.
- DeLean A, Munson PJ, Rodbard D (1978). Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay and physiological dose-response curves. *Am J Physiol* 235: E97-E102.
- Dennis PA, Rifkin DB (1991). Cellular activation of latent transforming growth factor β requires binding to the cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor type II receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 580-584.
- Derynck R, Gelbart WM, Harland RM, Heldin CH, Kern SE, Massague J, Melton DA, Mlodzik M, Padgett RW, Roberts AB, et al. (1996). Nomenclature: vertebrate mediators of TGF β family signals [letter]. *Cell* 87: 173
- Derynck R, Zhang Y, Feng XH (1998). Smads: transcriptional activators of TGF- β responses. *Cell* 95: 737-740.
- Dierich A, Sairam MR, Monaco L, Fimia GM, Gansmuller A, LeMeur M, Sassone-Corsi P (1998). Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: Targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13612-13617.
- Dodson WC, Schomberg DW (1987). The effect of transforming growth factor- β on follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 120: 512-516.
- Doi M, Igarashi M, Hasegawa Y, Eto Y, Shibai H, Miura T, Ibuki Y (1992). *In vivo* action of activin-A on pituitary-gonadal system. *Endocrinology* 130: 139-144.
- Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 383: 531-535.
- Dorington JH, Chuma AV, Bendell JJ (1988). Transforming growth factor β and follicle stimulating hormone promote rat granulosa cell proliferation. *Endocrinology* 123: 353-359.
- Draper LB, Matzuk MM, Roberts VJ, Cox E, Weiss J, Mather JP, Woodruff TK (1998). Identification of an inhibin receptor in gonadal tumors from inhibin alpha-subunit knockout mice. *J Biol Chem* 273: 398-403.
- Dressler KA, Mathias S, Kolesnick RN (1992). Tumor necrosis factor- α activates the sphingomyelin signal transduction pathway in a cell-free system. *Science* 255: 1715-1718.
- Dreyfus M, Dardik R, Suh BS, Amsterdam A, Lahav J (1992). Differentiation-controlled synthesis and binding of thrombospondin to granulosa cells. *Endocrinology* 130: 2565-2570.
- Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ, Matzuk MM (1998). The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Mol Endocrinol* 12: 1809-1817.
- Dykema JC, Mayo KE (1994). Two messenger ribonucleic acids encoding the common β -chain of inhibin and activin have distinct 5'-initiation sites and are differentially regulated in rat granulosa cells. *Endocrinology* 135: 702-711.
- Ebner R, Chen R-H, Lawler S, Zioncheck T, Derynck R (1993). Determination of type I receptor specificity by the type II receptors for TGF- β or activin. *Science* 262: 900-902.
- Edwards RG (1974). Follicular Fluid. *J Reprod Fertil* 37: 189-219.
- Edwards RG, Fowler RE, Gore-Langton RE, Gosden RG, Jones EC, Readhead C, Steptoe PC (1977). Normal and abnormal follicular growth in mouse, rat and human ovaries. *J Reprod Fertil* 51: 237-263.
- El-Fouly MA, Cook B, Nekola M, Nalbandov AV (1970). Role of the ovum in follicular luteinization. *Endocrinology* 87: 288-293.
- Eppig JJ (1982). The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation, and cumulus expansion. *Dev Biol* 89: 268-272.
- Eppig JJ (1993). Regulation of mammalian oocyte maturation. In Adashi EY, Leung PCK (eds): "The Ovary". New York. Raven Press; pp 185-208.
- Eppig JJ, O'Brien M, Wigglesworth K (1996). Mammalian oocyte growth and development in vitro. *Mol Reprod Dev* 44: 260-273.
- Eppig JJ, Peters AH, Telfer EE, Wigglesworth K (1993). Production of cumulus expansion enabling factor by mouse oocytes grown in vitro: preliminary characterization of the factor. *Mol Reprod Dev* 34: 450-456.
- Eppig JJ, Schultz RM, O'Brien M, Chesnel F (1994). Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* 164: 1-9.
- Epstein-Almog R, Ory J (1985). Inhibition of hormone-induced steroidogenesis during cell

- proliferation in serum-free cultures of rat granulosa cells. *Endocrinology* 116: 2103-2112.
- Eramaa M, Hilden K, Tuuri T, Ritvos O (1995). Regulation of inhibin/activin subunit messenger ribonucleic acids (mRNAs) by activin A and expression of activin receptor mRNAs in cultured human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 136: 4382-4389.
- Erämaa M, Ritvos O (1996). Transforming growth factor- β 1 and - β 2 induce inhibin and activin β B subunit messenger ribonucleic acid levels in cultured human granulosa-luteal cells. *Fertil Steril* 65: 954-960.
- Eramaa M, Tuuri T, Hilden K, Ritvos O (1994). Regulation of inhibin alpha- and beta A-subunit messenger ribonucleic acid levels by chorionic gonadotropin and recombinant follicle-stimulating hormone in cultured human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 1670-1677.
- Erickson GF, Chung DG, Sit A, DePaolo LV, Shimasaki S, Ling N (1995). Follistatin concentrations in follicular fluid of normal and polycystic ovaries. *Hum Reprod* 10: 2120-2124.
- Erickson GF, Hsueh AJW (1978). Stimulation of aromatase activity by follicle stimulating hormone in rat granulosa cells in vivo and in vitro. *Endocrinology* 102: 1275-1282.
- Erickson GF, Wang C, Hsueh AJW (1979). FSH induction of functional LH receptors in granulosa cells cultured in a chemically defined medium. *Nature* 279: 336-338.
- Evans LW, Muttukrishna S, Groome NP (1998). Development, validation and application of an ultra-sensitive two-site enzyme immunoassay for human follistatin. *J Endocrinol* 156: 275-282.
- Everett J (1964). Central neural control of reproductive functions of the adenohipophysis. *Phys Rev* 44: 373-431.
- Everett J (1994). Pituitary and hypothalamus: perspectives and overview. In Knobil E, Neill J(eds): "The Physiology of Reproduction". New York. Raven Press; pp 1509-1526.
- Fahy PA, Wilson CA, Beard AJ, Groome NP, Knight PG (1995). Changes in inhibin-A (α - β A dimer) and total A inhibin in the peripheral circulation and ovaries of rats after gonadotrophin-induced follicular development and during the normal oestrous cycle. *J Endocrinol* 147: 271-283.
- Fang J, Wang SQ, Smiley E, Bonadio J (1997). Genes coding for mouse activin beta C and beta E are closely linked and exhibit a liver-specific expression pattern in adult tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 231: 655-661.
- Feige JJ, Negoescu A, Keramidas M, Souhelitskiy S, Chambaz EM (1996). α 2-Macroglobulin: A binding protein for transforming growth factor- β and various cytokines. *Horm Res* 45: 227-232.
- Feng P, Catt KJ, Knecht M (1986). Transforming growth factor β regulates the inhibitory action of epidermal growth factor during granulosa cell differentiation. *J Biol Chem* 261: 14167-14170.
- Feng ZM, Wu AZ, Chen CL (1995). Characterization and regulation of two testicular inhibin/activin β B-subunit messenger ribonucleic acids that are transcribed from alternate initiation sites. *Endocrinology* 136: 947-955.
- Findlay JK (1993). An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol Reprod* 48: 15-23.
- Fitzpatrick SL, Richards JS (1994). Identification of a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-response element in the rat aromatase promoter that is required for transcriptional activation in rat granulosa cells and R2C Leydig cells. *Mol Endocrinol* 8: 1309-1319.
- Flaumenhaft R, Abe M, Mignatti P, Rifkin DB (1992). Basic fibroblast growth factor-induced activation of latent transforming growth factor beta in endothelial cells: regulation of plasminogen activator activity. *J Cell Biol* 118: 901-909.
- Fortune JE, Armstrong DT (1977). Androgen production by theca and granulosa isolated from proestrus rat follicles. *Endocrinology* 100: 1341-1347.
- Foucault P, Drosowsky MA, Carreau S (1994). Germ cell and Sertoli cell interactions in human testis: evidence for stimulatory and inhibitory effects. *Hum Reprod* 9: 2062-2068.
- Fritz MA, Speroff L (1982). The endocrinology of the menstrual cycle, the interaction of folliculogenesis and neuroendocrine mechanisms. *Fertil Steril* 38: 509-511.
- Fujiwara H, Kataoka N, Honda T, Ueda M, Yamada S, Nakamura K, Suginami H, Mori T, Maeda M (1998). Physiological roles of integrin α 6 β 1 in ovarian functions. *Horm Res* 50 Suppl 2: 25-29.
- Gaddy-Kurten D, Hickey GJ, Fey GH, Gaudie J, Richards JS (1989). Hormonal regulation and tissue-specific localization of alpha 2-macroglobulin in rat ovarian follicles and corpora lutea. *Endocrinology* 125: 2985-2995.
- Gay VL, Midgley Jr. AR, Niswender GD (1970). Patterns of gonadotropin secretion associated with ovulation. *Federation Proc* 29: 1880-1887.
- Ghiglieri C, Khatchadourian C, Tabone E, Hendrick JC, Benahmed M, Ménéz Y (1995). Immunolocalization of transforming growth factor- β 1 and transforming growth factor- β 2 in the mouse

- ovary during gonadotrophin-induced follicular maturation. *Hum Reprod* 10: 2115-2119.
- Goldenberg RL, Vaitukaitis JL, Ross GT (1972). Estrogen and follicle stimulating hormone interactions on follicle growth in rats. *Endocrinology* 90: 1492-1498.
- Golding NB, Ory J (1985). Concerted metabolism of steroids hormones produced by cocultured ovarian cells types. *J Biol Chem* 260: 913-921.
- Gore-Langton RE, Armstrong DT (1988). Follicular Steroidogenesis and its Control. In Knobil E, Neill J(eds): "The Physiology of Reproduction". New York. Raven Press, Ltd; pp 331-385.
- Greenwald GS, Roy SK (1994). Follicular development and its control. In Knobil E, Neill JD, Greenwald GS, Markert CL, Pfaff DW(eds): "The Physiology of Reproduction". New York. Raven Press; pp 629-724.
- Groome N (1991). Ultrasensitive two-site assays for inhibin-A and activin-A using monoclonal antibodies raised to synthetic peptides. *J Immunol Methods* 145: 65-69.
- Groome N, O'Brien M (1993). Immunoassays for inhibin and its subunits. Further applications of the synthetic peptide approach. *J Immunol Methods* 165: 167-176.
- Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Cooke I, Ganesan TS, Baird DT, McNeilly AS (1994). Detection of dimeric inhibin throughout the human menstrual cycle by two-site enzyme immunoassay. *Clin Endocrinol (Oxf)* 40: 717-723.
- Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Pai R, Rodger FE, Mather JP, McNeilly AS (1996). Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 1401-1405.
- Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Priddle J, Weaver K, McNeilly AS (1995). Quantification of inhibin pro- α C-containing forms in human serum by a new ultrasensitive two-site enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 2926-2932.
- Guoliang X, Byskov AG, Andersen CY (1994). Cumulus cells secrete a meiosis-inducing substance by stimulation with forskolin and dibutyric cyclic adenosine monophosphate. *Mol Reprod Dev* 39: 17-24.
- Hagglund AC, Ny A, Liu K, Ny T (1996). Coordinated and cell-specific induction of both physiological plasminogen activators creates functionally redundant mechanisms for plasmin formation during ovulation. *Endocrinology* 137: 5671-5677.
- Ham AW (1965). *Histology*. Philadelphia, Montreal. Lippincott.
- Hammond JM, Baraňao JLS, Skalenis D, Knight AB, Romanus J, Rechler MM (1985). Production of insulin-like growth factors by ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 117: 2553-2555.
- Hammond JM, English HF (1987). Regulation of deoxyribonucleic acid synthesis in cultured porcine granulosa cells by growth factors and hormones. *Endocrinology* 120: 1039-1046.
- Hammond JM, Hsu C, Klindt J, Tsang BK, Downey BR (1988). Gonadotropins increase concentrations of immunoreactive insulin-like growth factor-I in porcine follicular fluid in vivo. *Biol Reprod* 38: 304-308.
- Hashimoto O, Nakamura T, Shoji H, Shimasaki S, Hayashi Y, Sugino H (1997). A novel role of follistatin, an activin-binding protein, in the inhibition of activin action in rat pituitary cells. Endocytotic degradation of activin and its acceleration by follistatin associated with cell-surface heparan sulfate. *J Biol Chem* 272: 13835-13842.
- Hayashi M, McGee EA, Min G, Klein C, Rose UM, Van Duin M, Hsueh AJW (1999). Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology* 140: 1236-1244.
- Heldin CH, Miyazono K, Ten Dijke P (1997). TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390: 465-471.
- Hernandez ER, Roberts CT, LeRoith D, Adashi EY (1989). 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.
- Hertan R, Farnworth PG, Fitzsimmons KL, Robertson DM (1999). Identification of high affinity binding sites for inhibin on ovine pituitary cells in culture. *Endocrinology* 140: 6-12.
- Hillier SG, Miró F, Mather JP, Thong KJ (1997). Comparison of the effects of the inhibin-A and inhibin-B on androgen production by human theca cells *in vitro*. In Fauser BCJM (ed): "FSH action and intraovarian regulation". New York, London. The Parthenon Publishing Group; pp 137-144.
- Hillier SG, Yong EL, Illingworth PJ, Baird DT, Schwall RH, Mason AJ (1991a). Effect of recombinant inhibin on androgen synthesis in cultured human thecal cells. *Mol Cell Endocrinol* 75: R1-R6.
- Hillier SG, Yong EL, Illingworth PJ, Baird DT, Schwall RH, Mason AJ (1991b). Effect of recombinant activin on androgen synthesis in cultured human thecal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 72: 1206-1211.

- Hirshfield AN (1986). Patterns of [3H] thymidine incorporation differ in immature rats and mature, cycling rats. *Biol Reprod* 34: 229-235.
- Hirshfield AN (1989). Granulosa cell proliferation in very small follicles of cycling rats studied by long-term continuous tritiated-thymidine infusion. *Biol Reprod* 41: 309-316.
- Hirshfield AN (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 124: 43-101.
- Hirshfield AN (1994). Relationship between the supply of primordial follicles and the onset of follicular growth in rats. *Biol Reprod* 50: 421-428.
- Hirshfield AN, Midgley AR, Jr. (1978). Morphometric analysis of follicular development in the rat. *Biol Reprod* 19: 597-605.
- Honda T, Fujiwara H, Yamada S, Fujita K, Nakamura K, Nakayama T, Higuchi T, Ueda M, Maeda M, Mori T (1997). Integrin $\alpha 5$ is expressed on human luteinizing granulosa cells during corpus luteum formation, and its expression is enhanced by human chorionic gonadotrophin in vitro. *Mol Hum Reprod* 3: 979-984.
- Hoodless PA, Haerry T, Abdollah S, Stapleton M, O'Connor MB, Attisano L, Wrana JL (1996). MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways. *Cell* 85: 489-500.
- Hsu CY, Hammond JM (1987). Gonadotropins and estradiol stimulate immunoreactive insulin-like growth factor-I production by porcine granulosa cells in vitro. *Endocrinology* 120: 198-207.
- Hsueh AJW, Adashi EY, Jones PBC, Welsh THJ (1984). Hormonal regulation of differentiation of cultured granulosa cells. *Endocrine Reviews* 5: 76-127.
- Hsueh AJW, Billig H, Tsafirni A (1994). Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Reviews* 15: 707-724.
- Hsueh AJW, Dahl KD, Vaughan J, Tucker E, Rivier J, Bardin CW, Vale W (1987). Heterodimers and homodimers of inhibin subunits have different paracrine action in the modulation of luteinizing hormone-stimulated androgen biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 5082-5090.
- Hu PP, Datto MB, Wang XF (1998). Molecular mechanisms of transforming growth factor-beta signaling. *Endocr Rev* 19: 349-363.
- Huang EJ, Manova K, Packer AI, Sanchez S, Bachvarova RF, Besmer P (1993). The murine steel panda mutation affects kit ligand expression and growth of early ovarian follicles. *Dev Biol* 157: 100-109.
- Hume DA, Halpin D, Charlton H, Gordon S (1984). The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80: macrophages of endocrine organs. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 4174-4180.
- Hutchinson LA, Findlay JK, de Vos FL, Robertson DM (1987). Effects of bovine inhibin, transforming growth factor-beta and bovine Activin-A on granulosa cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 146: 1405-1412.
- Illingworth PJ, Groome NP, Byrd W, Rainey WE, McNeilly AS, Mather JP, Bremner WJ (1996). Inhibin-B: a likely candidate for the physiologically important form of inhibin in men. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 1321-1325.
- Ingraham DL (1959). The effect of gonadotropins and oestrogen on ovarian atresia in the immature rat. *J Endocrinol* 19: 117-120.
- Ireland JJ, Richards JS (1978). Acute effects of estradiol and FSH on specific binding of human [125I]iodo FSH to rat ovarian granulosa cells in vivo and in vitro. *Endocrinology* 102: 876-883.
- Ismail RS, Okawara Y, Fryer JN, Vanderhyden BC (1996). Hormonal regulation of the ligand for *c-kit* in the rat ovary and its effects on spontaneous oocyte meiotic maturation. *Mol Reprod Dev* 43: 458-469.
- Jäättelä M, Ilvesmaki V, Voutilainen R, Stenman UH, Voutilainen R, Saksela E (1991). Tumor necrosis factor as a potent inhibitor of adrenocorticotropin induced cortisol production and steroidogenic P450 enzyme gene expression in cultured human fetal adrenal cells. *Endocrinology* 128: 623-629.
- Johansson BM, Wiles MV (1995). Evidence for involvement of activin A and bone morphogenetic protein 4 in mammalian mesoderm and hematopoietic development. *Mol Cell Biol* 15: 141-151.
- Juneja SC, Chegini N, Stan Williams R, Ksander GA (1996). Ovarian intrabursal administration of Transforming growth factor $\beta 1$ inhibits follicle rupture in gonadotropin-primed mice. *Biol Reprod* 55: 1444-1451.
- Kaipia A, Chun SY, Eisenhauer K, Hsueh AJW (1996). Tumor necrosis factor- α and its second messenger, ceramide, stimulate apoptosis in cultured ovarian follicles. *Endocrinology* 137: 4864-4870.
- Karakji EG, Tsang BK (1995). Regulation of rat granulosa cell plasminogen activator system: Influence of interleukin-1 β and ovarian follicular development. *Biol Reprod* 53: 1302-1310.
- Kennedy RL, Jones TH (1991). Cytokines in endocrinology: their roles in health and in disease. *J Endocrinol* 129: 167-178.
- Knecht M, Feng P, Catt KJ (1987). Bifunctional role of transforming growth factor-beta during

- granulosa cell development. *Endocrinology* 120: 1243-1249.
- Knight PG, Beard AJ, Wrathall JH, Castillo RJ (1989). Evidence that the bovine ovary secretes large amounts of monomeric inhibin alpha subunit and its isolation from bovine follicular fluid. *J Mol Endocrinol* 2: 189-200.
- Knight PG, Muttukrishna S, Groome NP (1996). Development and application of a two-site enzyme immunoassay for the determination of 'total' activin-A concentrations in serum and follicular fluid. *J Endocrinol* 148: 267-279.
- Kolesnick R, Golde DW (1994). The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling. *Cell* 77: 325-328.
- Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD (1988). A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 53: 45-53.
- Krohn PL (1967). Factors influencing the number of oocytes in the ovary. *Arch Anat Microscop Morphol Exp* 56: 151-159.
- Kubo T, Shimasaki S, Kim H, Li D, Erickson GF (1998). Activin-induced inhibin alpha-subunit production by rat granulosa cells requires endogenous insulin-like growth factor-I. *Biol Reprod* 58: 712-718.
- Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM (1997). Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet* 15: 201-204.
- Kuo ML, Chen CW, Jee SH, Chuang SE, Cheng AL (1997). Transforming growth factor beta1 attenuates ceramide-induced CPP32/Yama activation and apoptosis in human leukaemic HL-60 cells. *Biochem J* 327: 663-667.
- Kuroda H, Terada N, Nakayama H, Matsumoto K, Kitamura Y (1988). Infertility due to growth arrest of ovarian follicles in the *Sl/Sl* mice. *Dev Biol* 126: 71-79.
- Labarca C, Paigen K (1990). A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem* 102: 344-352.
- Laemli UK (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou A, Massague J (1996). Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature* 383: 832-836.
- LaPolt PS, Piquette GN, Soto D, Sincich C, Hsueh AJ (1990). Regulation of inhibin subunit messenger ribonucleic acid levels by gonadotropins, growth factors, and gonadotropin-releasing hormone in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 127: 823-831.
- Lebrun JJ, Takabe K, Chen Y, Vale W (1999). Roles of pathway-specific and inhibitory Smads in activin receptor signaling. *Mol Endocrinol* 13: 15-23.
- Lebrun JJ, Vale WW (1997). Activin and inhibin have antagonistic effects on ligand-dependent heteromerization of the type I and type II activin receptors and human erythroid differentiation. *Mol Cell Biol* 17: 1682-1691.
- Leibfried L, First NL (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J Anim Sci* 48: 76-86.
- Lenton EA, De Kretser DM, Woodward AJ, Robertson DM (1991). Inhibin concentrations throughout the menstrual cycles of normal, infertile, and older women compared with those during spontaneous conception cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 73: 1180-1190.
- Lerner AAC, Salamone DF, Chiappe ME, Barañao JL (1995). Comparative studies between freshly isolated and spontaneously immortalized bovine granulosa cells: Protein secretion, steroid metabolism, and responsiveness to growth factors. *J Cell Physiol* 164: 395-403.
- Letterio JJ, Geiser AG, Kulkarni AB, Roche NS, Sporn MB, Roberts AB (1994). Maternal rescue of transforming growth factor- β 1 null mice. *Science* 264: 1936-1938.
- Li D, Kubo T, Kim H, Shimasaki S, Erickson GF (1998). Endogenous insulin-like growth factor-I is obligatory for stimulation of rat inhibin alpha-subunit expression by follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod* 58: 219-225.
- Li M, Karakji EG, Xing R, Fryer JN, Carnegie JA, Rabbani SA, Tsang BK (1997). Expression of urokinase-type plasminogen activator and its receptor during ovarian follicular development. *Endocrinology* 138: 2790-2799.
- Li R, Phillips DM, Mather JP (1995). Activin promotes ovarian follicle development *in vitro*. *Endocrinology* 136: 849-856.
- Li R, Phillips DM, Moore A, Mather JP (1997). Follicle-stimulating hormone induces terminal differentiation in a predifferentiated rat granulosa cell line (ROG). *Endocrinology* 138: 2648-2657.
- Lopez-Casillas F, Wrana JL, Massague J (1993). Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell* 73: 1435-1444.
- Louvet JP, Vaitukaitis JL (1976). Induction of follicle-stimulating hormone (FSH) receptors in rat ovaries by estrogen priming. *Endocrinology* 99: 758-762.

- Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O (1993). Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 11162-11166.
- Lyons RM, Gentry LE, Purchio AF, Moses HL (1990). Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor β 1 by plasmin. *J Cell Biol* 110: 1361-1367.
- Machelon V, Nome F, Durand-Gasselin I, Emilie D (1997). Tumor necrosis factor- α induces interleukin-6 mRNA and protein in human granulosa luteinizing cells via protein tyrosine kinase without involving ceramide. *Mol Cell Endocrinol* 126: 173-184.
- Magnusson C, Billing H, Aneroth P, Roos p, Hillensjö T (1982). Comparison between the progesterin secretion responsiveness to gonadotropin of rat cumulus and mural granulosa cells in vitro. *Acta Endocr* 101: 611-616.
- Magoffin DA, Jakimiuk AJ (1997). Inhibin A, inhibin B and activin A in the follicular fluid of regularly cycling women. *Hum Reprod* 12: 1714-1719.
- Majno G, Joris I (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146: 3-15.
- Mann JS, Kindy MS, Edwards DR, Curry TE, Jr. (1991). Hormonal regulation of matrix metalloproteinase inhibitors in rat granulosa cells and ovaries. *Endocrinology* 128: 1825-1832.
- Marcinkiewicz JL, Krishna A, Cheung CMY, Terranova PF (1994). Oocytic tumor necrosis factor α : Localization in the neonatal ovary and throughout follicular development in the adult rat. *Biol Reprod* 50: 1251-1260.
- Martens JW, De Winter JP, Timmerman MA, McLuskey A, Van Schaik RH, Themmen AP, De Jong FH (1997). Inhibin interferes with activin signaling at the level of the activin receptor complex in Chinese hamster ovary cells. *Endocrinology* 138: 2928-2936.
- Mason AJ, Hayflick JS, Zoeller RT, Young WS, Phillips HS, Nikolics K, Seeburg PH (1986). A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the *hpg* mouse. *Science* 234: 1366-1371.
- Massagué J (1990). The transforming growth factor- β family. *Annu Rev Cell Biol* 6: 597-641.
- Massague J (1992). Receptors for the TGF- β family. *Cell* 69: 1067-1070.
- Massague J (1996). TGF- β signaling: receptors, transducers, and Mad proteins. *Cell* 85: 947-950.
- Massagué J, Attisano L, Wrana JL (1994). The TGF- β family and its composite receptors. *Trends Cell Biol* 4: 172-178.
- Mather JP (1996). Follistatins and α ₂-macroglobulin are soluble binding proteins for inhibin and activin. *Horm Res* 45: 207-210.
- Mather JP, Moore A, Li RH (1997). Activins, inhibins, and follistatins: further thoughts on a growing family of regulators. *Proc Soc Exp Biol Med* 215: 209-222.
- Mather JP, Roberts PE, Krummen LA (1993). Follistatin modulates activin activity in a cell- and tissue-specific manner. *Endocrinology* 132: 2732-2734.
- Matzuk MM, Finegold MJ, Su JJ, Hsueh AJW, Bradley A (1992). α -Inhibin is a tumor-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature* 360: 313-319.
- Matzuk MM, Kumar TR, Vasalli A, Bickenbach JR, Roop DR, Jaenisch R, Bradley A (1995). Functional analysis of activins during mammalian development. *Nature* 374: 354-356.
- Mauduit C, Gasnier F, Rey C, Chauvin MA, Stocco DM, Louisot P, Benahmed M (1998). Tumor necrosis factor- α inhibits leydig cell steroidogenesis through a decrease in steroidogenic acute regulatory protein expression. *Endocrinology* 139: 2863-2868.
- Mauduit C, Jaspar JM, Poncelet E, Charlet C, Revol A, Franchimont P, Benahmed M (1993). Tumor necrosis factor- α antagonizes follicle-stimulating hormone action in culture Sertoli cells. *Endocrinology* 133: 69-76.
- May JV, Frost JP, Schomberg DW (1988). Differential effects of epidermal growth factor, somatomedin-C/insulin-like growth factor I, and transforming growth factor- β on porcine granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation. *Endocrinology* 123: 168-179.
- Mayo KE (1994). Inhibin and activin: Molecular aspects of regulation and function. *Trends Endocrinol Metab* 5: 407-415.
- McCullagh DR (1932). Dual endocrine activity of the testis. *Science* 76: 19-23.
- McFarlane JR, Foulds LM, Pisciotto A, Robertson DM, De Kretser DM (1996). Measurement of activin in biological fluids by radioimmunoassay, utilizing dissociating agents to remove the interference of follistatin. *Eur J Endocrinol* 134: 481-489.
- McGrath SA, Esqueda AF, Lee SJ (1995). Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol* 9: 131-136.
- McLachlan RI, Robertson DM, Burger HG, De Kretser DM (1986). The radioimmunoassay of

- bovine and human follicular fluid and serum inhibin. *Mol Cell Endocrinol* 46: 175-185.
- McMahon GA, Dignam JD, Gentry LE (1996). Structural characterization of the latent complex between transforming growth factor β 1 and β 1-latency-associated peptide. *Biochem J* 313: 343-351.
- McPherron AC, Lee SJ (1995). GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor-beta superfamily containing a novel pattern of cysteines. *J Biol Chem* 268: 3444-3449.
- Merk FB, Botticelli CR, Albrigh JT (1972). An intercellular response to estrogen by granulosa cells in the rat ovary; an electron microscope study. *Endocrinology* 90: 992-998.
- Meunier H, Cajander SB, Roberts VJ, Rivier C, Sawchenko PE, Hsueh AJ, Vale W (1988). Rapid changes in the expression of inhibin alpha-, beta A-, and beta B- subunits in ovarian cell types during the rat estrous cycle. *Mol Endocrinol* 2: 1352-1363.
- Michel U, Krozowski Z, McMaster J, Jinghua Y, Findlay JK (1991). The biphasic modulation of inhibin mRNA levels and secretion by PMSG in rat granulosa cells *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* 3: 215-226.
- Michell RH, Wakelam MJO (1994). Second messengers: Sphingolipid signalling. *Curr Biol* 4: 370-373.
- Miller KF, Xie S, Pope WF (1991). Immunoreactive inhibin in follicular fluid is related to meiotic stage of the oocyte during final maturation of the porcine follicle. *Mol Reprod Dev* 28: 35-39.
- Minegishi T, Tano M, Nakamura K, Nakamura M, Igarashi S, Ito I, Shinozaki H, Karino S, Ibuki Y, Miyamoto K (1996). Regulation of follicle-stimulating hormone receptor. *Horm Res* 46 Suppl 1: 37-44.
- Miró F, Hillier SG (1996). Modulation of granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis and differentiation by activin. *Endocrinology* 137: 464-468.
- Miyazono K, Heldin CH (1991). Latent forms of TGF-beta: molecular structure and mechanisms of activation. *Ciba Found Symp* 157: 81-9; discussion 89-92.
- Moses HL, Serra R (1996). Regulation of differentiation by TGF-beta. *Curr Opin Genet Dev* 6: 581-586.
- Mulheron GW, Danielpour D, Schomberg DW (1991). Rat thecal/interstitial cells express transforming growth factor- β type 1 and 2, but only type 2 is regulated by gonadotropin *in vitro*. *Endocrinology* 129: 368-374.
- Mulheron GW, Mulheron JG, Danielpour D, Schomberg DW (1992). Porcine granulosa cells do not express transforming growth factor- β 2 (TGF- β 2) messenger ribonucleic acid: molecular basis for their inability to produce TGF- β activity comparable to that of rat granulosa cells. *Endocrinology* 131: 2609-2614.
- Mulheron GW, Schomberg DW (1990). Rat granulosa cells express transforming growth factor- β type 2 messenger ribonucleic acid which is regulatable by follicle-stimulating hormone *in vitro*. *Endocrinology* 126: 1777-1779.
- Munger JS, Harpel JG, Gleizes PE, Mazzieri R, Nunes I, Rifkin DB (1997). Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int* 51: 1376-1382.
- Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, Pittet JF, Kaminski N, Garat C, Matthay MA, et al. (1999). The integrin α v β 6 binds and activates latent TGF- β 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 96: 319-328.
- Murphy LJ, Bell GI, Friesen HG (1987). Tissue distribution of insulin-like growth factor I and II messenger ribonucleic acid in the adult rat. *Endocrinology* 120: 1279-1282.
- Nagata S (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* 88: 355-365.
- Nakamura M, Nakamura K, Igarashi S, Tano M, Miyamoto K, Ibuki Y, Minegishi T (1995). Interaction between activin A and cAMP in the induction of FSH receptor in cultured rat granulosa cells. *J Endocrinol* 147: 103-110.
- Nakamura T, Sugino K, Titani K, Sugino H (1991). Follistatin, an activin-binding protein, associates with heparan sulfate chains of proteoglycans on follicular granulosa cells. *J Biol Chem* 266: 19432-19437.
- Nakamura T, Takio K, Eto Y, Shibai H, Titani K, Sugino H (1990). Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science* 247: 836-838.
- Nakao A, Imamura T, Soucheinytskyi S, Kawabata M, Ishisaki A, Oeda E, Tamaki K, Hanai J, Heldin CH, Miyazono K, et al. (1997). TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J* 16: 5353-5362.
- Naz RK, Zhu X, Menge AC (1997). Expression of tumor necrosis factor-alpha and its receptors type I and type II in human oocytes. *Mol Reprod Dev* 47: 127-133.
- Niemuller CA, Randall KJ, Webb DJ, Gonias SL, LaMarre J (1995). α ₂-macroglobulin conformation determines binding affinity for activin A and plasma clearance of activin A α ₂-macroglobulin complex. *Endocrinology* 136: 5343-5349.

- Norman RJ, Brännström M (1996). Cytokines in the ovary: Pathophysiology and potential for pharmacological intervention. *Pharmacol Ther* 69: 219-236.
- Nussdorfer GG, Mazzocchi G (1998). Immune-endocrine interactions in the mammalian adrenal gland: facts and hypotheses. *Int Rev Cytol* 183: 143-184.
- Obeid LM, Linardic CM, Karolak LA, Hannun YA (1993). Programmed cell death induced by ceramide. *Science* 259: 1769-1771.
- Oh SP, Li E (1997). The signaling pathway mediated by the type IIB activin receptor controls axial patterning and lateral asymmetry in the mouse. *Genes Dev* 11: 1812-1826.
- Oliver JE, Aitman TJ, Powell JF, Wilson CA, Clayton RN (1989). Insulin-like growth factor expression in the rat ovary is confined to the granulosa cells of developing follicles. *Endocrinology* 124: 2671-2679.
- Ooi GT (1990). Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs): More than just 1, 2, 3. *Mol Cell Endocrinol* 71: C39-C43.
- Oonk RB, Parker KL, Gibson JL, Richards JS (1990). Rat cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 (P-450_{scc}) gene. Structure and regulation by cAMP *in vitro*. *J Biol Chem* 265: 22392-22401.
- Packer AI, Hsu YC, Besmer P, Bachvarova RF (1994). The ligand of the c-kit receptor promotes oocyte growth. *Dev Biol* 161: 194-205.
- Payne DW, Packman JN, Adashi EY (1992). Follicle-stimulating hormone inhibits granulosa cell 5 α -reductase activity. Possible role of 5 α -reductase as a steroidogenic pubertal switch. *J Biol Chem* 267: 13348-13355.
- Payne RW, Hellbaum AA (1955). The effect of estrogens on the ovary of the hypophysectomized rat. *Endocrinology* 57: 193-199.
- Pederson T (1970). Follicle kinetics in the ovary of the cyclic mouse. *Acta Endocrinol* 64: 304-323.
- Pederson T, Peters H (1971). Follicle growth and cell dynamics in the mouse ovary during pregnancy. *Fertil Steril* 22: 42-52.
- Pencharz RI (1940). Effects of estrogens and androgens alone in combination with corionic gonadotropin on the ovary of the hypophysectomized rat. *Science* 91: 554-555.
- Peng C, Ohno T, Khorasheh S, Leung PC (1996). Activin and follistatin as local regulators in the human ovary. *Biol Signals* 5: 81-89.
- Peters H (1970). Migration of gonocytes into the mammalian gonad and their differentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 259: 91-101.
- Peters H (1978). Folliculogenesis in mammals. In Jones RE(ed): "The Vertebrate Ovary.". New York. Plenum; pp 121-140.
- Pineau C, Sharpe RM, Saunders PT, Gerard N, Jegou B (1990). Regulation of Sertoli cell inhibin production and of inhibin alpha- subunit mRNA levels by specific germ cell types. *Mol Cell Endocrinol* 72: 13-22.
- Piquette GN, LaPolt PS, Oikawa M, Hsueh AJW (1991). Regulation of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid levels by gonadotropins, growth factors, and gonadotropin-releasing hormone in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 128: 2449-2456.
- Poretsky L, Bhargava G, Levitan E (1990). Type I insulin-like growth factor receptors in human ovarian stroma. *Horm Res* 33: 22-26.
- Proetzel G, Pawlowski SA, Wiles MV, Yin M, Boivin GP, Howles PN, Ding J, Ferguson MW, Doetschman T (1995). Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nat Genet* 11: 409-414.
- Pursel VG, Wall RJ, Rexroad CE, Hammer RE, Brinster RL (1985). A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. *Theriogenology* 24: 687-700.
- Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I (1995). Bovine cumulus cell expansion does not depend on the presence of an oocyte secreted factor. *Mol Reprod Dev* 42: 248-253.
- Rani CSS, Salhanick AR, Armstrong DT (1981). Follicle-stimulating hormone induction of luteinizing hormone receptor in cultured rat granulosa cells: an examination of the need for steroids in the induction process. *Endocrinology* 108: 1379-1386.
- Rao MC, Midgley AR, Richards JS (1978). Hormonal regulation of ovarian cell proliferation. *Cell* 14: 71-78.
- Reich R, Miskin R, Tsafiri A (1985). Follicular plasminogen activator: involvement in ovulation. *Endocrinology* 116: 516-521.
- Reilly CM, Cannady WE, Mahesh VB, Stopper VS, De Sevilla LM, Mills TM (1996). Duration of estrogen exposure prior to follicle-stimulating hormone stimulation is critical to granulosa cell growth and differentiation in rats. *Biol Reprod* 54: 1336-1342.
- Reilly KM, Melton DA (1996). Short-range signaling by candidate morphogens of the TGF beta family and evidence for a relay mechanism of induction. *Cell* 86: 743-754.
- Richards JS (1979). Hormonal control of ovarian follicular development: a 1978 perspective. *Recent Prog Horm Res* 35: 343-373.

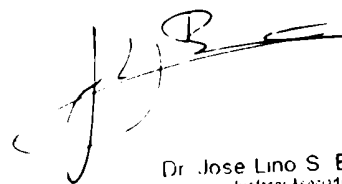
- Richards JS (1980). Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Phys Rev* 60: 51-89.
- Richards JS (1994). Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine Reviews* 15: 725-751.
- Richards JS, Fitzpatrick SL, Clemens JW, Morris JK, Alliston T, Sirois J (1995). Ovarian cell differentiation: a cascade of multiple hormones, cellular signals, and regulated genes. *Recent Prog Horm Res* 50: 223-254.
- Richards JS, Ireland JJ, Rao MC, Bemath GA, Midgley AR, Jr., Reichert LE, Jr. (1976). Ovarian follicular development in the rat: hormone receptor regulation by estradiol, follicle stimulating hormone and luteinizing hormone. *Endocrinology* 99: 1562-1570.
- Richards JS, Jonassen JA, Rolfes AI, Kersey K, Reichert LEJ (1979). Adenosine-3',5'-monophosphate, luteinizing hormone receptor and progesterone during granulosa cell differentiation: Effects of estradiol and follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 104: 765-770.
- Richards JS, Midgley Jr. AR (1976). Protein hormone action: a key to understanding ovarian follicular and luteal cell development. *Biol Reprod* 14: 82-94.
- Roberts AB, Lamb IC, Newton DI, Sporn MB, De Larco JE, Todaro GJ (1980). Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 3494-3498.
- Roberts AB, Roche NS, Wakefield LM, Sporn MB, Stern DF, Anzano MA (1985). Type β transforming growth factor. A bifunctional regulator of cellular growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 119-123.
- Robertson D, Burger HG, Sullivan J, Cahir N, Groome N, Poncelet E, Franchimont P, Woodruff T, Mather JP (1996). Biological and immunological characterization of inhibin forms in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 669-676.
- Robertson DM, Cahir N, Findlay JK, Burger HG, Groome N (1997). The biological and immunological characterization of inhibin A and B forms in human follicular fluid and plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 889-896.
- Robertson DM, Hayward S, Irby D, Jacobsen J, Clarke L, McLachlan RI, De Kretser DM (1988). Radioimmunoassay of rat serum inhibin: changes after PMSG stimulation and gonadectomy. *Mol Cell Endocrinol* 58: 1-8.
- Robker RL, Richards JS (1998). Hormonal control of the cell cycle in ovarian cells: proliferation versus differentiation. *Biol Reprod* 59: 476-482.
- Robker RL, Richards JS (1998). Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: a coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27Kip1. *Mol Endocrinol* 12: 924-940.
- Roby KF, Weed J, Lyles R, Terranova PF (1990). Immunological evidence for a human ovarian tumor necrosis factor- α . *J Clin Endocrinol Metab* 71: 1096-1102.
- Roy SK, Kole AR (1995). Transforming growth factor- β receptor type II expression in the hamster ovary: Cellular site(s), biochemical properties, and hormonal regulation. *Endocrinology* 136: 4610-4620.
- Ruoslahti E (1989). Proteoglycans in cell regulation. *J Biol Chem* 264: 13369-13372.
- Saitoh M, Nishitoh H, Amagasa T, Miyazono K, Takagi M, Ichijo H (1996). Identification of important regions in the cytoplasmic juxtamembrane domain of type I receptor that separate signaling pathways of transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 271: 2769-2775.
- Sakamaki K, Yoshida H, Nishimura Y, Nishikawa S, Manabe N, Yonehara S (1997). Involvement of Fas antigen in ovarian follicular atresia and luteolysis. *Mol Reprod Dev* 47: 11-18.
- Saltis J (1996). TGF- β : Receptors and cell cycle arrest. *Mol Cell Endocr* 116: 227-232.
- Salustri A, Yanagishita M, Hascall VC (1989). Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complex during follicle-stimulating hormone-induced mucification. *J Biol Chem* 264: 13840-13847.
- Salustri A, Yanagishita M, Hascall VC (1990). Mouse oocytes regulate hyaluronic acid synthesis and mucification by FSH-stimulated cumulus cells. *Dev Biol* 138: 26-32.
- Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, Cardell EL, Doetschman T (1997). TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* 124: 2659-2670.
- Santana P, Llanes L, Hernandez I, Gallardo G, Quintana J, Gonzalez J, Estevez F, De Galarreta CR, Fanjul LF (1995). Ceramide mediates tumor necrosis factor effects on P450-aromatase activity in cultured granulosa cells. *Endocrinology* 136: 2345-2348.
- Saragüeta P, Colman Lerner AA, Lanuza G, Fischman ML, Barañao JL (1996). Interactions

- between TGF- β and follistatin in granulosa cells. *Biol Reprod* 54 (Supl.1): 155 (Abstract)
- Saragüeta PE, Lanuza GM, Barañao JL (1997). Inhibitory effect of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) on rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis. *Mol Reprod Dev* 47: 170-174.
- Schmid P, Cox D, van der Putten H, McMaster GK, Bilbe G (1994). Expression of TGF-beta s and TGF-beta type II receptor mRNAs in mouse folliculogenesis: stored maternal TGF-beta 2 message in oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 201: 649-656.
- Schneyer AL, Mason AJ, Burton LE, Ziegner JR, Crowley WF, Jr (1990). Immunoreactive inhibin α -subunit in human serum: Implications for radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 70: 1208-1212.
- Schneyer AL, Rzucidlo DA, Sluss PM, Crowley WF, Jr. (1994). Characterization of unique binding kinetics of follistatin and activin or inhibin in serum. *Endocrinology* 135: 667-674.
- Schultz-Cherry S, Chen H, Mosher DF, Misenheimer TM, Krutzsch HC, Roberts DD, Murphy-Ullrich JE (1995). Regulation of transforming growth factor- β activation by discrete sequences of thrombospondin 1. *J Biol Chem* 270: 7304-7310.
- Schultz-Cherry S, Murphy-Ullrich JE (1993). Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor- β secreted by endothelial cells by a novel mechanism. *J Cell Biol* 122: 923-932.
- Schultz-Cherry S, Ribeiro S, Gentry L, Murphy-Ullrich JE (1994). Thrombospondin binds and activates the small and large forms of latent transforming growth factor-beta in a chemically defined system. *J Biol Chem* 269: 26775-26782.
- Schumacher R, Mosthaf L, Schlessinger J, Brandenburg D, Ullrich A (1991). Insulin and insulin-like growth factor-1 binding specificity is determined by distinct regions of their cognate receptors. *J Biol Chem* 266: 19288-19295.
- Schwall R, Schmelzer CH, Matsuyama E, Mason AJ (1989). Multiple actions of recombinant activin-A in vivo. *Endocrinology* 125: 1420-1423.
- Schwall RH, Mason AJ, Wilcox JN, Bassett SG, Zeleznik AJ (1990). Localization of inhibin/activin subunit mRNAs within the primate ovary. *Mol Endocrinol* 4: 75-79.
- Schwartz NB (1974). The role of FSH and LH and of their antibodies on follicular growth and on ovulation. *Biol Reprod* 10: 236-272.
- Shakil T, Whitehead SA (1994). Inhibitory action of peritoneal macrophages on progesterone secretion from co-cultured rat granulosa cells. *Biol Reprod* 50: 1183-1189.
- Sherr CJ (1994). G1 Phase Progression cycling on cue. *Cell* 79: 551-555.
- Shintani Y, Dyson M, Drummond AE, Findlay JK (1997). Regulation of follistatin production by rat granulosa cells in vitro. *Endocrinology* 138: 2544-2551.
- Sicinski P, Donaher JL, Geng Y, Parker SB, Gardner H, Park MY, Robker RL, Richards JS, McGinnis LK, Biggers JD, et al. (1996). Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature* 384: 470-474.
- Sidis Y, Fujiwara T, Leykin L, Isaacson K, Toth T, Schneyer AL (1998). Characterization of Inhibin/Activin Subunit, Activin Receptor, and Follistatin Messenger Ribonucleic Acid in Human and Mouse Oocytes: Evidence for Activin's Paracrine Signaling from Granulosa Cells to Oocytes. *Biol Reprod* 59: 807-812.
- Simon AM, Goodenough DA, Li E, Paul DL (1997). Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature* 385: 525-529.
- Singh B, Zhang X, Armstrong DT (1993). Porcine oocytes release cumulus expansion-enabling activity even though porcine cumulus expansion *in vitro* is independent of the oocyte. *Endocrinology* 132: 1860-1862.
- Skinner MK, Dorrington JH (1984). Control of fibronectin synthesis by rat granulosa cells in culture. *Endocrinology* 115: 2029-2031.
- Skinner MK, Keski-Oja J, Osteen KG, Moses HL (1987). Ovarian thecal cells produce transforming growth factor β which can regulate granulosa cell growth. *Endocrinology* 121: 786-792.
- Smitz J, Cortvrindt R (1998). Inhibin A and B secretion in mouse preantral follicle culture. *Hum Reprod* 13: 927-935.
- Sokal RR, Rohlf FJ (1995). Freeman WH (ed): "Biometry". New York, Freeman WH and Co.
- Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM (1987). Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J Cell Biol* 105: 1039-1045.
- Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Assoulian RK (1986). Transforming growth factor β - Biological function and chemical structure. *Science* 233: 532-534.
- Stein LS, Stoica G, Tilley R, Burghardt RC (1991). Rat ovarian granulosa cell culture: A model system for the study of cell-cell communication during multistep transformation. *Cancer Res* 51: 696-706.

- Steiner AL, Kipnis DM, Utiger R, Parker CW (1969). Radioimmunoassay for the measurement of adenosine 3',5'-cyclic phosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* 64: 367-373.
- Stock AE, Woodruff TK, Smith LC (1997). Effects of inhibin A and activin A during in vitro maturation of bovine oocytes in hormone- and serum-free medium. *Biol Reprod* 56: 1559-1564.
- Sugino H, Nakamura T, Hasegawa Y, Miyamoto K, Abe Y, Igarashi M, Eto Y, Shibai H, Titani K (1988). Erythroid differentiation factor can modulate follicular granulosa cell functions. *Biochem Biophys Res Commun* 153: 281-288.
- Sugino K, Kurosawa N, Nakamura T, Takio K, Shimasaki S, Ling N, Titani K, Sugino H (1993). Molecular heterogeneity of follistatin, an activin-binding protein. Higher affinity of the carboxyl-terminal truncated forms for heparan sulfate proteoglycans on the ovarian granulosa cell. *J Biol Chem* 268: 15579-15587.
- Taipale J, Koli K, Keski-Oja J (1992). Release of transforming growth factor-beta 1 from the pericellular matrix of cultured fibroblasts and fibrosarcoma cells by plasmin and thrombin. *J Biol Chem* 267: 25378-25384.
- Taipale J, Miyazono K, Heldin C-H, Keski-Oja J (1994). Latent transforming growth factor- β 1 associates to fibroblast extracellular matrix via latent TGF- β binding protein. *J Cell Biol* 124: 171-181.
- Tano M, Minegishi T, Nakamura K, Nakamura M, Kanino S, Miyamoto K, Ibuki Y (1995). Regulation of follistatin messenger ribonucleic acid in cultured rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 109: 167-174.
- Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W (1990). cAMP-dependent protein kinase: Framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem* 59: 971-1005.
- Terranova PF, Hunter VJ, Roby KF, Hunt JS (1995). Tumor necrosis factor- α in the female reproductive tract. *Proc Soc Exp Biol Med* 209: 325-342.
- Terranova PF, Rice VM (1997). Review: cytokine involvement in ovarian processes. *Am J Reprod Immunol* 37: 50-63.
- Tilly JL (1996). Apoptosis and ovarian function. *Rev Reprod* 1: 162-172.
- Tilly JL, Kowalski KI, Schomberg DW, Hsueh AJW (1992). Apoptosis in atretic ovarian follicles is associated with selective decreases in messenger ribonucleic acid transcripts for gonadotropin receptors and cytochrome P450 aromatase. *Endocrinology* 131: 1670-1676.
- Tilly JL, Tilly KI, Kenton ML, Johnson AL (1995). Expression of members of the Bcl-2 gene family in the immature rat ovary: Equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-x_{long} messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 136: 232-241.
- Tirone E, D'Alessandris C, Hascall VC, Siracusa G, Salustri A (1997). Hyaluronan synthesis by mouse cumulus cells is regulated by interactions between follicle-stimulating hormone (or epidermal growth factor) and a soluble oocyte factor (or transforming growth factor beta1). *J Biol Chem* 272: 4787-4794.
- Tsafiri A, Adashi EY (1994). Local Nonsteroidal Regulators of Ovarian Function. In Knobil E, Neill J(eds): "The Physiology of Reproduction". New York. Raven Press; pp 817-860.
- Tsang BK, Moon YS, Simpson CW, Armstrong DT (1979). Androgen biosynthesis in human ovarian follicles: cellular source, gonadotropin control and adenosine 3',5'-monophosphate mediation. *J Clin Endocrinol Metab* 48: 153-158.
- Turner IM, Saunders PTK, Shimasaki S, Hillier SG, Saunders PT (1989). Regulation of inhibin subunit gene expression by FSH and estradiol in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 125: 2790-2792.
- Uilenbroek JTJ, Richards JS (1979). Ovarian follicular development during the rat estrous cycle: gonadotropin receptors and follicular responsiveness. *Biol Reprod* 20: 1159-1165.
- Vale W, Hsueh AJ, Rivier C, Yu J (1991). The inhibin/ activin family of hormones and growth factors. In Sporn MB, Roberts AB (eds): "Peptide Growth factors and their receptors". New York. Springer-Verlag; pp 209-248.
- Van Antwerp DJ, Martin SJ, Verma IM, Green DR (1998). Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF-kappa B. *Trends Cell Biol* 8: 107-111.
- Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W (1995). Two tumor necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol* 5: 392-399.
- Vanderhyden BC (1993). Species differences in the regulation of cumulus expansion by an oocyte-secreted factor(s). *J Reprod Fertil* 98: 219-227.
- Vanderhyden BC, Caron PJ, Buccione R, Eppig JJ (1990). Developmental pattern of the secretion of cumulus expansion-enabling factor by mouse oocytes and the role of oocytes in promoting granulosa cell differentiation. *Dev Biol* 140: 307-317.
- Vanderhyden BC, Cohen JN, Morley P (1993). Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis. *Endocrinology* 133: 423-426.

- Vanderhyden BC, Telfer EE, Eppig JJ (1992). Mouse oocytes promote proliferation of granulosa cells from preantral and antral follicles in vitro. *Biol Reprod* 46: 1196-1204.
- Vanderhyden BC, Tonary AM (1995). Differential regulation of progesterone and estradiol production by mouse cumulus and mural granulosa cells by a factor(s) secreted by the oocyte. *Biol Reprod* 53: 1243-1250.
- Vilcek J, Lee TH (1991). Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem* 266: 7313-7316.
- Wakatsuki M, Shintani Y, Abe M, Liu ZH, Shitsukawa K, Saito S (1996). Immunoradiometric assay for follistatin: serum immunoreactive follistatin levels in normal adults and pregnant women. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 630-634.
- Wassarman PM, Albertini DF (1994). The mammalian ovum. In Knobil E, Neill JD(eds): "The Physiology of Reproduction". New York. Raven Press, Ltd. pp 79-122.
- Welschen R (1973). Amounts of gonadotropins required for normal follicular growth in hypophysectomized adult rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 72: 137-155.
- Wiegmann K, Schütze S, Machleidt T, Witte D, Krönke M (1994). Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell* 78: 1005-1015.
- Williams PC (1945). Ovarian stimulation by oestrogens: 2. Stimulation in the absence of hypophysis, uterus, and adrenal glands. *J Endocrinol* 4: 125-136.
- Willis SA, Zimmerman CM, Li LI, Mathews LS (1996). Formation and activation by phosphorylation of activin receptor complexes. *Mol Endocrinol* 10: 367-379.
- Witty JP, Bridgham JT, Johnson AL (1996). Induction of apoptotic cell death in hen granulosa cells by ceramide. *Endocrinology* 137: 5269-5277.
- Wnag C, Leung A (1983). Gonadotropins regulate plasminogen activator production by rat granulosa cells. *Endocrinology* 112: 1201-1207.
- Woodruff TK (1999). Hope, hypothesis, and the inhibin receptor. Does specific inhibin binding suggest there is a specific inhibin receptor? (editorial). *Endocrinology* 140: 3-5.
- Woodruff TK, Besecke LM, Groome N, Draper LB, Schwartz NB, Weiss J (1996). Inhibin A and inhibin B are inversely correlated to follicle-stimulating hormone, yet are discordant during the follicular phase of the rat estrous cycle, and inhibin A is expressed in a sexually dimorphic manner. *Endocrinology* 137: 5463-5467.
- Woodruff TK, Lyon RJ, Hansen SE, Rice GC, Mather JP (1990). Inhibin and activin locally regulate rat ovarian folliculogenesis. *Endocrinology* 127: 3196-3205.
- Woodruff TK, Mather JP (1995). Inhibin, activin and the female reproductive axis. *Annu Rev Physiol* 57: 219-244.
- Wrana JL, Attisano L, Cárcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, Wang X-F, Massagué J (1992). TGF β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 71: 1003-1014.
- Xiao S, Farnworth PG, Findlay JK (1992). Interaction between activin and follicle-stimulating hormone-suppressing protein/follistatin in the regulation of basal inhibin production by cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 131: 2365-2370.
- Xiao S, Findlay JK (1991). Interactions between activin and follicle-stimulating hormone-suppressing protein and their mechanisms of action on cultured rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 79: 99-107.
- Xiao S, Findlay JK, Robertson DM (1990). The effect of bovine activin and follicle-stimulating hormone (FSH) suppressing protein/follistatin on FSH-induced differentiation of rat granulosa cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 69: 1-8.
- Xiao S, Robertson DM, Findlay JK (1992). Effects of activin and follicle-stimulating hormone (FSH)-suppressing protein/follistatin on FSH receptors and differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 131: 1009-1016.
- Xiong Y, Hales DB (1993). The role of tumor necrosis factor-alpha in the regulation of mouse Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology* 132: 2438-2444.
- Yamashita H, Ten Dijke P, Huylebroeck D, Sampath TK, Andries M, Smith JC, Heldin CH, Miyazono K (1995). Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. *J Cell Biol* 130: 217-226.
- Yee JA, Yan L, Dominguez JC, Allan EH, Martin TJ (1993). Plasminogen-dependent activation of latent transforming growth factor beta (TGF β) by growing cultures of osteoblast-like cells. *J Cell Physiol* 157: 528-534.
- Ying SY, Becker A, Ling N, Ueno N, Guillemin R (1986). Inhibin and beta type transforming growth factor (TGF-b) have opposite induced modulating effects on the follicle stimulating hormone (FSH)-induced aromatase activity of cultured rat granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 136: 969-975.
- Ying SY, Zhang Z, Furst B, Batres Y, Huang G, Li G (1997). Activins and activin receptors in cell growth. *Proc Soc Exp Biol Med* 214: 114-132.

- Yingling JM, Datto MB, Wong C, Frederick JP, Liberati NT, Wang XF (1997). Tumor suppressor Smad4 is a transforming growth factor beta-inducible DNA binding protein. *Mol Cell Biol* 17: 7019-7028.
- Yoshida H, Takakura N, Katoaka H, Kunisada T, Okamura H, Nishikawa S (1999). Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Dev Biol* 184: 122-137.
- Zachow RJ, Tash JS, Terranova PF (1992). Tumor necrosis factor- α induces clustering in ovarian theca-interstitial cells *in vitro*. *Endocrinology* 131: 2503-2513.
- Zachow RJ, Tash JS, Terranova PF (1993). Tumor necrosis factor- α attenuation of luteinizing hormone-stimulated androstenedione production by ovarian theca-interstitial cells: Inhibition at loci within the adenosine 3',5'-monophosphate-dependent signaling pathway. *Endocrinology* 133: 2269-2276.
- Zhang Y, Feng X, We R, Derynck R (1996). Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF- β response. *Nature* 383: 168-172.
- Zhiwen Z, Findlay JK, Carson RS, Herington AC, Burger HG (1988). Transforming growth factor beta enhances basal and FSH-stimulated inhibin production by rat granulosa cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 58: 161-166.
- Zhou J, Kumar TR, Matzuk MM, Bondy C (1997). Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary. *Mol Endocrinol* 11: 1924-1933.
- Zoller LC, Weisz J (1979a). Identification of cytochrome P-450, and its distribution in the membrana granulosa of the preovulatory follicle using quantitative cytochemistry. *Endocrinology* 103: 310-318.
- Zoller LC, Weisz J (1979b). A quantitative cytochemical study of glucose-6-phosphate dehydrogenase and (delta)5 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in the membrana granulosa of the ovulable type of follicle of the rat. *Histochemistry* 62: 125-134.
- Zolti M, Meirom R, Shemesh M, Wollach D, Mashiach S, Shore L, Rafael ZB (1990). Granulosa cells as a source and target organ for tumor necrosis factor- α . *FEBS Lett* 261: 253-255.
- Zuccotti M, Yanagimachi R, Yanagimachi H (1991). The ability of hamster oolemma to fuse with spermatozoa: its acquisition during oogenesis and loss after fertilization. *Development* 112: 143-152.



Dr. Jose Lino S. Barañao
Endocrinólogo
Univ. de Murcia, Murcia, Spain, U.S.A.



Emilio L. Linares