

Tesis de Posgrado

Acción autocrina/paracrina de la inhibina sobre la selección del folículo ovárico

Vitale, Alejandra Mariel

2003

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas 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:

Vitale, Alejandra Mariel. (2003). Acción autocrina/paracrina de la inhibina sobre la selección del folículo ovárico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3623_Vitale.pdf

Cita tipo Chicago:

Vitale, Alejandra Mariel. "Acción autocrina/paracrina de la inhibina sobre la selección del folículo ovárico". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3623_Vitale.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ACCIÓN AUTOCRINA/PARACRINA DE LA
INHIBINA SOBRE LA SELECCIÓN DEL
FOLÍCULO OVÁRICO

Autora: Lic. Alejandra Mariel Vitale

Directora: Dra. Marta Tesone

Director Asistente: Dr. Leonardo Bussmann

3 6 2 3

Tesis presentada para acceder al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Laboratorio de Fisiología Ovárica
Instituto de Biología y Medicina Experimental

2003

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no se habría escrito sin la inspiración y el apoyo de muchas personas e instituciones. Estoy especialmente agradecida:

...a la Dra. Marta Tesone por haberme guiado con paciencia y esmero en el transcurso de la investigación, por su continuo aliento y por crear y mantener un ambiente motivador para el trabajo en equipo.

...al Dr. Leonardo Bussmann por su calidez, su presencia constante y dedicación, y por sus valiosos comentarios.

...a Fernanda, Griselda, Marina y Dalhia, mis compañeras de laboratorio y colegas, por estar siempre presentes, por su colaboración y valiosa ayuda cotidiana...en fin, personas excepcionales.

...a Rosa Inés, Gabriela y Mariela por su apoyo y solidaridad.

...a todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron a la concreción de la investigación, en especial a la Dra. Olga González por su invalorable colaboración con los trabajos de histología, a la Dra. Patricia Miranda por su infinita paciencia y calidez, a la Dra. Liliana Dain por sus acertadas respuestas y enseñanzas, a la Dra. Victoria Lux, a Lucas Mongiat y a Ursula Bussmann por las contribuciones de materiales y el intercambio de ideas.

...a Karina, Dolores, Vanina, Debora, Cecilia, Mariana, Mauro, Diego, Eva, Julieta y Ana por las sesiones de catarsis que hicieron más llevadero el trabajo cotidiano y por haber compartido tan buenos momentos.

...al IByME lugar en el cual tuve el privilegio de realizar la presente tesis.

...al CONICET y a la Fundación Antorchas por haberme otorgado las becas necesarias para la concreción del proyecto.

...y finalmente a mi familia , amigas y amigos por su cariño y apoyo permanente.

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación consistió en evaluar los efectos *in vivo* e *in vitro* de la inhibina A recombinante humana durante distintos estadios del desarrollo folicular. En particular se evaluó el efecto de esta glicoproteína sobre la proliferación de células de la granulosa en cultivo, sobre la apoptosis y la expresión de proteínas pro y anti apoptóticas y sobre la esteroidogénesis ovárica en ratas prepúberes tratadas con DES o con PMSG.

Los resultados indican que la inhibina A es producida *in vitro* por las células de la granulosa en cultivo obtenidas de ovarios de ratas estimuladas con DES y que su producción es estimulada por FSH, TGF β y estradiol. También se observa que concentraciones fisiológicas de inhibina A disminuyen la proliferación celular inducida por estos tres factores. Además del efecto antiproliferativo se observa, en este mismo modelo experimental, que la administración de inhibina A *in vivo* produce un retraso en el desarrollo folicular y un aumento de la apoptosis. Estos hallazgos fueron confirmados por ensayos *in vitro* donde se observa un aumento significativo de la fragmentación del ADN en folículos antrales tempranos incubados con inhibina A. Con respecto a la expresión de proteínas pro y anti apoptóticas la inhibina A produce tanto *in vivo* como *in vitro* un aumento en los niveles de Bax, mientras que los niveles de Bcl-2 permanecen constantes. Por otra parte la inhibina no tiene ningún efecto en la esteroidogénesis.

En cuanto a los ensayos realizados con ovarios de ratas estimuladas con PMSG se observó que la inhibina A no tiene efecto alguno sobre la proliferación de células de la granulosa en cultivo. Tampoco se advirtió ningún efecto de esta glicoproteína sobre la fragmentación del ADN en cultivos de folículos preovulatorios. Por otra parte la administración *in vivo* de inhibina en estas ratas produce un retraso en el desarrollo folicular de folículos inmaduros, pero no tiene ningún efecto en el crecimiento de folículos preovulatorios. Asimismo, en todos los tipos foliculares estudiados se observa una disminución de la apoptosis.

Como conclusión, estos resultados sugieren que la inhibina A posee una acción local en el ovario, siendo uno de los factores de acción autocrina o paracrina que regula el crecimiento folicular.

PALABRAS CLAVES

Ovario

Foliculogénesis

Apoptosis

Inhibina

Regulación intrafolicular

INHIBIN AUTOCRINE/PARACRINE ACTION ON OVARIAN FOLLICULAR SELECTION

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the role of inhibin A in follicular development and apoptosis- related mechanisms, in preantral and early antral follicles from prepubertal DES- treated rats and in preovulatory follicles in PMSG- treated rats. Granulosa cells isolated from the ovaries of 23-25-day-old DES- treated rats were cultured in serum- free medium containing FSH, TGF β , and estradiol in the presence and absence of different concentrations of inhibin A. ^3H - thymidine incorporation was decreased in the presence of inhibin, while no significant changes were observed in culture media on progesterone and estradiol levels. An increase in low molecular weight DNA fragmentation indicative of apoptosis, and an increase in the protein levels of Bax with no changes in Bcl-2, were evident in early antral follicles incubated 24 h with inhibin. For each animal inhibin (0.5 $\mu\text{g}/\text{ovary}$) was injected intrabursally in one ovary while the contralateral ovary served as control. Ovarian histology revealed an inhibitory effect of inhibin treatment on the follicular development induced by DES. At 24 h of inhibin injection, the number of preantral follicles was increased as compared to controls, whereas the number of early antral follicles was decreased. In addition, *in vivo* inhibin treatment caused an increase in the percentage of apoptotic cells in preantral, and early antral follicles with a subsequent increase in Bax levels.

On the other hand, granulosa cells isolated from the ovaries of PMSG- treated rats were cultured in serum- free medium containing FSH, TGF β , and estradiol in the presence and absence of different concentrations of inhibin A. ^3H - thymidine incorporation was not changed in the presence of inhibin. There were no changes in low molecular weight DNA fragmentation in early antral follicles incubated 24 h with inhibin. For each animal inhibin (0.5 $\mu\text{g}/\text{ovary}$) was injected intrabursally in one ovary while the contralateral ovary served as control. Ovarian histology revealed no effect of inhibin treatment on follicular development of preovulatory follicles induced by PMSG. At 24 h of inhibin injection, the number of preantral follicles was increased

as compared to controls, whereas the number of early antral follicles was decreased. There were no changes in the number of preovulatory follicles. In addition, *in vivo* inhibin treatment caused a decrease in the percentage of apoptotic cells in all kind of follicles.

These results suggest that inhibin produced by the dominant follicle may act as a paracrine factor inhibiting the growth of neighboring follicles; thus participating in the mechanism of follicular selection.

KEYWORDS

Ovary

Folliculogenesis

Apoptosis

Inhibin

Intrafollicular regulation

Los resultados presentados en esta tesis de doctorado contribuyeron en parte a la realización de dos trabajos científicos que fueron publicados en revistas internacionales:

✱ AM Vitale, S Lancuba , MG Ballerini, Groome N., S Campo, M Tesone.
"Inhibin A and B levels in follicular fluid of patients undergoing assisted reproduction: their correlation with hormone levels and pregnancy". Fertility and Sterility vol 75 (1): 221-222, 2000.

✱ AM. Vitale, O. M. Gonzalez, F. Parborell, G. Irusta, S. Campo and M. Tesone
"Inhibin A increases apoptosis in early antral follicles in the ovary of DES-treated rats" Biology of Reproduction, vol 67: 1989-1995, 2002.

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ActRII	receptor de activina de tipo II
ALK4	receptor de activina de tipo I
AMPc	adenosín 3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de la varianza
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ART	técnicas de reproducción asistida
ATP	adenosín trifosfato
BG	Betaglicano-glicano
3-β-HSD	3-β-hidroxiesteroide deshidrogenasa
BSA	seroalbúmina bovina
cG	célula de la granulosa
Ci	curie
cpm	cuentas por millón
cT	célula de la teca
Da	dalton
DAB	diaminobencidina
DAG	diacilglicerol
DES	dietilestilbestrol
ES	error standard
FAT	folículo antral temprano
FF	fluido folicular
FIV	fertilización <i>in vitro</i>
FP	folículo preantral
FPO	folículo preovulatorio
FSH	hormona folículo estimulante
G	gramo
GnRH.	hormona liberadora de gonadotrofinas
hs	horas
HDL	lipoproteína de alta densidad
IC ₅₀	concentración inhibitoria 50
IP ₃	inositol 3 fosfato
L	litro
LDL	lipoproteína de baja densidad
LH	hormona luteinizante
M	molar
mA	miliampere
mg	miligramo
ml	mililitro

mM	milimolar
µg	microgramo
µm.....	micrómetro
MTS	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
Oo	ovocito
PARP	poly ADP- ribosa polimerasa
PGE	prostanglandina
PGF _{2α}	prostanglandina F _{2α}
PKC	proteína quinasa C
20-OH-progesterona	20-hidroxi-progesterona
25-OH-Ch/25-OH-colesterol	25-hidroxi-colesterol
P ₅	pregnenolona
PBS	buffer fosfato salino
pg	picogramo
PLA2	fosfolipasa A2
PLC	fosfolipasa C
PLD	fosfolipasa D
PMSG	gonadotrofina de suero de yegua preñada
RIA	radioinmunoensayo
SDS	dodecil sulfato sódico
T	temperatura
Tris	tris (hidroximetil)aminometano
TUNEL	Marcado del extremo terminal libre con dUTP-biotinilado mediante la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal
V	voltios
vs	versus
v/v	volumen en volumen

INDICE

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

1. MORFOLOGÍA Y FUNCIÓN DEL OVARIO - PAG 22

1.1 Principales características del ovario – Pag 22

1.2 Foliculogénesis – Pag 23

1.3 Aspectos morfológicos de la foliculogénesis – Pag 24

1.3.1 Folículo primordial – Pag 24

1.3.2 Folículo primario – Pag 22

1.3.3 Folículo secundario – Pag 24

1.3.4 Folículo terciario – Pag 25

1.3.5 Folículo preovulatorio – Pag 26

1.4 Ovulación – Pag 29

1.5 Cuerpo Lúteo – Pag 29

1.6 Luteólisis – Pag 30

2 REGULACIÓN DEL DESARROLLO FOLICULAR- PAG 30

2.1 El eje hipotálamo-hipofisario-gonadal – Pag 30

2.2 Retroalimentación negativa – Pag 31

2.3 Retroalimentación positiva – Pag 31

2.4 Reclutamiento inicial vs. Cíclico – Pag 33

2.5 Selección del folículo dominante – Pag 35

2.6 Mecanismos de regulación endocrina – Pag 37

2.7 Mecanismos de regulación intraovárica – Pag 37

3 CICLO OVÁRICO DE LA RATA – PAG 39

3.1 Patrones de secreción hormonal durante el ciclo estral. Hormonas esteroideas – Pag 41

3.1.1 Transporte intracelular del colesterol – Pag 41

3.1.2 Ruptura de la cadena lateral del colesterol – Pag 41

3.1.3 Síntesis de pregnenolona – Pag 42

3.1.4 Síntesis de andrógenos – Pag 42

3.1.5 Síntesis de estrógenos – Pag 42

3.1.6 Metabolismo de la progesterona – Pag 43

4. MUERTE CELULAR - PAG 46

4.2 La apoptosis como mecanismo de atresia folicular – Pag 46

4.3.1 Miembros de la familia de Bcl-2 – Pag 51

4.3.2 Caspasas como ejecutoras de la apoptosis – Pag 56

5. LA SUPERFAMILIA DE TGF – PAG 59

5.1 Inhibinas, activinas y folistatinas – Pag 60

5.2 Distribución de la inhibina en el ovario de la rata – Pag 61

5.3 Las inhibinas y las activinas como factores de regulación intraováricos – Pag 67

5.4 Cambios en los niveles de inhibina durante el ciclo menstrual – Pag 69

5.5 Receptores y transducción de señales – Pag 72

HIPÓTESIS - PAG 76

OBJETIVOS – PAG 76

1. REACTIVOS – PAG 79

2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA-LUTEÍNICAS HUMANAS.
PROTOCOLO DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA – PAG 80

3. AISLAMIENTO CELULAR Y CULTIVO DE CÉLULAS GRANULOSA- LUTEÍNICAS HUMANAS – PAG 80

4. ANIMALES – PAG 80

5. TRATAMIENTOS – PAG 80

5.1 Ratas tratadas con DES – Pag 81

5.2 Ratas tratadas con PMSG – Pag 81

6. AISLAMIENTO DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA – PAG 81

7. MEDICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE INHIBINA EN EL MC DE CÉLULAS DE GRANULOSA-LUTEÍNICAS HUMANAS Y EN EL MEDIO CONDICIONADO DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA DE RATA –	PAG 82
8. CULTIVOS DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA –	PAG 82
9. PROLIFERACIÓN CELULAR –	PAG 83
9.1 Efecto del MC proveniente de células de la granulosa-luteínicas humanas sobre la proliferación de células de granulosa inmaduras de rata –	Pag 83
9.2 Presencia de inhibinas en el MC –	Pag 83
9.3 Efecto de la inhibina A y de la activina A recombinante humana sobre la proliferación de células de granulosa de rata –	Pag 83
9.4 Método MTS –	Pag 83
10. CULTIVO DE CÉLULAS ADENOHIPOFISIARIAS –	PAG 83
11. MEDICIÓN DE ESTEROIDES EN CULTIVOS DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA INMADURAS DE RATA –	PAG 84
11.1 Medición de esteroides –	Pag 84
11.2 Determinación de progesterona –	Pag 85
11.3 Determinación de estradiol –	Pag 85
12. ENSAYOS IN VIVO –	PAG 85
12.1 Ratas tratadas con DES –	Pag 85
12.2 Ratas tratadas con PMSG –	Pag 85
12.3 Morfología ovárica –	Pag 85
12.4 Coloración con hematoxilina-eosina –	Pag 86
12.5 Clasificación y recuento de folículos ováricos –	Pag 86
12.6 Cuantificación inmunocitoquímica de la apoptosis –	Pag 86
13. ENSAYOS IN VITRO	87
13.1 Aislamiento y cultivo de folículos ováricos de rata –	Pag 87
13.1.1 Folículos antrales tempranos –	Pag 87
13.1.2 Folículos preovulatorios –	Pag 87
13.2 Determinación de apoptosis en folículos ováricos –	Pag 88
13.2.1 Aislamiento de folículos y extracción del ADN -	Pag88
13.2.2 Electroforesis en geles de agarosa y cuantificación de la fragmentación de ADN –	Pag 88

13.3 Medición de los niveles de miembros de la familia de bcl-2 por western blot – Pag 88

14. EXTRACCIÓN DE ESTEROIDES DE FOLÍCULOS – PAG 89

15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS – PAG 90

CAPITULO I

RESULTADOS

- 1. NIVELES DE INHIBINA A Y B EN EL FLUIDO FOLICULAR DE MUJERES SOMETIDAS A TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA Y SU CORRELACIÓN CON LOS NIVELES HORMONALES Y CON EL EMBARAZO – PAG 93**
- 2. LA INHIBINA COMO UN FACTOR INHIBIDOR DEL CRECIMIENTO FOLICULAR – PAG 97**

DISCUSIÓN

- 1. NIVELES DE INHIBINA A Y B EN EL FLUIDO FOLICULAR DE MUJERES SOMETIDAS A TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA Y SU CORRELACIÓN CON LOS NIVELES HORMONALES Y CON EL EMBARAZO – PAG 101**
- 2. LA INHIBINA COMO UN FACTOR INHIBIDOR DEL CRECIMIENTO FOLICULAR – PAG 101**

CAPITULO II

RESULTADOS

- 1. EFECTO DE LA INHIBINA A SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA INMADURAS DE RATA EN CULTIVO – PAG 110**
- 2. EFECTO DE LA ACTIVINA A SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA INMADURAS DE RATA EN CULTIVO – PAG 110**
- 3. PRODUCCIÓN DE PROGESTERONA Y ESTRADIOL EN CULTIVOS DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA DE RATAS – PAG 119**
- 4. EFECTO DE LA INHIBINA A SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA MADURAS DE RATA EN CULTIVO – PAG 120**
- 5. EFECTO DE LA INHIBINA A SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS HIPOFISARIAS DE RATA EN CULTIVO – PAG 121**

DISCUSIÓN

1. CÉLULAS DE LA GRANULOSA, INMADURAS Y MADURAS, DE RATA EN CULTIVO – PAG 120

CAPITULO III

RESULTADOS

1. ENSAYOS *IN VIVO* – PAG 129

1.1 Efecto *in vivo* de la inhibina A sobre el desarrollo folicular y la apoptosis en ratas tratadas con DES – Pag 131

1.2 Efecto *in vivo* de la inhibina A sobre la expresión de proteínas pro y antiapoptóticas en ratas tratadas con DES – Pag 139

1.3 Efecto *in vivo* de la inhibina A sobre el desarrollo folicular y la apoptosis en ratas tratadas con PMSG – Pag 144

2. ENSAYOS *IN VITRO* – PAG 147

2.1 Efecto *in vitro* de la inhibina A sobre la apoptosis en folículos antrales tempranos provenientes de ratas tratadas con DES – Pag 147

2.1.1 Cuantificación de la apoptosis por electroforesis en geles de azarosa – Pag 147

2.1.2 Niveles de progesterona y estradiol en tejido folicular – Pag 147

2.2 Efecto *in vitro* de la inhibina A sobre la apoptosis en folículos antrales provenientes de ratas tratadas con PMSG – Pag 151

2.2.1 Cuantificación de la apoptosis por electroforesis en geles de azarosa – Pag 151

DISCUSIÓN

1. EVALUACIÓN DE LOS ENSAYOS *IN VIVO* E *IN VITRO* REALIZADOS EN RATAS TRATADAS CON DES – PAG 154

2. EVALUACIÓN DE LOS ENSAYOS *IN VIVO* E *IN VITRO* REALIZADOS EN RATAS TRATADAS CON PMSG – PAG 160

CONCLUSION

CONCLUSION – PAG 163

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA – PAG 169

INTRODUCCION

En las últimas décadas se han incrementado los estudios científicos realizados en el área de la fisiología de la reproducción. La presente investigación corresponde a este área y tiene como propósito contribuir al conocimiento de la función ovárica en mamíferos.

A partir del marco conceptual, presentado en los *Antecedentes*, se planteó como problema de la investigación realizada el estudio del papel de la inhibina durante el proceso de foliculogénesis. Para responder a esta incógnita se formuló como hipótesis principal que *la inhibina actúa como un factor autocrino/paracrino regulando el proceso de selección folicular*. El carácter general de esta afirmación hizo que para su comprobación se propusieran distintas hipótesis derivadas que fueron tratadas en los diferentes capítulos.

En el *Capítulo I* se presenta lo relacionado con la evaluación, en primera instancia, de la presencia de inhibina en el fluido folicular de pacientes sometidas a técnicas de reproducción asistida, su correlación con los niveles hormonales y con el embarazo. Luego, en una segunda instancia, la presencia de inhibina en el medio condicionado de cultivos de células de la granulosa-luteínicas humanas y su acción sobre la proliferación celular.

Continuando con la presentación de la evaluación, en el *Capítulo II* se aborda el tema acerca de si la inhibina producida por el folículo dominante actúa como un factor paracrino impidiendo el crecimiento de folículos subordinados de la cohorte en progresión y la acción de la inhibina sobre el crecimiento del folículo dominante.

Por último en el *Capítulo III* se expone la relación entre la inhibina y la activación de mecanismos apoptóticos en los folículos subordinados.

Para poner a prueba las hipótesis señaladas se utilizó a la rata como modelo experimental y se ensayó el efecto de la inhibina *in vitro*, tanto en cultivos de células de la granulosa como en cultivos de folículos, e *in vivo*, inyectándola directamente en el ovario, utilizando las técnicas detalladas en la sección *Materiales y Métodos*.

Una de las posibles funciones paracrinas novedosas, halladas para esta glicoproteína, es la de producir un retraso en el desarrollo de folículos antrales tempranos y preantrales concomitantemente con un aumento en los niveles de apoptosis de dichos folículos.

Los resultados que se exponen en esta tesis pretenden no sólo esclarecer la participación de la inhibina en el mecanismo de selección folicular, sino también aspiran a servir de base para otros estudios relacionados, que tengan como fin la optimización de las técnicas

utilizadas en reproducción humana y asimismo de contribuir al esclarecimiento de diferentes patologías.

ANTECEDENTES

1. MORFOLOGÍA Y FUNCIÓN DEL OVARIO

1.1 Principales características del ovario

El ovario está constituido por un tejido en constante transformación, con una estructura multicompartimental caracterizada por propiedades biológicas diferentes y cambiantes. En la rata los ovarios están situados cerca de los riñones a lo largo del borde del músculo lateral psoas y se encuentran rodeados de grasa. Durante la adultez la superficie del ovario es nodular y se encuentra cubierta por una capa monoestratificada de células cúbicas o poliédricas, llamada epitelio germinal. Esta cubierta epitelial está frecuentemente invaginada hacia el tejido conectivo subyacente, llamado túnica albugínea, formando pequeños pliegues, pocillos ó criptas. Por debajo se encuentran dos zonas: la llamada zona cortical y la zona medular, y el límite entre ambas no se encuentra bien definido. La primera comprende al estroma ovárico, formado por tejido conectivo laxo, fibroblastos y precursores de células tecales y a los folículos en distintos estadios de maduración, atrésicos y cuerpos lúteos. La zona medular que se encuentra muy vascularizada e inervada, contiene células de tipo muscular y tejido conectivo laxo (Bloom y Fawcett , 1997).

En los mamíferos, el ovario es el sitio de almacenamiento y desarrollo de los ovocitos formados durante la vida embrionica/fetal o alrededor del momento del nacimiento. La principal función de la gónada femenina es la maduración del ovocito para la fertilización y exitosa propagación de la especie (Driancourt y col., 1993; Hsu y Hsueh, 2000). Asimismo este órgano tiene como función la de producir esteroides que permiten el desarrollo de los caracteres femeninos secundarios.

En el ovario adulto de mamíferos, las gametas no son liberadas continuamente desde el ovario, sino en forma recurrente a intervalos de tiempo que son especie-específicos; por ejemplo, 4-5 días en la rata, 28 días en la mujer. Los ovocitos se encuentran rodeados por una o varias capas de células de múltiples funciones que crecen gradualmente en número y forman, eventualmente, un folículo esférico lleno de líquido. En general, se observan tantos ovocitos como folículos, los cuales se

encuentran simultáneamente en un amplio rango de tamaños y estadios¹ de desarrollo. Los mecanismos involucrados en el crecimiento de los folículos actúan, en un mismo momento, sobre una pequeña proporción de folículos. De esta pequeña población que comienza a crecer, sólo uno o unos pocos alcanzarán el tamaño especie-específico máximo que permita la ruptura y liberación de la gameta desde el ovario, mientras que el resto de los folículos que iniciaron el crecimiento se perderán por mecanismos que los conducen a la atresia.

1.2 Foliculogénesis

La *foliculogenesis* se define como el proceso por el cual un folículo crece y se desarrolla, desde el momento en que emerge de la población de folículos formado durante la ovogénesis, hasta el momento en el cual es ovulado o entra en atresia. Este proceso es llevado a cabo en la corteza del ovario.

El número total de folículos ováricos es determinado en forma temprana en la vida del individuo y la depleción de esta población de folículos lleva a la senescencia de la vida reproductiva (Hsu y Hsueh, 2000). En cada especie se encuentran diferencias en el número de folículos que contienen como reservorios formados durante la ovogénesis. Al nacimiento, el ovario contiene 20.000, 160.000 y 1.000.000 de folículos en ratas, ovejas y humanos respectivamente (Driancourt y col., 1993).

El folículo ovárico es considerado la unidad funcional del ovario. Su función es la de proveer el sistema de soporte necesario para que la célula germinal femenina, el ovocito, alcance su máximo potencial, es decir que adquiera la capacidad para unirse a una célula germinal masculina, el espermatozoide, para producir un embrión capaz de desarrollarse hasta llegar al nacimiento.

La clasificación de los folículos puede estar basada en los cambios morfológicos observados durante su desarrollo como el diámetro folicular o el número de capas de células de la granulosa y varía según los autores. Algunos los clasifican como *folículos primordiales, primarios, secundarios, y terciarios tempranos y tardíos*

¹ * El término "estadio" (del latín stadium y del griego stadion) tiene como una de sus acepciones el designar a un período de tal grado que, en un desarrollo cualquiera, puede considerarse como un estado distinto. Con esta acepción se usa en distintas disciplinas como en la medicina, al hablar de las fases características de una enfermedad. No hemos encontrado como palabra española "estadio", razones por las que en la presente tesis utilizamos la palabra española "estadio". Fuentes consultadas Moliner, María, 1994 (19 impresión) Diccionario de uso del español, Madrid, Gredos, y diversos diccionarios enciclopédicos.

(Banka y Erickson, 1985); en tanto que otros como *foliculos primordiales*, *primarios*, *secundarios*, *terciarios* y *preovulatorios* o de *De Graaf* (Bloom W. y Fawcett W.D., 1997). En la presente tesis se utiliza la última clasificación y además la distinción según tenga o no cavidad antral. De esta forma también hablaremos de folículos preantrales y antrales tempranos y tardíos.

1.3 Aspectos morfológicos de la foliculogénesis

1.3.1 Folículo primordial

El folículo mas pequeño que se puede encontrar en el ovario es el *primordial*, aparece en el humano alrededor de la semana 16 de embarazo y está formado por un ovocito, arrestado en el estadio de diplotene de la profase meiótica, rodeado de células de la granulosa aplanadas y una membrana basal. Generalmente se acepta que la formación del folículo primordial termina no mas allá de las 6^{ta} semana luego del nacimiento. Este estadio de desarrollo folicular es enteramente independiente de las gonadotrofinas (Peters y col., 1973). En ausencia de influencias hipofisiarias, el folículo puede alcanzar el estadio preantral temprano.

1.3.2 Folículo primario

Durante la vida fetal el folículo primordial crece hasta el estadio de *foliculo primario*, la capa de células de la granulosa se transforma de plana a cúbica y el ovocito aumenta de tamaño (Bloom y Fawcett 1997; Richards, 1980). Simultáneamente las células de la granulosa sintetizan y secretan mucopolisacáridos, con los que originan un halo translúcido que rodea al ovocito, conocido como zona pelúcida (Driancourt y col., 1993).

1.3.3 Folículo secundario

La transformación del folículo primario a *secundario* implica la proliferación de células primarias de la granulosa que dan origen a múltiples capas celulares que causan el agrandamiento del folículo (Bloom y Fawcett , 1997). Además, este folículo en vías de diferenciación migra a la médula donde completa la adquisición del componente tecal, el cual se diferencia por afuera de la lámina basal y se completa la maduración de la zona pelúcida (Bloom y Fawcett , 1997; Carr, 1998). Las células de la granulosa adquieren receptores para FSH y se conectan por uniones estrechas las cuales les permiten nutrir las capas más internas. La aparición de la teca trae

aparejada la vascularización del folículo, la adquisición de receptores a LH y la capacidad de biosíntesis de esteroides. Las células de granulosa del folículo secundario tienen la capacidad potencial de sintetizar los tres tipos de esteroides ováricos (progestágenos, andrógenos y estrógenos) en cantidades limitadas. Sin embargo, se producen más estrógenos que andrógenos o progestágenos (Hillier y col., 1977). Cada folículo puede aromatizar pequeñas cantidades de andrógenos, por la acción de la enzima aromatasa y generar su propio microambiente estrogénico (McNatty y col., 1979). De esta forma esta enzima es el factor limitante de la producción ovárica de estrógenos y es inducida por la FSH (Moon y col., 1978), de modo que la producción de estrógenos está limitada, en parte, por el número de receptores para esta hormona. Además la FSH se combina con los estrógenos para ejercer un efecto mitogénico sobre las células de granulosa (Goldenberg y col., 1972).

Por otro lado cabe agregar que la foliculogénesis es independiente de las gonadotrofinas hasta el estadio de formación del antro. Un ejemplo de esto es que ratones *knock out* para el gen de FSH muestran un crecimiento folicular hasta el estadio preantral, lo que confirma que los estadios tempranos de foliculogénesis están regulados por otros factores (Driancourt y col., 1993; Hsu y Hsueh, 2000).

1.3.4 Folículo terciario

La fase de crecimiento tónico corresponde a la conversión de los folículos todavía preantrales a folículos *antrales* o *terciarios*. Esta fase de crecimiento es dependiente de las gonadotrofinas, aunque hay que señalar que el progreso es lento con bajos niveles de gonadotrofinas circulantes. Es durante esta fase de desarrollo folicular que la atresia no parece estar directamente relacionada con los cambios cíclicos característicos de las gonadotrofinas circulantes. Cabe destacar que, esta fase de crecimiento folicular contrasta con estadios posteriores de desarrollo cuando la atresia aparenta depender íntimamente de los cambios cíclicos en los niveles circulantes de FSH.

En el folículo terciario las células de la teca se dividen en dos capas: una interior, glandular y vascularizada, llamada teca interna y otra exterior, formada por tejido conectivo y células del músculo liso, denominada teca externa. Bajo la influencia de

los estrógenos y la FSH, se produce un aumento de la producción de fluido folicular, que empieza a acumularse en los espacios intercelulares de las células de granulosa hasta que se forman los cuerpos de Call-Exner que corresponden a áreas de licuefacción o productos de secreción celular. Estos cuerpos aumentan de tamaño, confluyen entre sí y dan origen a una cavidad llamada *antro*. El fluido folicular, el cual posee proteínas plasmáticas, enzimas intra y extracelulares, proteoglicanos, esteroides, hormonas proteicas hipofisarias y factores no esteroideos, provee el ambiente necesario para que el ovocito y las células de granulosa que lo rodean puedan nutrirse y desarrollarse (Chang y col., 1977; McNatty y col., 1979). El microambiente dado por el antro permite el acceso de hormonas como FSH y LH hasta sus receptores celulares, permitiendo amplificaciones de señales. Por lo tanto, en el ovario, folículos contiguos pueden estar en diferentes estadios de crecimiento, pero todas las células de un folículo determinado están inmersas en el mismo ambiente.

Aunque la apoptosis puede ocurrir en todos los estadios del desarrollo folicular, en los roedores la transición del estadio preantral al antral es el más susceptible de sufrir atresia (Hirshfield, 1991a). El destino de estos folículos depende de un delicado balance de esteroides. Los folículos que tienen mayor proliferación celular, poseen altas concentraciones de estrógenos y bajas concentraciones de andrógenos, lo que permite mantener un ovocito viable. En contraposición, los folículos atrésicos devienen androgénicos.

1.3.5 Folículo preovulatorio

En el último estadio previo a la ovulación encontramos el *folículo preovulatorio* o *folículo de De Graaf*. Este folículo incrementa su tamaño debido al aumento de la población de las células foliculares y a la acumulación de fluido folicular entre las células de granulosa cuyas uniones intercelulares se vuelven más laxas. Cabe señalar que las células de la granulosa se agrandan y adquieren inclusiones lipídicas, mientras que aumenta la vascularización y aparecen vacuolas en las células de la teca. Mientras tanto el ovocito reanuda la meiosis, acercándose a completar la división reduccional.

En la *Figura 1* se puede observar un esquema donde se describen los distintos estadios del desarrollo folicular, mientras que en la *Figura 2* se muestra la estructura celular de un folículo.

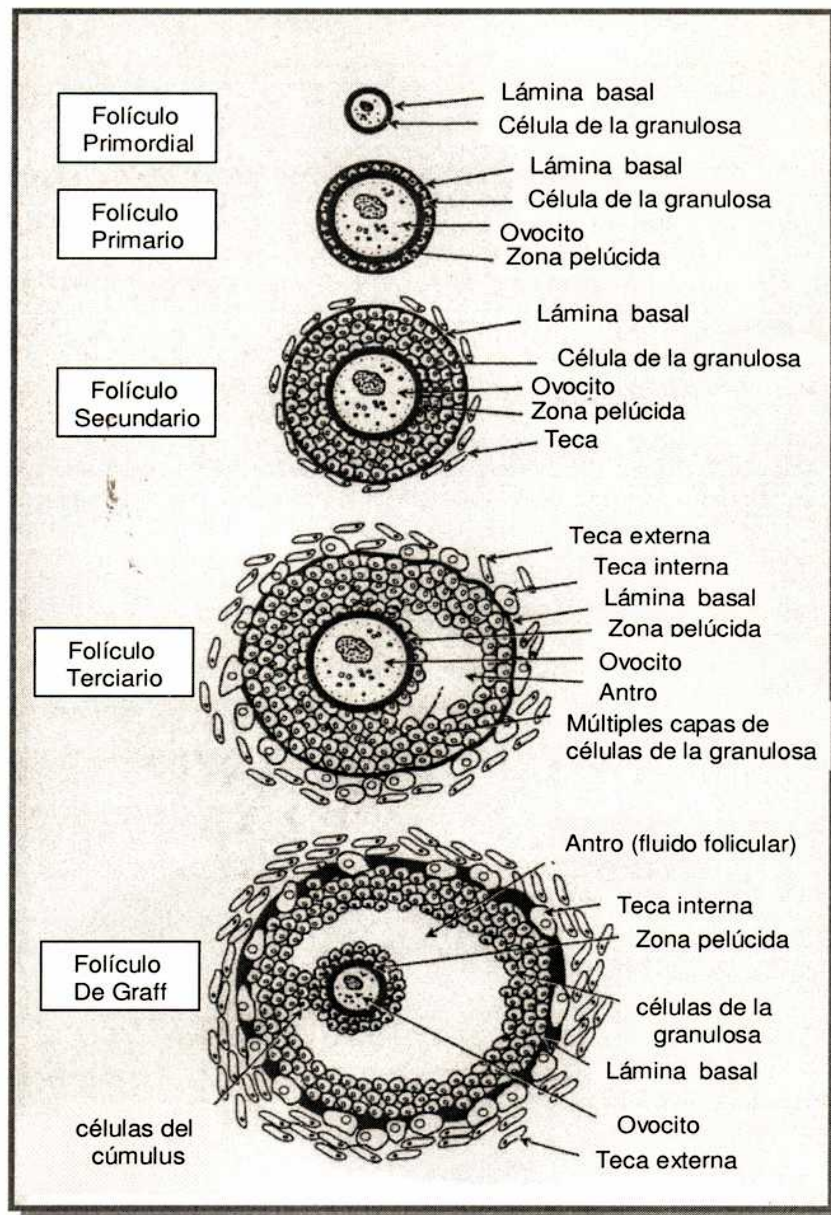


Figura 1. Estructura y clasificación del folículo ovárico durante su desarrollo y crecimiento (Baker, 1999).

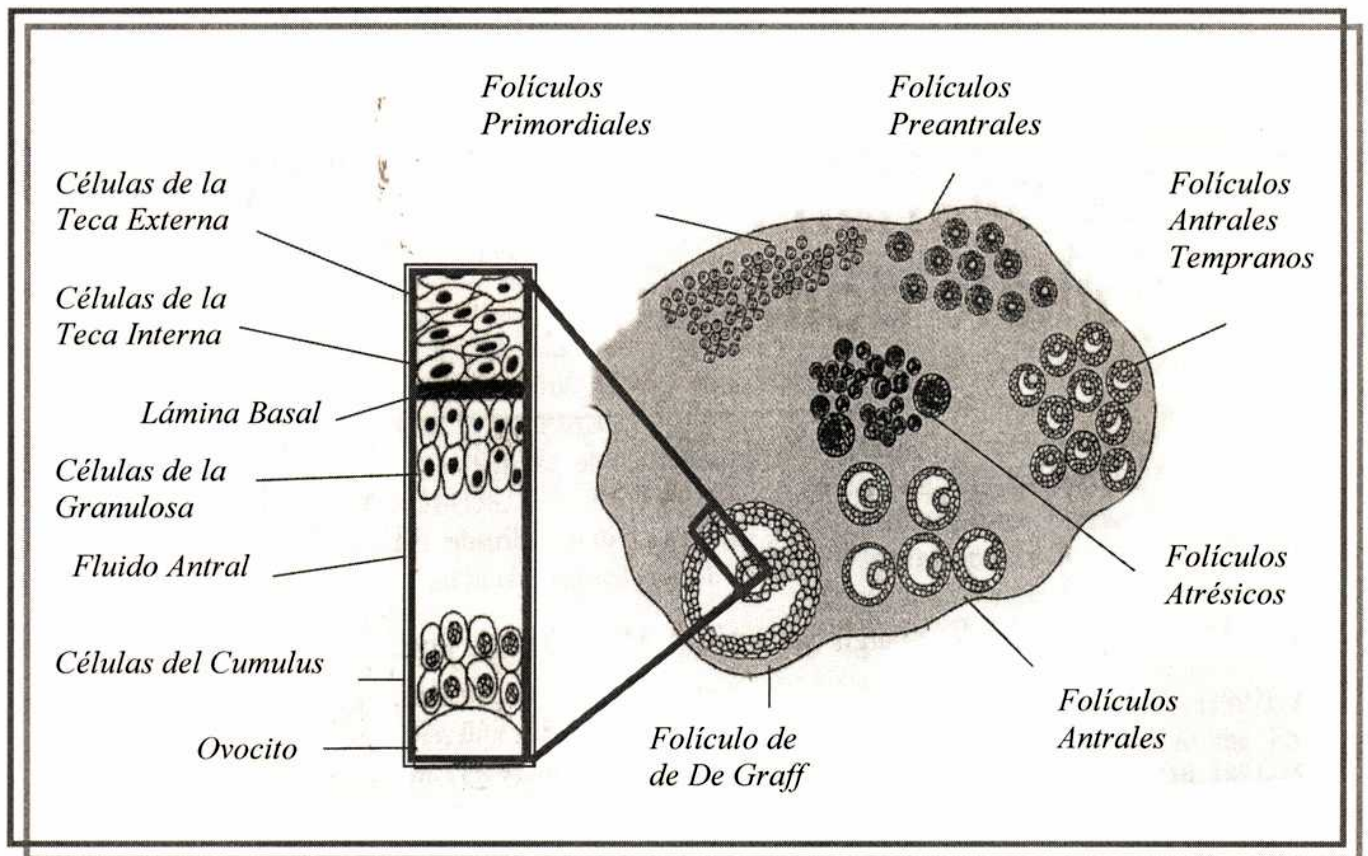


Figura 2. Estructura celular del folículo ovárico (Erickson y col., 1985).

1.4 Ovulación

Durante la fase final del desarrollo folicular, los niveles de estradiol se elevan rápidamente por sobre el umbral estimulando, por un mecanismo de retroalimentación positiva, el pico de las gonadotrofinas. Este evento desencadena la ovulación, que consiste en un aumento del tamaño folicular seguido de la protrusión del folículo desde la corteza ovárica. En este mecanismo intervienen varios componentes entre los que podemos señalar, a modo de ejemplo, a la LH que promueve la luteinización de las células de la granulosa y teca, lo que resulta en la producción de progesterona por dichas células. Este esteroide, mediante un mecanismo de retroalimentación negativa, sería el responsable de la finalización del pico de LH (Caron y col., 1975). Otra importante función de la progesterona es la de aumentar la dilatabilidad de la pared del folículo (Peters y McNatty, 1980). Las prostanglandinas de las series E y F son otros de los componentes importantes involucrados, ya que ayudan a la degradación final de la pared folicular, su concentración aumenta en el folículo preovulatorio y es máxima en el momento de la ovulación (LeMaire y col., 1975).

1.5 Cuerpo Lúteo

Luego de la ovulación, el folículo dominante se reorganiza para convertirse en un cuerpo lúteo. Los capilares y los fibroblastos del estroma circundante proliferan y penetran la membrana basal y las células de granulosa sufren cambios morfológicos conocidos como luteinización. Estas células, junto con las células tecointersticiales circundantes y la invasión por la vasculatura se entremezclan para originar el cuerpo lúteo. El cuerpo lúteo está formado al menos por dos tipos de células esteroidogénicas, morfológicamente diferenciables: las células luteales grandes, que provienen de células de la granulosa y las pequeñas, de origen tecal.

Al cuerpo lúteo se lo considera una glándula endócrina ya que produce progesterona por estímulo de hormonas tróficas hipofisiarias. Sin embargo, se diferencia del resto de las glándulas porque no existe una única hormona trófica para el cuerpo lúteo de todas las especies. En algunas, esta luteotrofina puede ser la LH; en otras, la prolactina y hasta en otras, combinaciones de prolactina, LH y FSH (Rothchild y col., 1974). En el caso de la rata, el cuerpo lúteo puede secretar progesterona en respuesta a la prolactina durante la primera semana de vida, pero

solamente en respuesta a prolactina y LH juntas durante la segunda semana (Morishige y Rothchild, 1974).

1.6 Luteólisis

Si los niveles en descenso de LH al final de la fase lútea no son sustituidos por la hormona placentaria equivalente, la gonadotrofina coriónica humana, el cuerpo lúteo degenera y su secreción de progesterona y estradiol cesa por completo al cabo de 14 días. A menos que ocurra el embarazo, el cuerpo lúteo involuciona espontáneamente y es reemplazado por una cicatriz avascular conocida como *cuerpo albicans*. Durante la regresión del cuerpo lúteo en la rata, se pueden observar diferentes cambios morfológicos (Anderson y Little, 1985). El citoplasma se llena de gotas lipídicas y aumenta la cantidad de vacuolas autofágicas. La vascularización del cuerpo lúteo se empobrece y disminuye el tamaño de las células esteroideogénicas, lo que resulta en un aglomeramiento de los componentes subcelulares. Esto hace que en la fase final de la regresión luteal se observen células en las cuales las organelas más prominentes son las gotas lipídicas y los lisosomas, mientras que las demás organelas se encuentran totalmente desorganizadas.

En cuanto al mecanismo de la involución luteínica, la apoptosis podría ser el medio por el cual los cuerpos lúteos humanos son eliminados. Shikone y col. (1996) han demostrado que los cuerpos lúteos tempranos no mostraban evidencias de fragmentación apoptótica de ADN, mientras que sí se observaban dichos cambios en los cuerpos lúteos de fase media y en los tardíos. También se ha postulado que la interrelación de la progesterona con las prostaglandinas sería necesaria para la luteólisis. Durante la etapa ascendente del ciclo de vida del cuerpo lúteo, éste no responde a los efectos luteolíticos de la prostaglandinas, mientras que en etapas más tardías sí lo hace (Khan y col., 1979; Lamprecht y col., 1975).

2. REGULACIÓN DEL DESARROLLO FOLICULAR

2.1 El eje hipotálamo-hipofisario-gonadal

El hipotálamo juega un rol importante en la regulación hormonal de la función reproductiva femenina (*Figura 3*). Es sabido que el folículo destinado a ovular inicia una secuencia coordinada de eventos que controlan el ciclo menstrual el cual esta regulado por el sistema hipotálamo-hipofisario. El hipotálamo esta conectado con la

hipófisis a través de un sistema porta vascular que sirve de conducto para transportar a las hormonas del cerebro a la hipófisis. El principal factor liberador del hipotálamo que regula la función reproductiva es la GnRH, hormona liberadora de gonadotrofinas. Esta hormona actúa sobre los gonadotropos, las células productoras de gonadotrofinas y estimula la secreción de LH y de FSH. La GnRH induce la liberación de las gonadotrofinas por unión con alta afinidad a su receptor en la membrana plasmática de los gonadotropos, a través de la activación de la proteína quinasa C (PKC).

La FSH y la LH son secretadas en forma coordinada para regular el crecimiento folicular, la ovulación y la vida del cuerpo lúteo. Además la secreción de la FSH y la LH requiere que la liberación del GnRH sea pulsátil.

También es importante mencionar que la liberación de la FSH y la LH está afectada tanto positiva como negativamente por los estrógenos y los progestágenos. El hecho que estos esteroides estimulen o inhiban la liberación hormonal depende de la concentración, la duración y la exposición de la hipófisis a los esteroides. Además de las hormonas esteroideas, al menos tres proteínas gonadales modulan la liberación de FSH, la activina, la inhibina y la folistatina.

2.2 Retroalimentación negativa:

Los estrógenos producen un efecto inhibitorio en el hipotálamo y en la hipófisis. La retroalimentación negativa se hace evidente con el aumento en los niveles de LH y FSH que ocurren cuando bajan los niveles de estrógenos luego de la menopausia o la castración. La inhibición de la secreción de FSH y de LH ocurre con bajos niveles de estrógenos pero se hace más evidente con altos niveles. Además la progesterona en altas concentraciones inhibe la FSH y la LH, en principio a nivel hipotalámico. Por otro lado, como se observa en la *Figura 3* tanto la inhibina como la folistatina inhiben selectivamente la secreción de FSH.

2.3 Retroalimentación positiva:

Además de la retroalimentación negativa, las hormonas gonadales producen un efecto positivo en la secreción de gonadotrofinas. Para que se produzca el pico de LH y consecuentemente la ovulación, se requiere un aumento en los niveles de

estrógenos. Este aumento tiene que ser sostenido en el tiempo y llegar a una concentración mayor de 700 pmol/L. Por otra parte la progesterona es la responsable del aumento de FSH en la mitad del ciclo. Por último, la activina secretada por las células de la granulosa estimula la secreción de FSH (Carr, 1998).

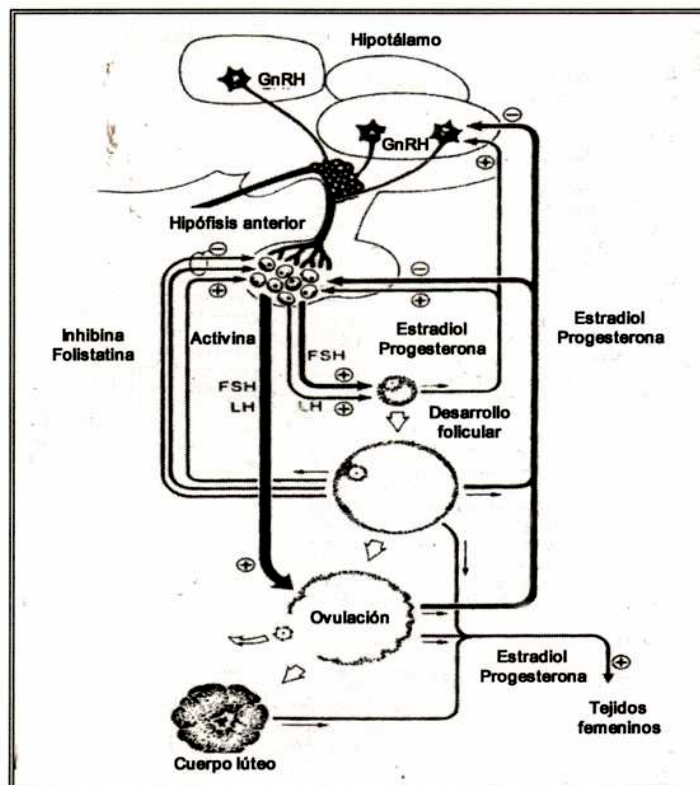


Figura 3. Diagrama que representa el eje hipotálamo-hipofisario-ovárico y la modulación que ejercen los factores gonadales sobre la secreción de gonadotrofinas y el factor liberador hipotalámico (GnRH) (Williams, 1998).

2.4 Reclutamiento inicial vs. cíclico

Existen dos etapas fundamentales en el desarrollo folicular de mamíferos, una etapa de *crecimiento tónico* y otra de *crecimiento exponencial*. La primera corresponde a la conversión de los folículos todavía preantrales en antrales. Esta fase de crecimiento es independiente de las gonadotrofinas, aunque el progreso es lento con bajos niveles de gonadotrofinas circulantes. En lo que corresponde a la etapa de crecimiento exponencial es completamente dependiente y abarca desde el estadio antral al preovulatorio (Driancourt y col., 1993).

Las etapas señaladas han sido descriptas recientemente bajo una nueva denominación por McGee y Hsueh (2000). El término *reclutamiento* ha sido usado para describir dos puntos claves durante el desarrollo folicular. Así, este concepto se puede aplicar al caso en el que los folículos primordiales son *reclutados* y se dirigen hacia una población de folículos en crecimiento continuo, proceso denominado *reclutamiento inicial*. El mismo término se aplica también al caso en el que una cohorte de folículos antrales es reclutada frente al aumento de FSH durante el ciclo reproductivo, proceso denominado *reclutamiento cíclico* (Figura 4).

Durante el reclutamiento inicial, factores intaováricos y/u otros factores no conocidos, estimulan a los folículos primordiales a iniciar su crecimiento, mientras que otros permanecen en estado quiescente. Otra alternativa posible es que este inicio del crecimiento se deba a la liberación por parte de estos folículos de un factor inhibitorio que los mantiene en un estado latente. Este proceso es continuo y comienza luego de la formación del folículo, mucho antes del comienzo de la pubertad. En contraposición, el reclutamiento cíclico comienza con el ciclo reproductivo (en humanos: 28 días; en roedores: 4-5 días) que se inicia en la pubertad y es el resultado del aumento de la FSH circulante. Esta hormona estimula el crecimiento folicular y rescata de esta manera, a un grupo de folículos antrales que de otra forma se convertirían en atrésicos (McGee y Hsueh, 2000).

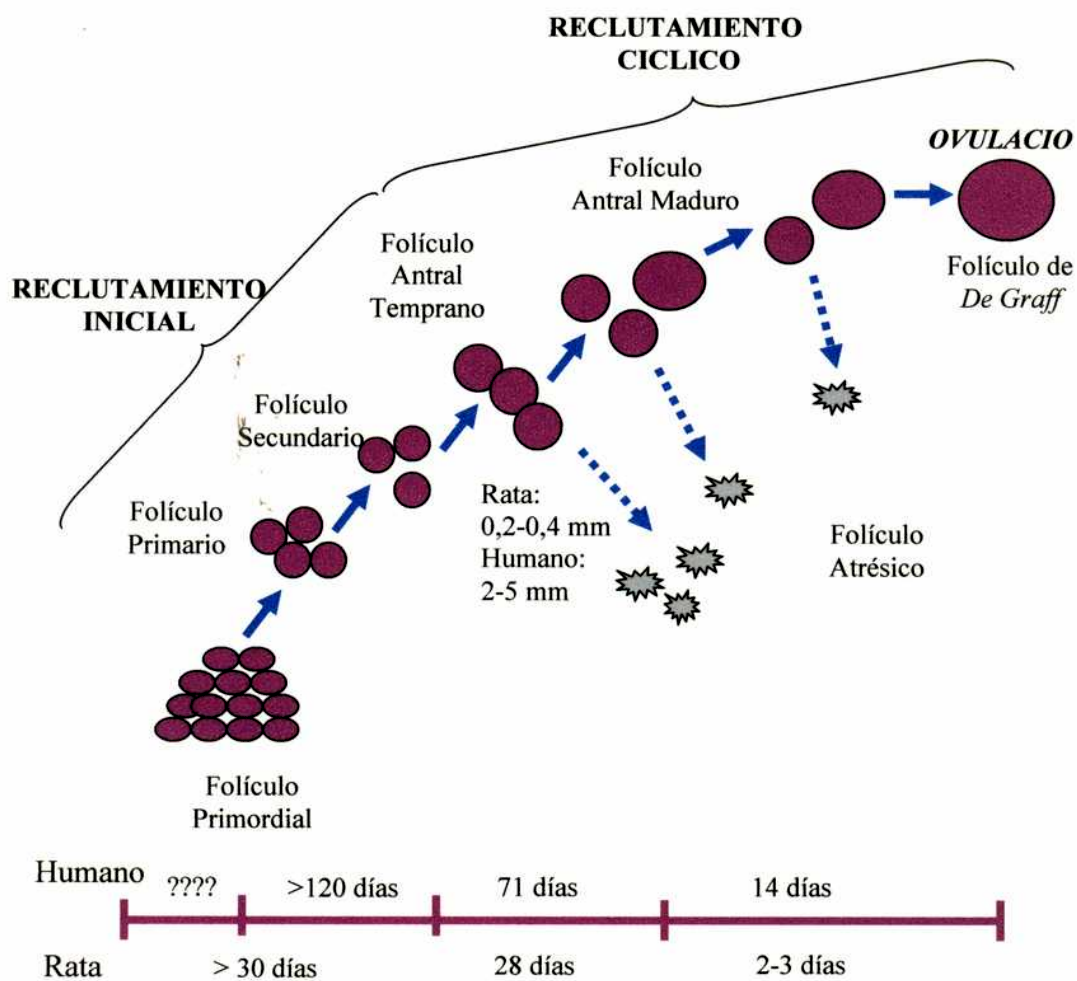


Figura 4. Duración del reclutamiento folicular en rata y humano. Modificado de McGee y Hsueh, 2000.

2.5 Selección del folículo dominante

En forma mas general podemos decir que el *reclutamiento* es un término utilizado para indicar que un folículo ha entrado en la llamada trayectoria de crecimiento, es decir el proceso por el cual un folículo sale de la población latente para comenzar un patrón característico de crecimiento y desarrollo. Mientras que la *selección* se refiere a un proceso por el cual la cohorte folicular en proceso de maduración se reduce a un número equivalente al de la cuota ovulatoria específica para la especie. Al igual que lo que sucede en el reclutamiento, la selección no asegura la ovulación, aunque muy probablemente culmine en ovulación (Driancourt y col., 1993).

La mayoría de los folículos que son reclutados de la población latente de folículos primordiales, donde su crecimiento es independiente de gonadotrofinas, continúan su desarrollo hasta el estadio de antral temprano, dependiente de FSH. En este punto, si la concentración de FSH es baja, los folículos irán a la atresia. Por otro lado, si las concentraciones de FSH son lo suficientemente elevadas, como consecuencia de la disminución en los niveles de estradiol secretados por el cuerpo lúteo en regresión del ciclo anterior, un cierto número de folículos de la cohorte seguirá su desarrollo hacia el estadio antral tardío. Si los folículos que llegan a esta fase dependiente de FSH se encuentran en la “ventana” cuando los niveles de FSH son elevados, pueden proceder al siguiente estadio de desarrollo. De este modo se reduce significativamente el número de competidores, sin embargo se produce un nuevo proceso de reducción, la selección. Como mencionamos anteriormente este proceso involucra el surgimiento del folículo dominante entre la población de folículos en crecimiento. Esto lo llevará al último estadio de desarrollo, mientras que los folículos subordinados restantes irán a la atresia (Baker y Spears, 1999; McGee y Hsueh, 2000).

El surgimiento del folículos dominante y de los folículos subordinados es el resultado de una compleja interacción entre diferentes factores, por lo tanto se define a la dominancia folicular como un proceso formado por dos componentes: regulación endócrina indirecta y regulación intraovárica directa (*Figura 5*).

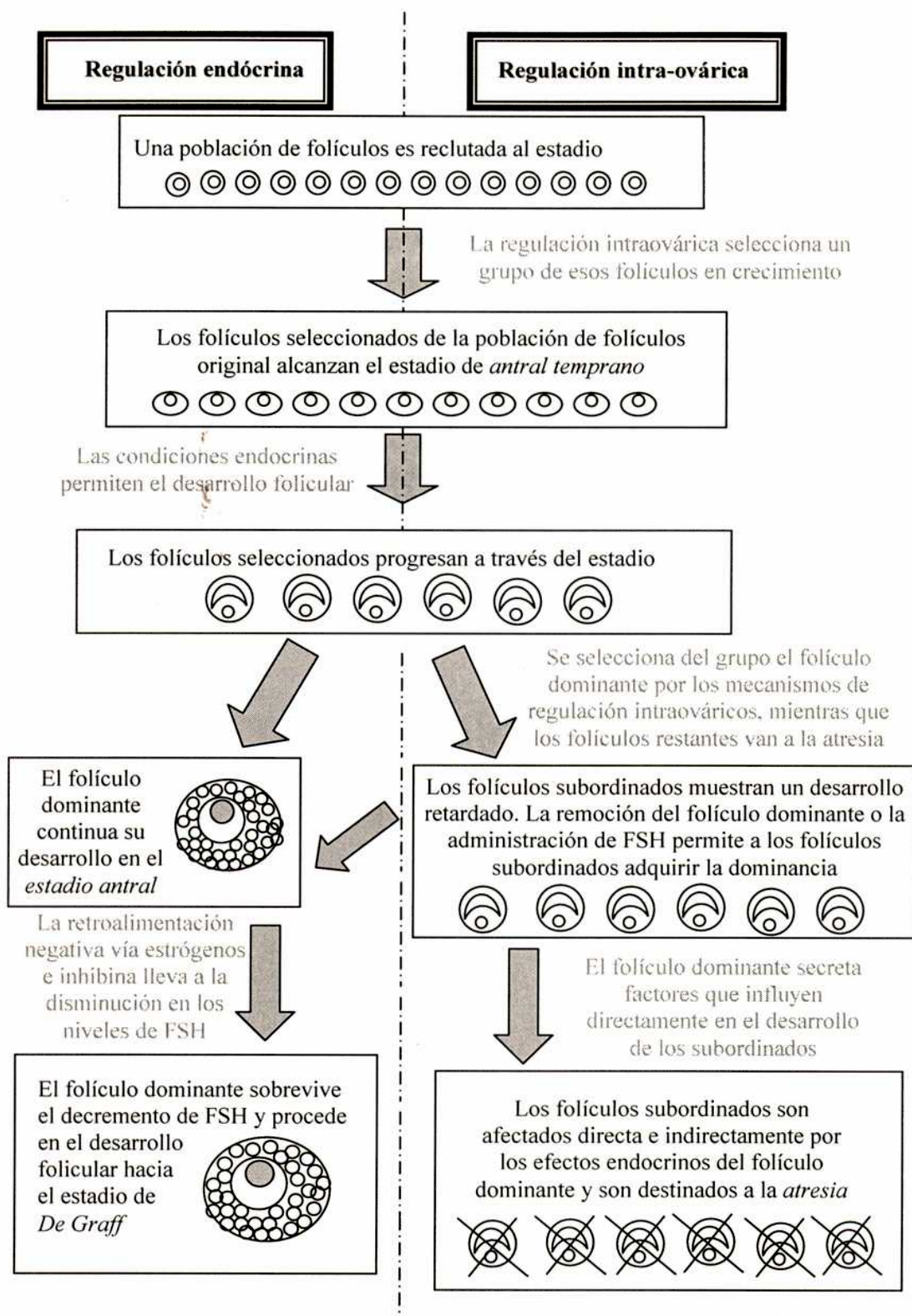


Figura 5. La regulación endócrina e intraovárica en la selección del folículo dominante. Extraído de Baker y Spears (1999).

2.6 Mecanismos de regulación endocrina

El folículo dominante puede ser distinguido de los demás por su tamaño y por el alto índice mitótico de sus células de la granulosa. De esta forma el folículo seleccionado para la ovulación es no solo morfológicamente sino también funcionalmente dominante ya que causa, indirectamente, la suspensión del crecimiento y desarrollo de los folículos subordinados de la misma cohorte, liberando concentraciones crecientes de estradiol y de inhibina a la circulación sistémica. Esto ejerce un efecto positivo sobre la acción de FSH dentro de ellos. Por otra parte, el estradiol junto con la inhibina actúan sobre el sistema hipotálamo-hipofisario disminuyendo la concentración de FSH a niveles que no van a ser suficientes para aquellos folículos subordinados, menos desarrollados y que son altamente dependientes de FSH (Baker y Spears, 1999). Aquél folículo más maduro, el que inicia el decremento en los niveles de FSH, sobrevive a este fenómeno ya que regula de forma positiva los receptores de LH que están acoplados al sistema de aromatasas en las células de la granulosa y aumenta, posiblemente, la concentración de los receptores a FSH. Además el ovario es un sitio de alta angiogénesis, y el folículo dominante adquiere más teca vascularizada, quizás debido a un incremento en los niveles del factor de crecimiento epidérmico (EGF), correlacionado positivamente con las concentraciones de estradiol. Todo esto permite al folículo dominante mantener una alta captación de gonadotrofinas séricas. De esta forma el folículo dominante tiene varios mecanismos para secuestrar las gonadotrofinas disponibles y sobrevivir el decremento en los niveles de FSH. Ahora bien, hay que tener en cuenta que los folículos subordinados son altamente susceptibles al decremento de gonadotrofinas y como consecuencia las células de la granulosa mueren por apoptosis y los folículos van a la atresia.

2.7 Mecanismos de regulación intraovárica

Al pensar en la selección de un folículo dominante entre una cohorte de folículos en crecimiento, no se debe olvidar que una comunicación intraovárica está involucrada en este proceso. Esto puede ocurrir a través de tres posibles vías:

- una regulación *parácrina*, que involucra una comunicación entre diferentes células a través de la difusión local de mensajeros químicos producidos en una célula para actuar en otras células blanco;
- una regulación *autócrina*, que involucra un sistema de autoregulación donde un tipo de célula produce factores que actúan sobre la misma célula de origen;
- y una regulación *juxtacrina*, que resulta del contacto célula-célula permitiendo a moléculas de superficie asociarse e interactuar entre ellas.

Todos estos tipos de comunicaciones pueden subsecuentemente llevar a la activación de cascadas de transducción de señales en la célula y a posteriores alteraciones funcionales.

Destaco la existencia de un método adicional de regulación intraovárica de la dominancia folicular, ya que posee particular interés en la formulación de la hipótesis de la presente tesis, y es la interacción *entre* folículos. Este tipo de interacción puede potenciar el efecto de la regulación endocrina ejercida sobre el folículo dominante a través de la producción, por parte de éste, de factores que afectan directamente a los folículos subordinados. Por ejemplo, estas interacciones interfoliculares pueden tener un rol en el mantenimiento de la dominancia, una vez que ésta se estableció, reteniendo o “manteniendo a raya” a aquellos folículos que pueden desafiar su dominancia. Esto hecho podría explicar el fenómeno de olas foliculares que se observa en algunas especies. Si el folículo dominante se encuentra en un ambiente hostil una vez alcanzada la dominancia y consecuentemente se produce su regresión, la influencia inhibitoria al resto de los folículos sería removida y éstos podrían reasumir el desarrollo y competir por la dominancia (Baker y Spears, 1999).

Ahora bien, varios factores han sido propuestos como responsables de inhibir el crecimiento de folículos vecinos subordinados. Por ejemplo Di Zerega (1982) identificó una proteína secretada por el folículo dominante en humanos con un peso molecular entre 14.000 y 18.000 kDa, que suprime la respuesta folicular a las gonadotrofinas. Por otro lado Cahill y col. (1985) demostraron que el fluido folicular de ovinos inhibe el desarrollo de folículos de más de 2 mm de diámetro y reduce el índice mitótico en células de la granulosa de folículos de menos de 2 mm de diámetro. Campbell y col. (1991) describieron una sustancia presente en folículos

preovulatorios ovinos que induce la atresia y la pérdida de la actividad esteroidogénica luego de ser inyectada en ovejas ciclando. Más recientemente, Hynes y col. (1997) caracterizó, en bovinos, un factor inhibidor de las células de la granulosa (GCIF) que inhibe la proliferación de folículos pequeños y medianos. Este factor de menos de 5 kDa de peso molecular inhibe la proliferación de las células de granulosa en cultivo provenientes de folículos pequeños y medianos, pero no de folículos grandes. Además la administración en forma sistémica de este factor en ratas ciclando inhibe la formación de folículos grandes y aumenta el número de folículos pequeños.

3. CICLO OVÁRICO DE LA RATA

El término *estro* fue utilizado por primera vez por Heape en el año 1900 para describir el período durante el cual la hembra está dispuesta a recibir al macho en coito fecundante. El período anterior al estro lo denominó *proestro* caracterizado como el momento en que el animal entra en celo. En ausencia de concepción el estro es seguido por el *metaestro*, también conocido como *diestro 1*. El período siguiente, *diestro* (Woodruff y col., 1993), tiene una duración variable de acuerdo a las especies, y es el tiempo durante el cual la secreción ovárica prepara los tejidos reproductivos para la recepción del óvulo fertilizado luego del coito en estro. En la rata dura normalmente uno o dos días, determinando que el ciclo estral tenga una duración de 4 o 5 días. Si la fertilización no ocurre, el animal vuelve al período de proestro y un nuevo ciclo se inicia (*Figura 6*).

A nivel vaginal se pueden determinar por observación con microscopio a bajo aumento los distintos estadios del ciclo, según los tipos celulares presentes en el extendido. En el proestro predominan células epiteliales nucleadas, redondas y algunas veces escamosas. En el estro predominan las células escamosas mientras que en el diestro 1 y 2 los leucocitos son mayoritarios.

La rata de laboratorio es un mamífero no estacional, de ovulación espontánea y poliéstrico. Es decir, el ciclo ovárico ocurre durante todo el año y la ovulación no depende del estímulo de la cópula.

Podemos afirmar que por dichas características, sumadas a su fácil reproducción y mantenimiento en el bioterio, que la rata de laboratorio representa un buen modelo para el estudio de la fisiología ovárica gonadal.

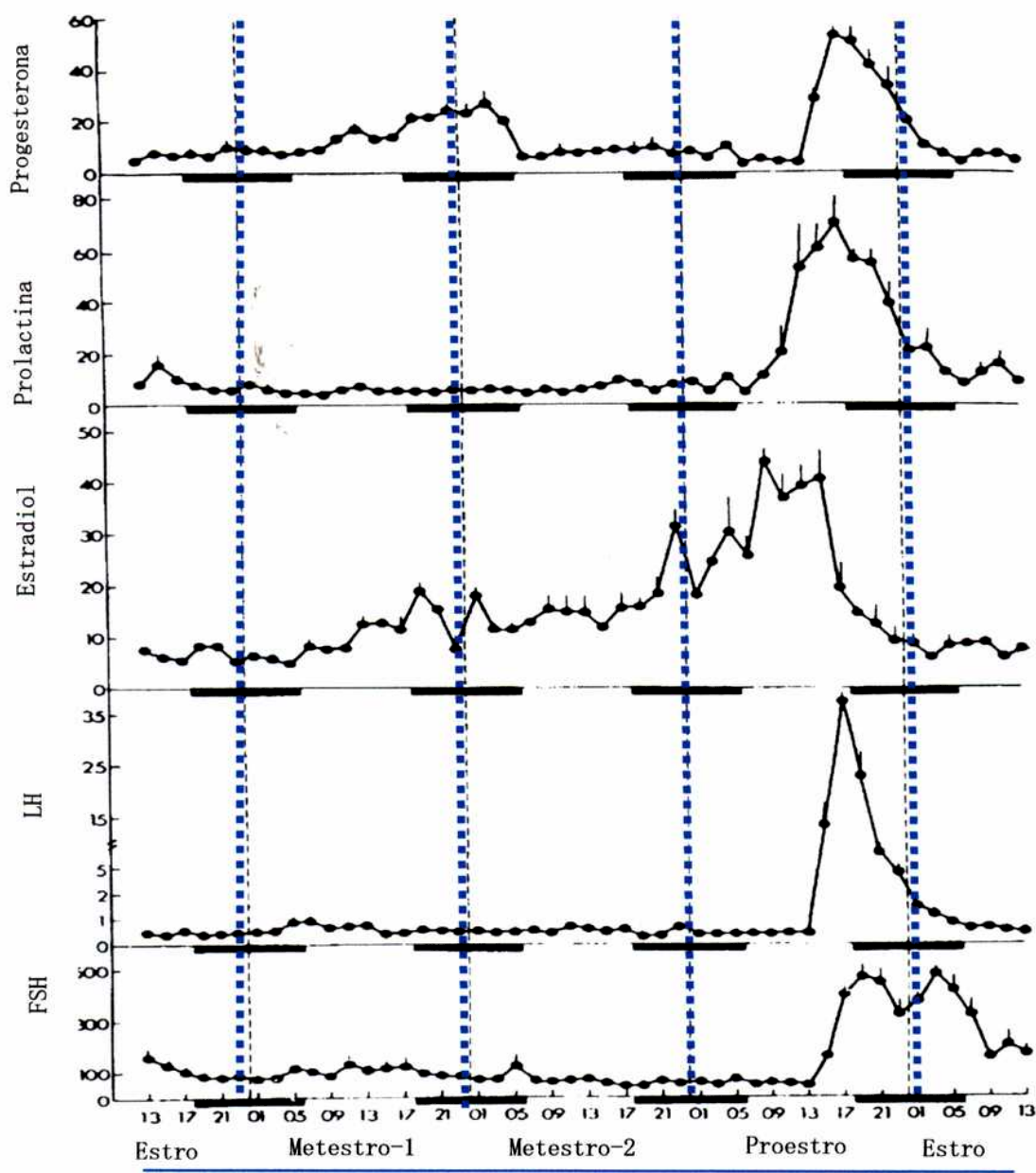


Figura 6. Niveles séricos de progesterona, prolactina, estradiol, LH y FSH, a lo largo de los cuatro días del ciclo estral en la rata. Las barras negras representan el período de oscuridad de (1800 a 0600), los números en la abscisa indican la hora del día extraído de Smith, 1975.

3.1 Patrones de secreción hormonal durante el ciclo estral. Hormonas esteroideas

3.1.1 Transporte intracelular del colesterol

Las principales células productoras de esteroides en el ovario son las células de la granulosa, las de la teca y las del cuerpo lúteo, las cuales poseen el complemento enzimático necesario para la síntesis de esteroides. Las hormonas esteroideas pueden clasificarse, sobre la base de su función biológica y estructura química, en tres clases: *progestágenos*, *andrógenos* y *estrógenos*. Además todos estos esteroides derivan del colesterol, el cual puede provenir de lipoproteínas en circulación, de almacenamientos intracelulares en forma de ésteres de colesterol, o bien a partir de síntesis *de novo* en la misma célula. La importancia relativa de cada una de estas rutas varía con la especie, con el tipo celular involucrado y con el estado fisiológico (Strauss III y col., 1981).

En cuanto a la captación de lipoproteínas de la circulación, son las células de la teca interna las que tienen acceso a las mismas ya que se encuentran muy vascularizadas. En cambio esto no ocurre en las células de la granulosa, por encontrarse aisladas de los capilares sanguíneos por la membrana basal que actúa como barrera a distintas moléculas, entre las que podemos mencionar a la LDL. Es así entonces que la LH se une a su receptor en la célula de la teca y estimula la actividad de la adenilato ciclasa, produciendo AMPc, el cual actuando como un segundo mensajero produce un aumento en la expresión del receptor para LDL. De esta manera, aumenta la entrada de colesterol a la célula y la formación de ésteres de colesterol. La transferencia intramitocondrial del colesterol es llevada a cabo por la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR) (Clark y col., 1995).

3.1.2 Ruptura de la cadena lateral del colesterol

El primer paso en la conversión de colesterol a esteroides es el clivaje de la unión C20-C22 que da como productos un compuesto de 21 carbonos, la pregnenolona, y un fragmento de 6 carbonos, el aldehído isocaproico. Esta reacción está catalizada por un sistema enzimático denominado SCC (*side-chain cleavage*) ubicado en la cara interna de la membrana mitocondrial interna. Es un complejo multienzimático formado por tres componentes: un citocromo P450 (P450 scc), que es la oxigenasa terminal

(aceptor de electrones), una flavoproteína que contiene FAD (*flavin adenin dinucleótido*) y una proteína que contiene hierro y azufre, llamada *luteodoxina* o *adrenodoxina*, que transporta electrones entre los otros dos componentes. La reacción utiliza NADPH, generado dentro de la mitocondria por oxidación de intermediarios del ciclo de Krebs o de ácidos grasos.

3.1.3 Síntesis de pregnenolona

La pregnenolona es el intermediario clave de la biosíntesis de esteroides. Una vez sintetizada, abandona la mitocondria y en el retículo endoplasmático liso es convertida en progesterona por una enzima (o complejo enzimático): Δ^5 - 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa: Δ^5 -4-isomerasa (3β -HSD). Las actividades de isomerasa y deshidrogenasa no se han podido separar en tejidos esteroideogénicos de mamíferos y parecen funcionar como una unidad. La enzima utiliza NAD⁺ como aceptor de electrones y la reacción es irreversible en condiciones fisiológicas.

La progesterona se requiere para la implantación del ovocito fertilizado y el mantenimiento del embarazo o preñez. También, induce la desidualización del endometrio, inhibe las contracciones uterinas, aumenta la viscosidad del mucus cervical, promueve el desarrollo glandular de las mamas y aumenta la temperatura corporal basal.

3.1.4 Síntesis de andrógenos

El complejo enzimático que cataliza la conversión de progestágenos a andrógenos es la 17α -hidroxilasa ($C_{17,20}$ -liasa). Este sistema enzimático, situado en la membrana del retículo endoplasmático liso, es una oxidasa de función mixta que contiene un citocromo P450 y requiere NADPH y O₂. La reacción puede utilizar tanto pregnenolona como progesterona a manera de sustratos, resultando en los respectivos productos dehidroepiandrosterona (DHEA) o androstenediona. Estos dos vías alternativas son conocidas como vías Δ^5 y Δ^4 , respectivamente.

3.1.5 Síntesis de estrógenos

En el retículo endoplasmático liso de las células de la granulosa se encuentra un complejo enzimático denominado aromatasa el cual convierte los andrógenos, la androstenediona y la testosterona, provenientes de las células de la teca, en los

estrógenos estrona y 17β -estradiol (esteroides C_{18}), respectivamente. El complejo contiene un citocromo P450 y cataliza una reacción en varios pasos, lo que resulta en la transformación del anillo A del esteroide en una estructura aromática. La reacción requiere NADPH y O_2 .

3.1.6 Metabolismo de la progesterona

La progesterona secretada por las células de granulosa puede ser convertida a diferentes metabolitos en roedores. La principal vía de ruptura de la progesterona es mediada por la enzima 20α -hidroxiesteroide deshidrogenasa, la cual convierte a la progesterona en forma reversible, en su metabolito inactivo, la 20α -hidroxiprogesterona (20α -OH-P).

En la Figura 7, se pueden observar las principales enzimas que intervienen en la biosíntesis de esteroides.

3.1.7 La teoría “dos células, dos gonadotrofinas”

La síntesis de hormonas esteroideas parece estar dividida en compartimentos dentro del folículo. Si bien cada compartimiento retiene la capacidad de producir andrógenos, estrógenos y progestágenos, la actividad de la aromatasa de las células de la granulosa excede en gran medida a la observada en las células teca (Hillier y col., 1980), carentes de receptores para FSH. Entonces, las células de la granulosa producen, en mayor medida estrógenos, mientras que la síntesis de andrógenos predomina en células teca (McNatty, 1980). La biosíntesis de estrógenos dada por ambos tipos de células dio origen a la hipótesis “*dos células, dos gonadotrofinas*” (Fortune y Armstrong, 1977) (Figura 8). La LH estimula la síntesis de andrógenos a partir del colesterol en las células teca. Los andrógenos difunden a través de la lámina basal por medio de una red de capilares y se convierten en estrógenos por medio de la enzima aromatasa, inducida por FSH en las células de la granulosa (Moon y col., 1978). Además, la progesterona liberada por las células de granulosa en respuesta a las gonadotrofinas puede difundir hacia las células teca convirtiéndose en sustrato para la síntesis de andrógenos. Aunque la actividad de la aromatasa es principalmente estimulada por FSH, estudios *in vitro* en células de la granulosa provenientes de ratas inyectadas con FSH mostraron que el LH también estimula directamente la producción de estrógenos.

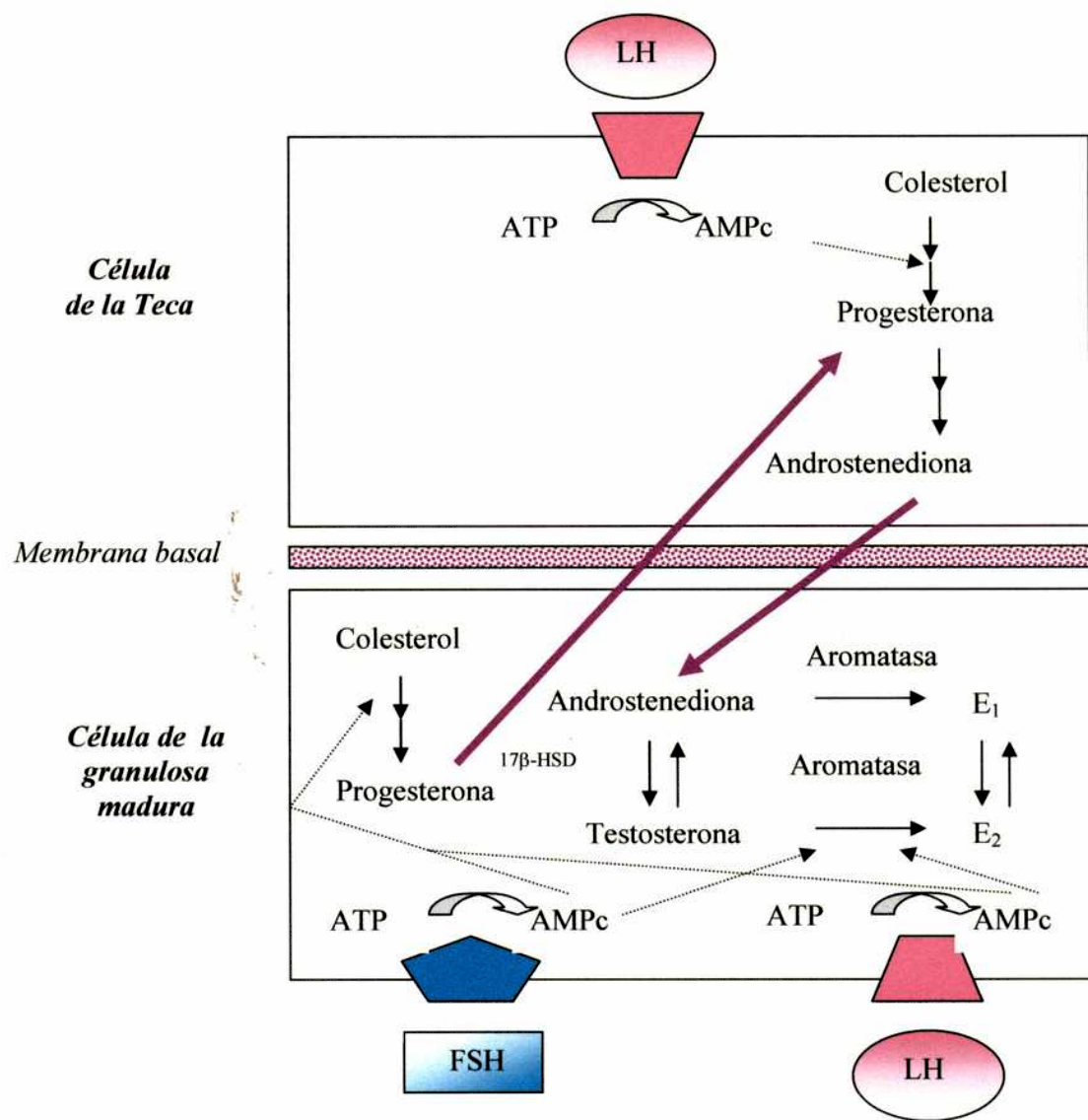


Figura 8. Esquema que describe la hipótesis de dos células-dos gonadotropinas, extraído de Fortune, 1977.

4. MUERTE CELULAR

4.1 Apoptosis

La apoptosis fue descubierta por primera vez por Carl Vogt en el año 1842. Sólo luego de un siglo después Kerr, Wyllie y Curie reiniciaron las investigaciones en este tema y en 1972 acuñaron el término apoptosis para describir una serie de eventos morfológicos y un patrón de fragmentación del ADN de tipo escalera en células adrenales luego de la remoción del estímulo de ACTH (Kerr y col., 1972; Wyllie, 1980). La *apoptosis* o muerte celular programada, es un evento activo que ocurre durante el desarrollo embrionario, la metamorfosis, en la renovación de tejidos y en varias condiciones patológicas. Particularmente, es el mecanismo celular utilizado en la atresia folicular en mamíferos. Este evento se caracteriza por cambios morfológicos tales como:

- ↳ la condensación del citoplasma y de la cromatina, acompañada por picnosis nuclear que resulta en la marginación de la cromatina y su redistribución a lo largo de la membrana nuclear
- ↳ la formación de ampollas en la membrana plasmática y la liberación de vesículas conteniendo restos celulares rodeadas por membrana plasmática denominados cuerpos apoptóticos.

También se observan cambios bioquímicos tales como la activación mediada por caspasas de endonucleasas dependientes de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ que degradan el ADN en fragmentos múltiples de 180 pares de bases, los cuales pueden ser visualizados en una electroforesis en gel de agarosa (Wyllie y col., 1980). El paso final de la apoptosis involucra la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por parte de las células vecinas y los macrófagos. Este tipo de “limpieza” controlada de los restos celulares logra evitar una respuesta inflamatoria (Pru y Tilly, 2001).

4.2 La apoptosis como mecanismo de atresia folicular

En el ovario humano se encuentran al nacer 2 millones de ovocitos y alrededor de 400.000 folículos están presentes en la pubertad. Sin embargo, durante la vida fértil de la mujer menos del 1% de estos folículos serán ovulados, el resto sufrirá cambios

degenerativos por mecanismos apoptóticos, para ser eliminados del ovario. El proceso degenerativo por el cual los folículos son eliminados antes de llegar a la ovulación se denomina *atresia*. La palabra atresia deriva del idioma griego (a: no; tresia: perforado). Por lo tanto, la gran mayoría de los folículos sufrirá atresia durante su crecimiento y desarrollo y no llegará a alcanzar el estadio de De Graff (Gosden y Spears, 1997; Hirshfield, 1991b).

Aunque los folículos pueden sufrir apoptosis en cualquier momento de su desarrollo, existen dos puntos clave donde aumenta la susceptibilidad de que este evento ocurra. El primero y el mas estudiado, es el penúltimo estadio justo antes de la ovulación, donde los folículos no dominantes entran en atresia. Y el segundo estadio donde la apoptosis se ve aumentada, es el de antral temprano. La FSH es el mayor factor regulador de la supervivencia folicular en la rata en este segundo estadio. Asimismo es considerable la cantidad de datos que se han acumulado en cuanto a los factores que regulan la apoptosis de folículos antrales y de De Graff en ratas. Sin embargo no existen muchos estudios que investiguen la regulación de la apoptosis de folículos antes del estadio antral (McGee, 2000).

Los análisis inmunocitoquímicos realizados en folículos atrésicos, muestran que la marca apoptótica está confinada a las células de granulosa (Tilly, 1996). Además, la fragmentación del DNA se encontró en folículos atrésicos y no en los saludables, demostrando el rol de la apoptosis en la atresia folicular (Tilly y col., 1991). Similares estudios mostraron la presencia de actividad de endonucleasas en ovarios de ratas tratadas con PMSG y hCG; indicando que la atresia dada por la apoptosis involucra la activación de endonucleasas (Zelevnik y col., 1989).

No existe un criterio objetivo para detectar la atresia en folículos primordiales o intermedios. Sin embargo en humanos la atresia que se observa en los folículos de menos de 1 mm de diámetro se caracteriza por una desorganización temprana del ovocito, seguido de una retracción de las células de la granulosa y una hipertrofia de las células tecales. En los folículos mas grandes, la atresia se visualiza por la presencia de cuerpos picnóticos (material nuclear condensado), el cual determina el estado atrésico del folículo. A medida que el número de cuerpos picnóticos aumenta, la capa de células de la granulosa desaparece y la capa de células tecales cambia a tejido intersticial. Por último en un estadio muy avanzado de atresia, se observa una

invasión de la cavidad folicular por fibroblastos, la desaparición del tejido intersticial y la degradación del ovocito. Es interesante señalar que la regresión total de un folículo antral grande de rata ocurre en 4 días (Driancourt y col., 1993).

Como mencioné anteriormente, el número de cuerpos picnóticos determina el estadio atrésico del folículo. Tsafiri y col. (1994) describieron estas diferentes etapas y las dividieron en tres estadios (Figura 9):

- Estadio I: se caracteriza por un bajo número de células de la granulosa (<10%) con núcleos picnóticos cerca del antro folicular mientras otras células se encuentran en mitosis.

- Estadio II: se caracteriza por la presencia de varias células de la granulosa picnóticas (10-30%), pocas células en mitosis y restos celulares en el antro. La membrana celular pierde la integridad y existe infiltración de leucocitos en la capas de células de granulosa. En este estadio de atresia, los folículos de rata no pueden ser rescatados por el tratamiento con PMSG y degeneran (Hirshfield, 1988).

- Estadio III: se caracteriza por una reducción en el número de células de la granulosa, ausencia de células en mitosis y un colapso del folículo. Las células de la teca se hiperatrofian y contienen gotas de lípidos. Estas células forman parte ahora de las células intersticiales del estroma y se cree que son activas a nivel esteroideogénico. También ocurren otros cambios histológicos como la separación de la membrana basal y la formación de cuerpos apoptóticos. Con respecto al ovocito, sufre ruptura de la vesícula germinal probablemente como resultado de los cambios ocurridos en células de la granulosa.

Además de los cambios morfológicos, se observan también cambios funcionales a medida que la atresia progresa, como por ejemplo la reducción de la esteroideogénesis, en forma tanto cualitativa como cuantitativa. El marcador de atresia más temprano es la reducción en los niveles de aromatisación, lo que induce una acumulación de andrógenos. De esta manera la disminución en los niveles de estradiol también reduciría el número de uniones estrechas entre las células de la granulosa, induciendo la presencia de los primeros cuerpos picnóticos. Estos eventos requieren solo de un día y en este estadio el folículo todavía puede ser rescatado de la atresia

por un aumento en los niveles de FSH, por lo menos en ovejas (Driancourt y col., 1993).

Por último se han identificado varios marcadores bioquímicos tales como la síntesis reducida de ADN en células de la granulosa (Greenwald, 1989), inhibición de la expresión de la proteína conexina 43 que participa en las uniones estrechas (Wiesen y Midgley Jr., 1994) y disminución en la expresión de ARNm de los receptores de la aromatasa y de las gonadotrofinas (Uilenbroek y col., 1980). También, se ha encontrado un aumento en la expresión de varios genes como proteínas que unen IGF-1 (IGFBPs) (Nakatani y col., 1991a), catepsina (Dhanasekaran y Moudgal, 1989) y angiotensina II (Daud y col., 1988).

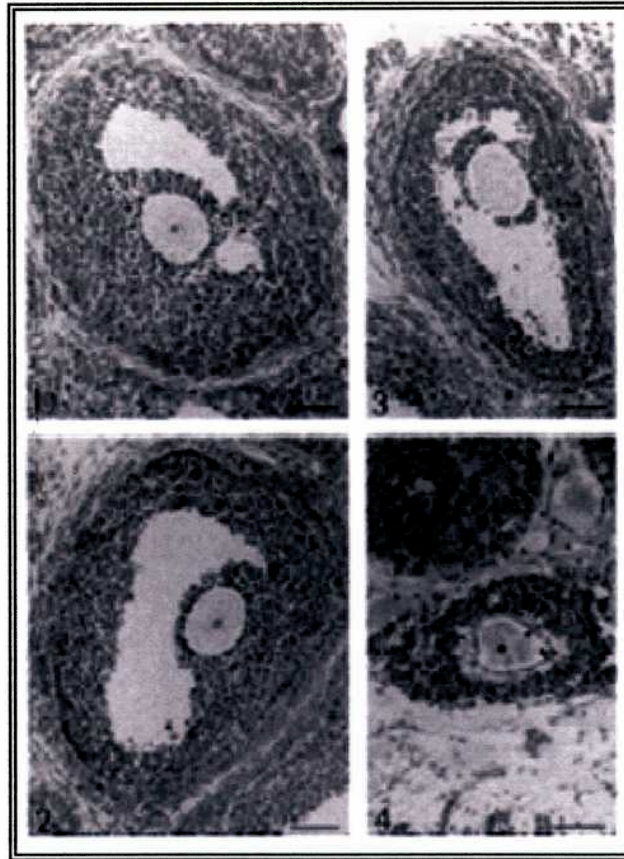


Figura 9. Histología de folículos teñidos con hematoxilina-eosina en diferentes estadios de atresia en el ovario de rata. *1.* folículo antral no atrésico. El ovocito está intacto y no hay células de la granulosa picnóticas. *2.* estadio I de atresia. En el ovocito la vesícula germinal está intacta. Se observan núcleos picnóticos en células de la granulosa. *3.* estadio II. El ovocito muestra cambios de tipo meiótico. Pb, cuerpo polar. *4.* estadio III de atresia. El ovocito (*) se encuentra fragmentado, la teca interna se encuentra hipertrofiada y solo quedan algunas células de la granulosa (flechas). El folículo colapsa. Bar = 50 mm. Extraído de Hsueh, 1994.

4.3 Mecanismos moleculares de la atresia

4.3.1 Miembros de la familia de Bcl-2

El gen de bcl-2 (Woodruff y col., 1993) fue reconocido por primera vez como un protooncogen cuya translocación cromosomal se asociaba al linfoma de células B. Esta translocación hace que el gen de bcl-2 quede bajo el control del promotor y del enhancer del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas. De esta manera, cuando se activa la transcripción en las células linfoides, se produce una sobreexpresión de la proteína Bcl-2, ocasionando consecuentemente una tumorigénesis (Tsujimoto y col., 1985).

La proteína Bcl-2 se localiza en la mitocondria, en la membrana perinuclear y en el retículo endoplásmico liso. Cuando se sobreexpresa, la proteína Bcl-2 suprime la apoptosis inducida por una variedad de agentes, tanto in vitro como in vivo (Baffy y col., 1993; McDonnell y col., 1990; Nuñez y col., 1991). Sin embargo, la acción supresora de Bcl-2 no es universal, esta proteína puede no prevenir la apoptosis en muchas ocasiones, por lo tanto su acción supresora está restringida a ciertos estímulos apoptóticos en ciertos tejidos (Hsu y Hsueh, 2000).

Con el advenimiento de técnicas como el aislamiento de genes homólogos, la interacción proteína- proteína, el clonado substractivo y el análisis genético viral, se han identificado una gran variedad de genes relacionados con Bcl-2, conformando una superfamilia. De acuerdo a sus cualidades estructurales y funcionales, las proteínas de la superfamilia de Bcl-2 se pueden dividir en tres grupos (Figura 10):

- 1) **proteínas de Bcl-2 antiapoptóticas formadoras de canales:** poseen dominios BH (BH 1 a 4) y una secuencia de anclaje a la membrana. Entre sus miembros se encuentran el Bcl-2, el Bcl-x_{long} y el Mcl-1;
- 2) **proteínas de Bcl-2 proapoptóticas formadoras de canales:** poseen todos los dominios BH menos el dominio BH4 el cual es esencial para la inhibición de la apoptosis. Entre sus miembros se encuentran el Bax, el Bak y el Bok;
- 3) **ligandos proapoptóticos:** poseen solamente el dominio BH3 y entre sus miembros podemos encontrar al Bik, el Hrk, el Bad y el Bod.

Proteínas antiapoptóticas formadoras de canales



Proteínas proapoptóticas formadoras de canales



Ligandos proapoptóticos

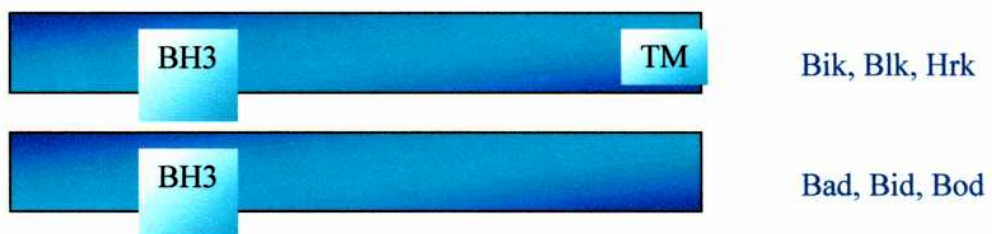


Figura 10. Estructura de los miembros de la familia de Bcl-2. BH: dominios de homología de Bcl-2; TM: región transmembrana. Extraído de Hsu y Hsueh (2000).

Se supone que los dos primeros grupos de proteínas se anclan a la membrana de la mitocondria, mientras que el tercer grupo de proteínas actúa como un ligando que dimeriza con los “receptores” de Bcl-2 formadores de canales. El dominio de BH3 es esencial para la unión de los ligandos a las proteínas formadoras de canales (Hsu y Hsueh, 2000). En la *Figura 11*, se pueden observar los distintos dominios funcionales presentes en las proteínas de Bcl-2.

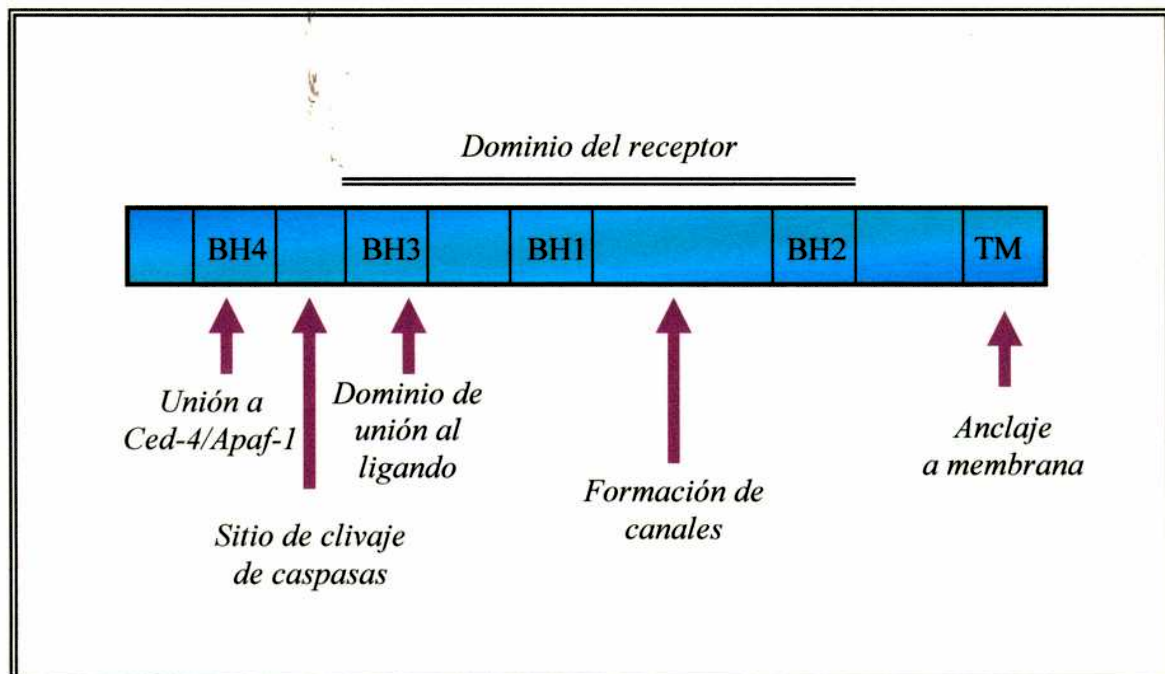


Figura 11. Dominios funcionales diferentes de las proteínas de Bcl-2. Extraído de (Hsu y Hsueh, 2000).

Los miembros de la familia de Bcl-2 son proteínas multifuncionales y las interacciones proteína-proteína que ocurren entre ellos cumplen un importante rol en la regulación de la apoptosis. Uno de los mecanismos por los cuales las proteínas de esta familia regulan la apoptosis es a través de la homodimerización y heterodimerización con proteínas de la misma familia. Por ejemplo, la proteína Bax (21 kD) originalmente fue identificada por su capacidad para unirse no covalentemente con Bcl-2 y en la

actualidad se sabe que contrarresta la acción no apoptótica de Bcl-2. Además, así como la relación Bcl-2:Bax determina el futuro de la célula, se describe una situación similar para el gen Bcl-x. Este gen es otro miembro de la familia de Bcl-2 y genera, por splicing alternativo, una isoforma corta proapoptótica (Bcl-x_{short}), y una isoforma larga antiapoptótica (Bcl-x_{long}). La forma larga codifica para una proteína que cuando se encuentra elevada previene la apoptosis de una forma similar a Bcl-2. En contraposición, la forma corta codifica para una proteína idéntica en secuencia a Bcl-x_{long} con la excepción de una delección de 63 aminoácidos. Cuando se expresa en exceso tienen un efecto inductor de la apoptosis, análogo al observado con Bax (Tilly y col., 1995).

Finalmente, los cambios en la relación Bcl-2/Bcl-x_{long}:Bax/Bcl-x_{short} son los que llevarían a la célula a la supervivencia (aumento en la expresión de Bcl-2 y/o Bcl-x_{long}) o a la muerte por apoptosis (aumento en la expresión de bax y/o Bcl-x_{short}) (Boise y col., 1993; Oltvai y col., 1993). De esta manera, se propone un modelo en donde la relación existente entre las proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-x_{long}) respecto de las proteínas proapoptóticas (Bax, Bcl-x_{short}) determina la susceptibilidad de la célula a la apoptosis (Oltvai y col., 1993).

Ahora bien, cuando la relación entre estas proteínas pro y antiapoptóticas lleva a una célula a la apoptosis, estas proteínas participarán, de una u otra forma, en la formación de un canal que favorecerá la liberación del citocromo c de la mitocondria. No obstante todavía no es claro como regulan los miembros de la familia de Bcl-2 la salida del citocromo c, pero básicamente se postulan tres modelos:

- 1) Los miembros de la familia de Bcl-2 forman canales que facilitan el transporte de proteínas.

Basándose en la similitud de Bcl-x_{long} con la subunidad formadora de canal de la toxina diftérica, se ha sugerido que las proteínas de Bcl-2 podrían actuar insertándose, luego de un cambio conformacional, en la membrana externa mitocondrial donde podrían formar un canal.

- 2) Los miembros de la familia de Bcl-2 interactúan con otras proteínas para formar canales.

Según este modelo, podría ser que los miembros pro-apoptóticos de la familia recluten otras proteínas de la membrana externa mitocondrial para

formar un gran poro. Un candidato sería el canal iónico dependiente de voltaje (VDAC), ya que varios miembros de la familia de Bcl-2 pueden unirse a él y regular su actividad de canal. Como el tamaño de este canal es muy pequeño para permitir el pasaje de proteínas, este modelo asume que el VDAC sufre cambios conformacionales significativos luego de su unión con los miembros de la familia de Bcl-2.

- 3) Los miembros de la familia de Bcl-2 inducen la ruptura de la membrana externa mitocondrial.

Es posible que los miembros de la familia de Bcl-2 controlen la homeostasis de la mitocondria. En este modelo, las señales apoptóticas alterarían la fisiología de la organela, por ejemplo el intercambio iónico o la fosforilación oxidativa, haciendo que ésta se hinche, que se rompa la membrana mitocondrial externa y que se liberen proteínas del espacio intermembrana hacia el citosol. De esta forma, la necesidad de formar un canal lo suficientemente grande para que pase el citocromo c es obviado, ya que las proteínas pueden difundir libremente a través de los pocillos que se generan en la membrana lipídica (Antonsson y Martinou, 2000).

En el ovario, la presencia y los cambios en la expresión de Bcl-2, Bax y Bcl-x ha sido documentada en varias especies (Rueda y col., 1997; Tilly y col., 1995). En el ovario del roedor, Bax tiene un importante rol en la regulación de la muerte de células de granulosa y en células germinales. Tilly y col. (1995) evaluaron el efecto *in vivo* de gonadotrofinas en la expresión ovárica de Bcl-2, Bax y Bcl-x y encontraron una fuerte correlación positiva entre la expresión de Bax respecto a Bcl-2 y Bcl-x, y la inducción de la apoptosis en cultivos de células de granulosa de folículos atrésicos. Además, estos resultados son avalados por otros análisis realizados en ratones deficientes en Bax (Knudson y col., 1995) donde se observó que folículos provenientes de estas ratas mostraban resistencia a la inducción de la muerte celular durante la atresia. Estos resultados llevaron a proponer un modelo que explica el rol de la proteína Bax en la selección del folículo dominante en presencia de gonadotrofinas (Tilly y col., 1995). De esta manera los niveles de Bax serían variables en los distintos tipos de folículos, pero estos niveles serían bajos en aquellos folículos que han sido seleccionados como dominantes.

4.3.2 Caspasas como ejecutoras de la apoptosis

Las caspasas representan una familia intracelular de proteasas ricas en cisteína que actúan como reguladores de la muerte celular. Su acción se encuentra ligada tanto a los estadios iniciales como los finales de la apoptosis en prácticamente todos los tipos celulares en vertebrados. Estas proteasas son las responsables de la mayoría de los clivajes proteolíticos que ocurren durante la apoptosis. Además comparten una secuencia conservada QACRG que actúa como un dominio que escinde proteínas en residuos aspartato. Las caspasas se dividen en:

- *caspasas iniciadoras* ya que inician la cascada proteolítica como las caspasas 6, 8 y 9
- *caspasas efectoras* como la caspasa 3 y 7, que son activadas por las iniciadoras y tienen como función la de degradar los componentes celulares, desencadenando de esta forma los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis (Kaufmann y Earnshaw, 2000; Thornberry y Lazebnik, 1998).

Las caspasas efectoras clivan y activan proteínas celulares que tienen como función interrumpir procesos críticos de homeostasis y de reparación esenciales para que la célula sobreviva. También desarman componentes estructurales esenciales para la supervivencia de la célula como el citoesqueleto y el DNA nuclear. Algunos de los primeros sustratos en ser clivados son la poli ADP-ribosa polimerasa o PARP, enzima que repara el ADN, las ribonucleoproteínas nucleares y las proteínas estructurales responsables del plegamiento nuclear (Martin y Green, 1995).

Pareciera que las caspasas están presentes en todas las células y se encuentran listas para ser activadas por distintas señales apoptóticas. La interacción entre las caspasas y las moléculas de señalización se da a través de las secuencias reguladoras situadas en el extremo NH₂-terminal, el *dominio efector de muerte (DED)* y el *dominio CARD (dominio de reclutamiento y activación de caspasas)*.

Desde luego cabe mencionar que las caspasas han sido identificadas en el ovario de diferentes especies. Boone y Tsang (1998) encontraron que las células de la granulosa de folículos sanos contenía casi exclusivamente la forma inactiva, sin procesar, de la

caspasa 3, mientras que las células de la granulosa de folículos atrésicos mostraban altas concentraciones de la forma activa. Por otro lado Matikainen y col (2001) utilizando ratones knock out para caspasa 3 determinaron que la progresión de la apoptosis en células de la granulosa de folículos preantrales a preovulatorios es dependiente de la actividad de las caspasas 3 y 7. Asimismo ratones deficientes en caspasa 9 no pueden completar la atresia, aparentemente por una falla en la apoptosis en las células de la granulosa (Maravei . y col., 2001).

4.4 Convergencia de los caminos de señalización extra e intracelular

En los últimos años se ha generado un estallido en las investigaciones concernientes a la regulación de la apoptosis. La gran cantidad de información obtenida llevó a varios autores a visualizar un esquema donde convergen todas las vías apoptóticas (*Figura 12*).

Por tal motivo podemos decir que la apoptosis puede ser disparada por diferentes mecanismo. Por ejemplo, la supresión de los *señales extracelulares de supervivencia* celular tejido-específico puede regular el camino de señalización mitocondrial. Como ya mencionamos anteriormente, los cambios mitocondriales juegan un papel muy importante en el modelo de apoptosis y pueden dividirse en tres etapas:

- a) un paso premitocondrial donde se activan caminos de traducción de señal que regulan las proteínas Bcl-2;
- b) un paso mitocondrial en donde se pierde la homeostásis de la organela, resultando en la liberación de proteínas que activan caspasas, como el citocromo c
- c) y una fase postmitocondrial donde las proteínas liberadas causan la activación del factor Apaf-1 el cual a su vez activa una cascada de caspasas.

Una vez que el citocromo c ha sido liberado al citoplasma se adhiere a la proteína Apaf-1 (Factor activador de proteasas apoptóticas) causando un cambio conformacional y permitiendo que el Apaf-1 interactúe con la procaspasa-9 conformando un *apoptosoma*. La caspasa 9 y el Apaf-1 se unen a través del dominio CARD en presencia del citocromo c y de dATP permitiendo la conversión de la procaspasa 9 a su forma activa. A su vez la caspasa 9 activará a otras caspasas efectoras como la 3 y la 7.

Además de las señales extracelulares de supervivencia celular, en muchas células la apoptosis está también regulada por las *señales extracelular de muerte*. Estas señales actúan sobre diferentes factores como los miembros de la familia de citoquinas del factor de necrosis tumoral TNF. Dentro de esta familia podemos encontrar al ligando de Fas, al TNF α y al TRAIL. Estas proteínas solubles o de membrana inducen la apoptosis en células blanco cuando se unen a la superfamilia de receptores de TNF denominados *receptores de muerte*. La estimulación de los receptores de muerte por sus respectivos ligandos induce la formación de *complejos de señalización inductores de muerte* o DISC. Luego el dominio del receptor de muerte se une a la molécula adaptadora FADD la que a su vez recluta a la inactiva procaspasa 8, esta última se activa autoclitivándose y activa a su vez a otras caspasas.

El antígeno Fas (Fas) pertenece a la familia de glicoproteínas integrales de membrana que incluyen al receptor del factor de crecimiento nervioso y al receptor del factor de necrosis tumoral. Su ligando (FasL) es una proteína integral de membrana de tipo II homóloga al factor de necrosis tumoral cuya función es ser un potente factor de muerte celular (Suda y col., 1993).

Además cabe destacar que la inducción de la apoptosis mediada por receptores de muerte de superficie celular es importante en diferentes eventos tales como la remoción de células no deseadas, de células que han sido infectadas por agentes externos como los virus o de células que ya cuentan con el apoyo de factores de supervivencia. Hasta el momento continúan las investigaciones para develar cual es exactamente el rol que cumplen estos factores en la atresia folicular, sin embargo varios componentes de estos caminos proapoptóticos mediados por receptor, como el ligando de Fas, el antígeno de Fas, el TNF α y su receptor de muerte, entre otros, ya han sido identificados en el ovario.

Otro componente importante en este esquema de caminos apoptoticos es el de las señales intracelulares de muerte. Dentro de estas señales que pueden inducir la muerte celular programada se incluyen la inestabilidad genómica y la acumulación excesiva de radicales de oxígeno. La proteína p53 es un factor transcripcional que se comporta como una proteína bifuncional en cuanto a la regulación de la proliferación y muerte celular (Tilly y Tilly, 1995) y además posee una función clave en la conservación de la

integridad genómica. Por ejemplo cuando se generan altos niveles de esta proteína por un desbalance en el ciclo celular o por un daño al ADN, se induce la síntesis de Bax, llevando a esa célula a la apoptosis (Miyashita y Reed, 1995). En el ovario se ha identificado la presencia nuclear de p53 en células de granulosa de folículos ováricos destinados a la atresia. Estos resultados son consistentes con el rol que se le atribuye al p53 en promover la apoptosis mediante la inducción de la expresión de Bax en este tipo de células (Tilly y Tilly, 1995). Además, Kim y col., (1999) demostraron la participación del sistema Fas/FasL en la apoptosis de células de granulosa mediada por p53 durante el desarrollo y la atresia folicular.

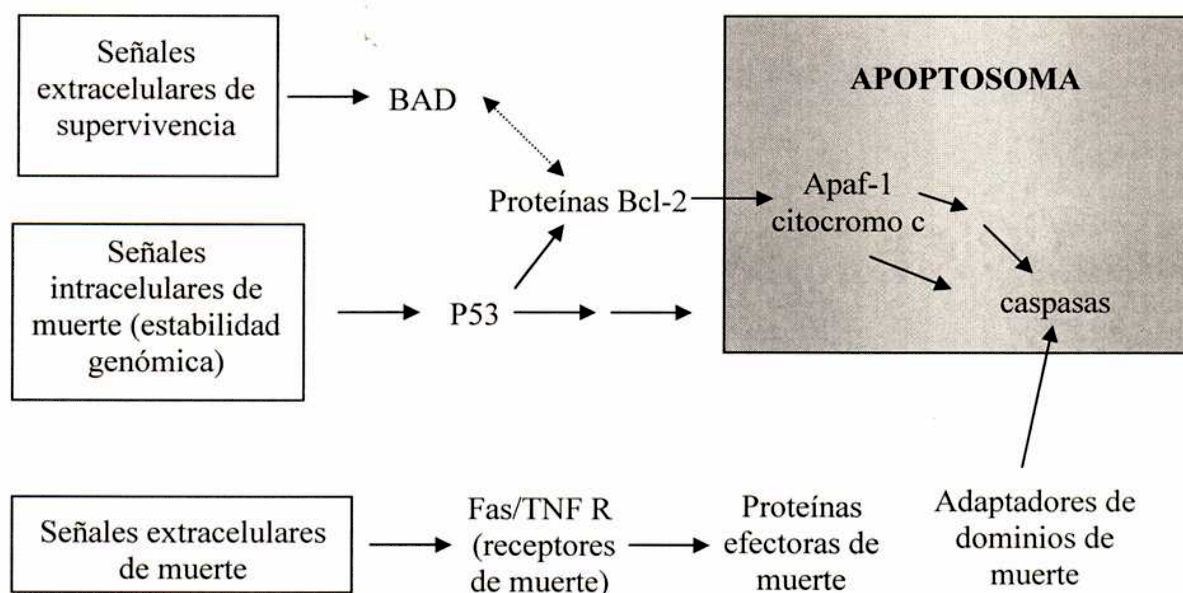


Figura 12. Caminos convergentes de la apoptosis, extraído de Hsu y Hsueh (2000)

5. LA SUPERFAMILIA DE TGF β

La superfamilia del factor de necrosis tumoral (TGF-beta/glicano) comprende un gran número de polipéptidos relacionados estructuralmente. Estos ligandos se sintetizan como grandes precursores que se clivan proteolíticamente para formar la proteína madura. Dentro de los miembros de esta familia se incluyen al TGF β , las activinas, las inhibinas, proteínas morfogenéticas (BMPs), factores de diferenciación de crecimiento

(GDFs) y sustancias inhibidoras Mülerianas (MIS), entre otros. Todos estos factores participan en diferentes eventos celulares tales como proliferación, diferenciación, adhesión, motilidad y apoptosis y están potencialmente involucrados en la foliculogénesis (Chang y col., 2001; Findlay, 1993; Knight y Glister, 2001; McNatty y col., 2002; Nishimori y Matzuk, 1996).

5.1 Inhibinas, activinas y folistatinas

Las inhibinas y las activinas son glicoproteínas diméricas unidas por puentes disulfuro. Las inhibinas son heterodímeros de una única subunidad α unida a una subunidad de betaglicano (β), y dependiendo del tipo de subunidad β que esté involucrada se forma la inhibina A (α - β A) o bien la inhibina B (α - β B). Por otro lado, las activinas son homodímeros y están formados por la unión de dos subunidades β , las cuales dan como resultado tres tipos de activinas, la activina A (β A- β A), la activina B (β B- β B) o la activina AB (β A- β B). Las subunidades α , β A y β B derivan de tres precursores diferentes codificados por genes diferentes (Ying, 1988) y el procesamiento post-traducciona l de estos genes, particularmente de la subunidad α , da como resultado muchas variantes de diferentes tamaños de la inhibina A y B (*Figura 13*).

Por otra parte, la folistatina es una glicoproteína monomérica rica en cisteínas codificada por un solo gen, no se encuentra relacionada estructuralmente a la superfamilia de TGF β , pero sí se encuentra ligada funcionalmente, ya que es una proteína de unión con gran afinidad por las activinas (Knight y Glister, 2001).

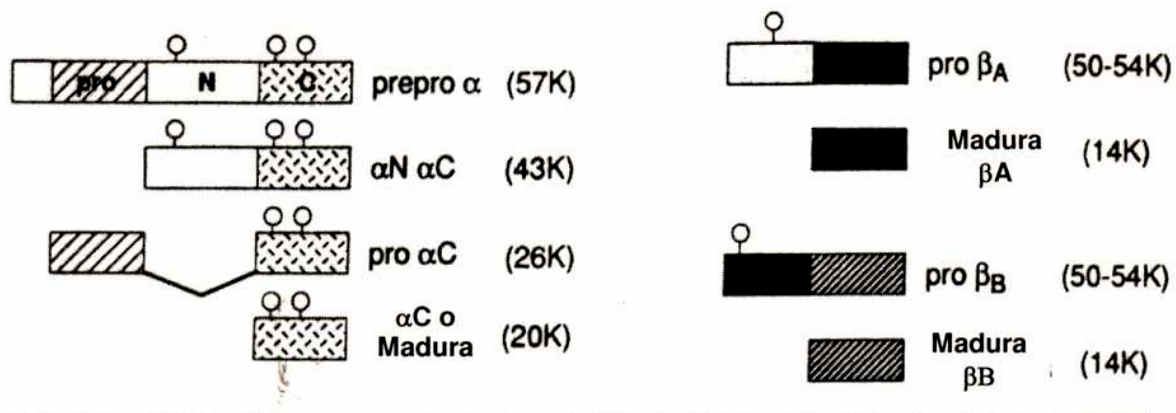
Las inhibinas fueron identificadas por primera vez en 1932 por McCullagh como un factor proteico gonadal que regulaba específicamente la secreción de FSH hipofisaria (McCullagh G., 1932). En 1977, Schwartz y Channing mostraron que el fluido folicular era capaz de suprimir la segunda ola de FSH en ratas. Aunque está bien establecido el sistema de retroalimentación negativa a nivel hipofisario de la inhibina ovárica y aunque en general la inhibina y la activina tienen efectos antagónicos, es poco probable que la activina ovárica tenga un efecto endocrino en la hipófisis. Además parecería que toda la activina presente en la circulación periférica está fuertemente unida a la folistatina, la cual neutraliza su actividad biológica y previene que actúe en tejidos distantes (Woodruff, 2003). No obstante la folistatina también se une a la inhibina, aunque con

mucha menos afinidad, y además esta unión no pareciera neutralizar su bioactividad (Knight y Glister, 2001).

5.2 Distribución de la inhibina en el ovario de la rata

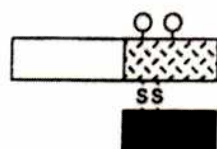
Se han encontrado el ARNm de las subunidades α , βA y βB y sus proteínas en diferentes tejidos, además de las gónadas, como por ejemplo la hipófisis, el cerebro, la médula espinal, la placenta y la adrenal (Biscak y col., 1988; Meunier y col., 1998; Petraglia y col., 1987; Roberts y col., 1989). Particularmente en el ovario de roedores, se expresan las tres subunidades de inhibina, pero la subunidad alfa es la más abundante. Su ARNm se localiza en la células de la granulosa de folículos de todas las clases, en las células de la teca de folículos secundarios, terciarios y preovulatorios, en las células luteales de cuerpos lúteos jóvenes y en las células intersticiales (Mayo, 1994; Meunier y col., 1988). En contraposición a la gran distribución observada para la subunidad alfa, la subunidad beta muestra una distribución más restringida. El ARNm de la subunidad beta A está confinado a las células de la granulosa de folículos secundarios, terciarios y preovulatorios. Mientras que la subunidad beta B está confinada a las células de la granulosa de folículos secundarios y terciarios y tiende a expresarse en folículos pequeños en comparación con la subunidad beta A. Con respecto a la folistatina, su ARNm y su proteína se localizan en células de la granulosa de folículos secundarios, terciarios y preovulatorios y en las células luteales de cuerpos lúteos jóvenes (Nakatani y col., 1991b).

Utilizando ensayos de protección a RNAsas se han hecho recientemente análisis cuantitativos sobre los cambios en la expresión ovárica del ARNm que codifica para las subunidades de inhibina/activina y de folistatina durante el ciclo estral de la rata (Arai y col., 2002). Estos estudios, corroboran y amplían los cambios que han sido observados en la última década (Meunier y col., 1988; Nakatani y col., 1991b; Woodruff y col., 1988). Estos datos son importantes ya que la relación entre las subunidades alfa y beta es la que determina qué forma (inhibina o activina) será secretada.

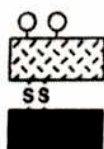


Proteína dimérica madura

Inhibina



Inhibin A
(58K)

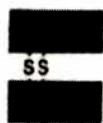


Inhibin A
(32K)



Inhibin B
(32K)

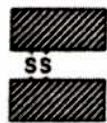
Activina



Activin A
(28K)



Activin AB
(28K)



Activin B
(28K)

Figura 13. Estructura molecular de las diferentes isoformas de inhibina y activina, extraído de Knight y Glistler (2001).

Las investigaciones de Arai K.I. y col (2002) muestran que los niveles del ARNm de la subunidad alfa de la inhibina permanecen bajos durante el estro, metestro y diestro y aumentan abruptamente en la mañana del proestro, para luego bajar rápidamente con el primer pico de FSH. Un patrón similar es observado para el ARNm de la subunidad beta A de la inhibina/activina. Aunque los cambios para estas subunidades son similares, el ARNm de la subunidad alfa es relativamente constante durante el estro, metestro y diestro. Por otro lado, los cambios observados para el ARNm de la subunidad beta B son bastante diferentes. Estos permanecen constantes desde la mañana del estro a la mañana del proestro, bajan rápidamente con el pico de FSH y alcanzan un nadir a las 17 hs del proestro para luego recuperarse rápidamente a las 11 hs del estro (*Figuras 14.1*).

Otros aspectos a considerar son los cambios en las concentraciones plasmáticas de la inhibina A y la B que se observan a lo largo del ciclo (*Figuras 14.2*). Estos cambios son similares a los niveles ováricos del ARNm de las subunidades beta A y beta B, respectivamente, y se manifiestan con varias horas de retraso. Estos resultados sugieren que los niveles del ARNm de la subunidad beta son los que restringen la secreción de las inhibinas diméricas.

Además los niveles del ARNm de la folistatina permanecen bajos de la noche del metaestro a la noche del diestro y luego aumentan hasta la iniciación del primer pico de FSH. Por lo tanto, el ARNm de la folistatina baja, alcanza un nadir a las 2 hs del estro y luego aumenta abruptamente a las 11hs del estro para luego permanecer alto hasta la mañana del metaestro.

En otras palabras los ARNm de las subunidades alfa, beta A y beta B se encuentran en folículos sanos y su abundancia aumenta durante el ciclo estral a medida que el folículo crece y madura, mientras decrece subsecuentemente en folículos preovulatorios, luego del pico de gonadotrofinas que se observa en el proestro (Meunier y col., 1988; Woodruff y col., 1988). Se ha demostrado la presencia del ARNm de esta proteína en folículos ováricos de distintas especies. Por ejemplo, en humanos se vio que folículos en crecimiento expresan el ARNm para inhibina B ($\alpha\beta_B$), mientras que el folículo dominante produce el ARNm para inhibina A ($\alpha\beta_A$) (Roberts y col., 2003). Asimismo, en la vaca, el cerdo y la oveja se han encontrado patrones de distribución similares (Mayo, 1994). Sin embargo en primates, aunque también se ha encontrado

abundante ARNm de las subunidades de la inhibina A en folículos dominantes (Fraser y col., 1993), en contraposición a lo observado en otras especies, las concentraciones plasmáticas de inhibina durante la fase luteal del ciclo menstrual son altas (Fraser y Lunn, 1993).

Hasta la fecha, la relación entre la inhibina, la activina ovárica y la FSH hipofisaria ha sido parcialmente dilucidada en los roedores. El ovario produce bajos niveles de inhibina en la noche del proestro y la mañana del estro, lo que permite a la FSH permanecer elevada a través de este período, el segundo pico de FSH. Es entonces que este segundo pico recluta un nuevo conjunto de folículos a la población folicular y es el responsable de la expresión del ARNm de la inhibina, la cual regula de forma negativa la secreción de FSH hipofisaria. Esto muestra un efecto típicamente endocrinológico de la inhibina. Por otro lado el ARNm de la inhibina llega a su punto máximo en la tarde del proestro en folículos sanos, simultáneamente con el pico de primario de LH y FSH. Esta coincidente elevación del ARNm de la inhibina y FSH sérica sugiere que existe una fase del ciclo estral donde la inhibina actúa independientemente de la regulación de FSH. Además estas observaciones nos sugieren que existiría un rol parácrino de la inhibina durante la transición del metestro al proestro (Woodruff y col., 1990).

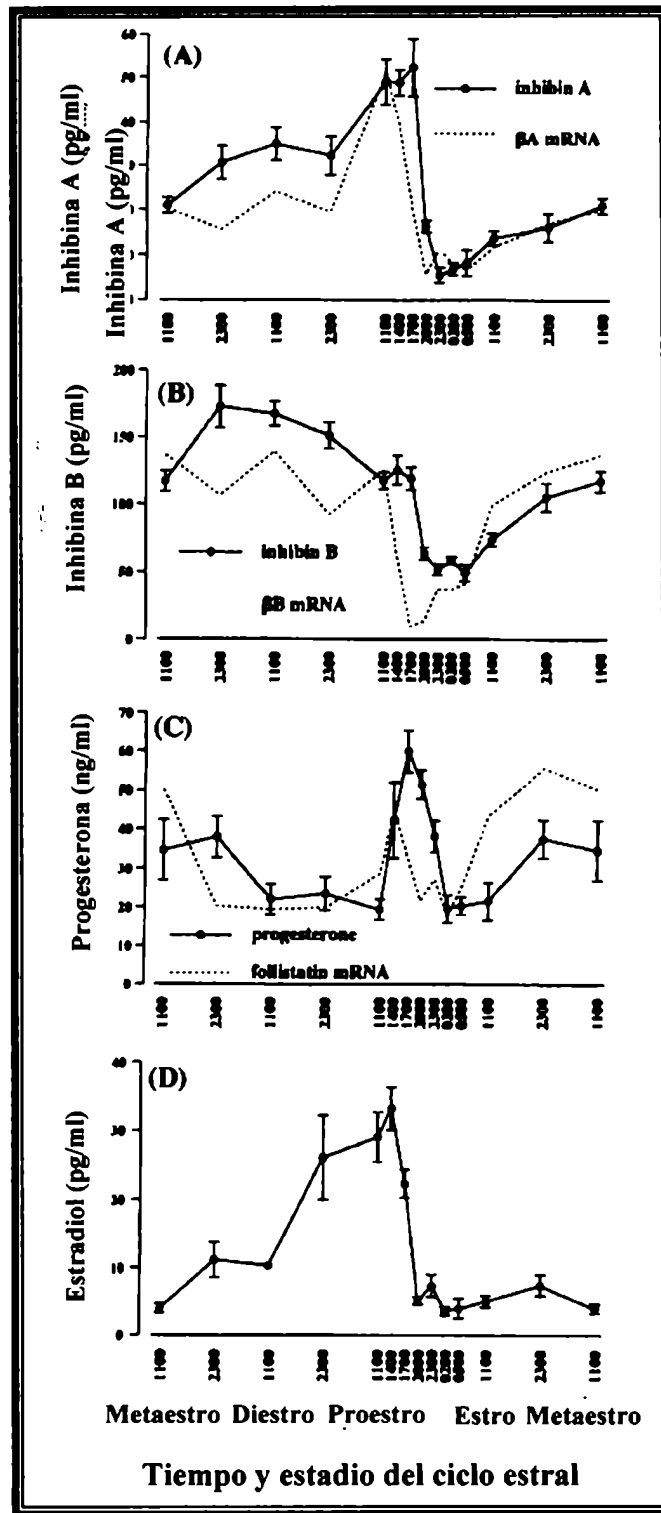


Figura 14.1. Patrones de cambio de las concentraciones plasmáticas durante el ciclo estral de la rata. A. Inhibina A. B. Inhibina B. C. Progesterona. D. Estradiol. Extraído de Arai, 2002.

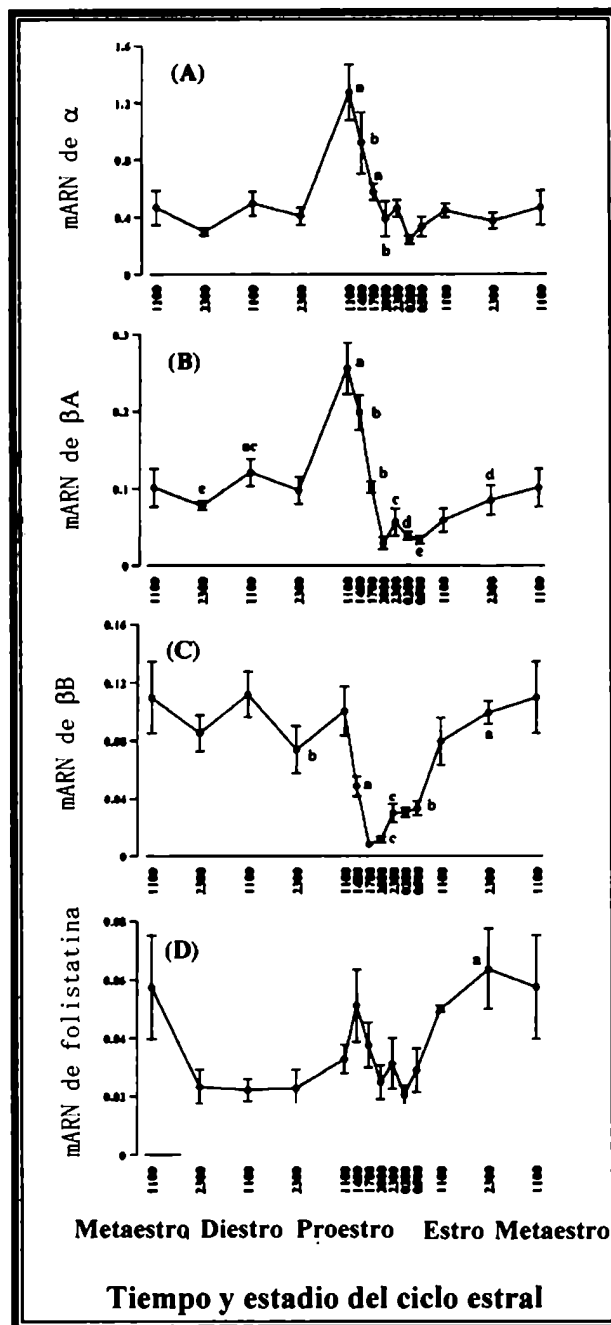


Figura 14.2. Patrones de cambio de los mRNAs de las subunidades de la inhibina durante el ciclo estral de la rata. A. subunidad α . B. Subunidad βA . C. Subunidad βB . D. Follistatina. Extraído de Arai, 2002.

5.3 Las inhibinas y las activinas como factores de regulación intraováricos

Al realizar un compendio de las evidencias encontradas hasta el momento de estudios hechos, principalmente *in vitro*, en folículos aislados, células de la granulosa, células tecales y ovocitos, vemos que éstos apoyan la idea que la folistatina, las activinas y las inhibinas ejercen un efecto local en el ovario. Este efecto autócrino-parácrino influiría sobre la modulación del crecimiento folicular, la respuesta a gonadotrofinas, la esteroidogénesis, la maduración ovocitaria, la ovulación y la función del cuerpo lúteo (Knight y Glister, 2001).

La mayor cantidad de estudios se han realizado con las activinas y la folistatina. En tanto, trabajos *in vitro* avalan un rol intrafolicular de la activina, por ejemplo se ha observado una inducción de la proliferación celular en cultivos de células de granulosa de rata provenientes de folículos pequeños y grandes (Li y col., 1995; Miro y Hillier, 1996) y en cultivos de células de granulosa luteínicas humanas (Rabinovici y col., 1990). Otros estudios señalan que la delección dirigida al gen de la subunidad alfa de la inhibina en ratones, lo que lleva a una superproducción de activina, está asociado con una proliferación descontrolada de células de la granulosa y un desarrollo tumoral ovárico (Matzuk y col., 1992). En contraposición, ratones *knock out* para el gen del receptor de tipo IIB de la activina muestran un arresto en el desarrollo folicular en el estadio antral temprano. Este hecho es consistente con el rol proliferativo de las células de la granulosa que se le atribuye a la activina (Nishimori y Matzuk, 1996).

Además cabe agregar que la activina A promueve la foliculogénesis de los folículos preantrales de ratones inmaduros, y posee una acción sinérgica con la FSH (Yokota y col., 1997). En cultivos de células de la granulosa obtenidos de ratas inmaduras tratadas con estrógenos, la activina A aumenta la actividad de aromatasas inducida por FSH, la producción de progesterona (Hutchinson y col., 1987; Xiao y col., 1990), los sitios de unión a LH (La Polt y col., 1989).

Ahora bien, no ha habido muchos autores que se dedicaran a evaluar el rol autócrino-parácrino de la inhibina durante la foliculogénesis. En el año 1990, el grupo de Woodruff se centró en estudiar el rol de la inhibina en el inicio del desarrollo folicular,

el crecimiento y la atresia. Encontraron en ovarios co-inyectados con 1µg de inhibina A y timidina tritiada un aumento en la proliferación de las células de la granulosa.

Por otro lado, es controversial la evidencia disponible respecto de la existencia de una modulación de la esteroidogénesis en las células de la granulosa. Hay un indicio de que la inhibina puede suprimir la actividad de la P450aromatasa inducida por FSH en cultivos de granulosa de rata (Ying y col., 1986), sin embargo este hecho no pudo ser corroborado en estudios posteriores que se realizaron en ratas (Hutchinson y col., 1987; Sugino y col., 1988) y en humanos (Rabinovici y col., 1994). Sin embargo, (Miro y Hillier, 1992) notaron una pequeña disminución, provocada por la inhibina, en los niveles de la P450aromatasa inducida por FSH en células de la granulosa obtenidas de folículos inmaduros de marmota.

A esto se suma que (Hillier y col., 1991) observó que la inhibina ejercía un potente efecto estimulador en la producción de andrógenos inducido por LH en las células teca humanas y de rata, un efecto que sería atenuado por la activina. De esta forma propuso que los folículos inmaduros, los cuales sintetizan bajos niveles de estrógenos, sintetizan también bajos niveles de andrógenos en las células de la teca, debido al exceso de activina por sobre el de inhibina y folistatina, o sea un “alto tono” de activina y un “bajo tono” de inhibina. Sin embargo, a medida que el folículo dominante se acerca al estadio preovulatorio, se incrementa la expresión de inhibina y folistatina en las células de la granulosa, posiblemente acompañado por un decremento en la expresión de activina, lo cual genera un “bajo tono” de activina y “un alto tono” de inhibina. Esta relación regularía positivamente la secreción de andrógenos en las células de la teca y por lo tanto, aseguraría que las células de la granulosa de este folículo reciban una adecuada demanda del sustrato de la aromatasa P450 necesario para incrementar los niveles de estradiol. Es interesante destacar que si este mismo mecanismo se confirmara *in vivo*, entonces la inhibina incrementaría indirectamente el suministro de estrógenos, lo cual sería particularmente interesante para aquellos folículos estrogénicos, ya que asumirían la dominancia. Como ya mencionamos anteriormente, a medida que el folículo dominante emerge, el incremento en la producción de inhibina y estradiol-17β disminuye la secreción de FSH y de esta forma se restringe el crecimiento de los folículos antrales no dominantes. El folículo dominante podría sobrevivir a este decremento en el suministro de FSH por la acción

local de factores como el IGF-1, EGF y FGF, los cuales sensibilizarían a las células foliculares frente a la estimulación con gonadotrofinas, compensando de esta forma el decremento de FSH. Por otro lado, los folículos no dominantes estarían destinados a la atresia por un mecanismo aun no dilucidado (Findlay, 1993).

Todos estos estudios *in vitro* indicarían que las inhibinas y activinas derivadas de las células de la granulosa tienen acciones paracrinas opuestas en la modulación local de la síntesis de andrógenos. Además el efecto de la activina está sujeto a la regulación por la folistatina producida localmente.

Pero no debemos olvidar que la inhibina es producida por las células de la granulosa del folículo y su producción puede ser regulada a un nivel endocrino por la FSH y la LH; a un nivel paracrino por el factor de crecimiento epidermal (EGF), el TGF- α , el interferón γ y la androstenediona y a un nivel autocrino por el factor de crecimiento insulínico (IGF-1), el TGF β , la activina y la folistatina. De esta manera la FSH y la LH, a bajas dosis, el IGF-1, el TGF β y la activina pueden estimular la producción de inhibina en las células de la granulosa. Mientras que el EGF, el TGF- α , el interferón γ , la folistatina y altas dosis de LH pueden regular negativamente la producción de inhibina en presencia de FSH y otros factores que aumenten los niveles de cAMP (Findlay, 1993). Estudios efectuados en células de granulosa de rata, por Lanuza y col. (1999), evidencian que en condiciones experimentales FSH y estradiol son dos estímulos sumamente potentes para la producción de inhibina A.

5.4 Cambios en los niveles de inhibina durante el ciclo menstrual

La alta homología observada entre los diferentes miembros de la familia de inhibinas constituyó un gran desafío a la hora de crear un ensayo que permitiera determinar los niveles de estas proteínas. Los primeros estudios en fisiología utilizaron la técnica de radio inmuno ensayo (RIA), un ensayo heterólogo con anticuerpos policlonales anti inhibina bovina. Este método presentaba la dificultad de no poder discriminar entre el precursor de la subunidad alfa de la inhibinas diméricas biológicamente activas. Fue así como se desarrolló un nuevo método más sensible, el ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), el cual permitió diferenciar entre inhibina A y B.

El patrón de secreción de inhibina A a lo largo del ciclo menstrual, muestra un aumento en la fase periovulatoria y máximos niveles en la fase luteal. El pico observado en la fase lútea y su posterior disminución con la luteólisis son consistentes con la producción de la subunidad beta A en el cuerpo lúteo de mujeres normales. Por otro lado, la relación inversa entre los niveles séricos de inhibina A y FSH en la fase lútea y a través de la fase folicular temprana y media (*Figura 15*) parecería indicar un rol endocrino de la inhibina A en el control de los niveles de FSH a lo largo del ciclo. Sin embargo, los cambios en los niveles de inhibina A son paralelos a los de estradiol, el cual se sabe que ejerce una regulación negativa en los niveles de FSH. En conclusión los roles endocrinos de inhibina A y estradiol, no pueden ser determinados a partir de estas observaciones.

El patrón de secreción de la inhibina B a lo largo del ciclo menstrual es marcadamente diferente al de la inhibina A (*Figura 15*). Los máximos niveles se encuentran en la fase folicular temprana y media y disminuyen en la fase folicular tardía, luego de un pequeño aumento periovulatorio, para luego llegar a un nadir en la fase lútea. Estos resultados sugieren una secreción por parte de los folículos en desarrollo, y es consistente con la expresión de la subunidad beta B en folículos antrales tempranos, pero no en folículos dominantes o cuerpo lúteo (Hall y Welt, 2000).

Existe amplia evidencia que apoya el hecho de que las gonadotrofinas controlan la secreción de ambas inhibinas y que su secreción depende del estadio en el desarrollo folicular. Si bien existe evidencia que apoya la idea que la inhibina B juega un rol endocrino en la regulación negativa del control de FSH, los estudios que muestran bajos niveles de inhibina A con altos niveles de FSH no son tan robustos como los observados para la inhibina B en humanos.

Los diferentes patrones de secreción de inhibina A y B en suero, a lo largo del ciclo menstrual sugieren que la síntesis de estos dos miembros es dependiente del estadio del desarrollo folicular en que se encuentre. Los estudios hechos por Hallt y col (2000) donde muestran una correlación positiva entre los niveles de inhibina A (pero no los de B) en suero, y el tamaño del folículo dominante, medido por ultrasonido en pacientes normales, proporcionan mayor sustento a esta afirmación. Estas observaciones son apoyadas también por estudios hechos en varias especies, entre ellos la rata, como he mencionado anteriormente.

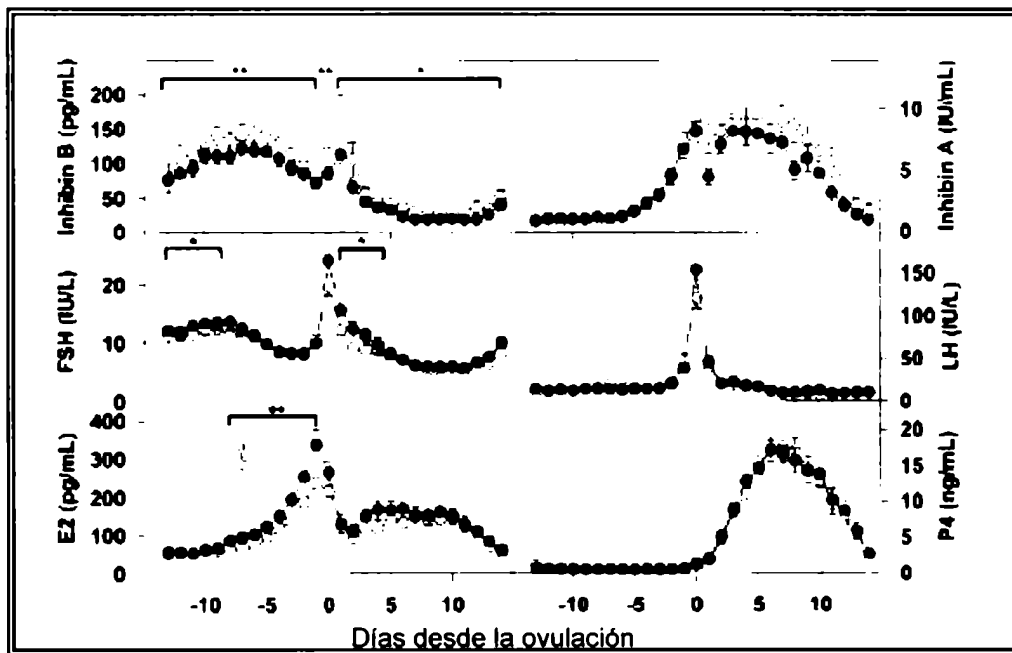


Figura 15. Media de los niveles de inhibina B, inhibina A, FSH, E2, LH y P4 en mujeres jóvenes (círculos blancos; 20–34 años) y mayores (círculos negros; 35–46 años) ciclando, centrado el día de la ovulación. Extraído de Hall y Welt (2000).

5.5 Receptores y transducción de señales

Las investigaciones realizadas en los mecanismos de señalización de muchos de los miembros de la superfamilia de TGF β , muestran un esquema de señalización similar, utilizando receptores relacionados. Entre los receptores transmembrana serina/treonina kinasa de esta familia se encuentran cinco de tipo II y siete de tipo I, también conocidos ALK o activin-like receptor Kinase 1-7.

El modelo actual del efecto biológico de los miembros de esta superfamilia puede ser tipificado por la activina (*Figura 16*). Los receptores para activina fueron clonados y caracterizados a comienzos de los años '90 (Zimmerman y Mathews, 1996) y ambos se expresan en células de la granulosa, células de la teca y en el ovocito. Se ha propuesto que la activina se une al receptor de tipo II, el cual recluta al de tipo I y lo transfosforila. La señal es luego transducida del citoplasma al núcleo a través de una red de proteínas Smad. Según el rol que jueguen en la red, las proteínas Smad pueden subdividirse en tres grupos. Aquellas específicas de receptor (R-Smad), como las Smad 1, 2, 3, 5 y 8, que son blanco directo de la activación del receptor serina/treonina kinasa de tipo I. Las proteínas Smad comunes (Co-Smad), como la Smad 4, que forma un complejo heterodimérico con la R-Smad una vez que estas fueron fosforiladas por el receptor de tipo I. Luego el complejo Co-Smad/R-Smad se transloca al núcleo y se asocia con otros factores de transcripción para regular la expresión de algún gen blanco. Y por último las I-Smad como la 6 y la 7 que son proteínas inhibitorias que funcionan en el citoplasma como reguladores negativos de las señales de transducción intracelular (Chang y col., 2001).

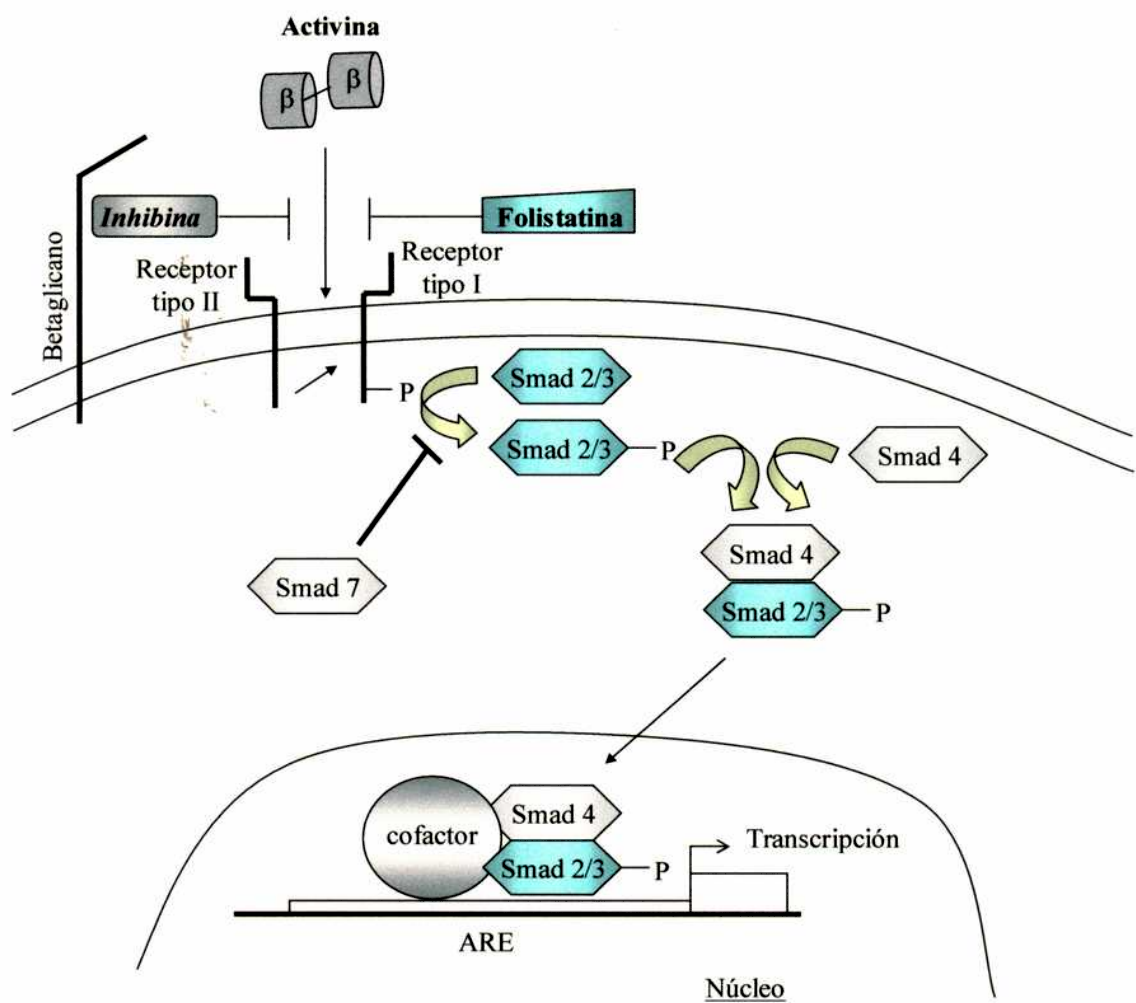


Figura 16. Sistema de transducción de señal de activina, extraído de Findlay, 2002.

Por lo que se conoce hasta el momento no se ha develado completamente el mecanismo de acción de la inhibina, ya que no se ha podido identificar un receptor específico capaz de transmitir la señal. Recientemente se han propuesto dos moléculas como posibles candidatos: InhBP/p120, una glicoproteína de 120 kDa que se expresa en los gonadotropos y en las células de Leydig (Chong, 2000) y un betaglicano-glicano. Esta segunda molécula se trataría de un proteoglicano que se expresa en varios tipos celulares incluyendo las células de la granulosa, la teca y el oocito, y ha sido caracterizado previamente como un receptor $TGF\beta$ que se uniría a la inhibina y mediaría su acción, (Lewis y col., 2000). En este último caso, la inhibina se uniría con alta afinidad, vía la subunidad alfa, a los receptores de tipo III de $TGF\beta$, a betaglicanos y esta unión aumentaría marcadamente la unión de la inhibina, vía la subunidad beta, al receptor de tipo II de la activina. De esta manera al menos algunas de las acciones antagonistas de la inhibina se deban probablemente a la interferencia de la unión de la activina con su receptor de tipo II, lo cual previene la heterodimerización con el receptor de tipo I y la consecuente cascada de señalización intracelular. Otra posibilidad es que la subunidad alfa libre pueda facilitar la acción de la activina por competencia con la inhibina por la unión a betaglicanos, esto reduciría la interacción de la inhibina con el receptor de tipo II. En otras palabras, la subunidad libre de la inhibina podría funcionar como un antagonista y un agonista fisiológico de la activina, aunque esta hipótesis debe ser evaluada (Bernard y col., 2002; Knight y Glister, 2001).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

El problema del que se partió en la presente investigación es:

¿Cuál es el papel de la inhibina durante el proceso de foliculogénesis?

Para dar respuesta a este interrogante y sobre la base de las observaciones realizadas, postulamos como *hipótesis general* de la investigación que:

La inhibina actúa como un factor autocrino y/o paracrino regulando el proceso de foliculogénesis.

Para su comprobación planteamos las siguientes *hipótesis derivadas*:

- 1) *Las células de la granulosa-luteínicas humanas en cultivo producen inhibina y se considera a este factor como el responsable de la inhibición del crecimiento folicular.*
- 2) *La inhibina, producida por las células de la granulosa del folículo dominante, actúa como un factor paracrino impidiendo el crecimiento de folículos subordinados de la cohorte en progresión.*
- 3) *La inhibina A producida por el folículo dominante no tiene efecto sobre la proliferación de las células del mismo folículo.*
- 4) *La inhibición del crecimiento de los folículos subordinados, producida por la inhibina se debe a la activación de mecanismos apoptóticos.*
- 5) *La inhibina A producida por el folículo dominante no tiene efecto sobre la apoptosis de las células del mismo folículo.*

OBJETIVOS

El *objetivo general* del plan de investigación propuesto es:

- Estudiar la acción de la inhibina como factor involucrado en el proceso de maduración folicular.

Objetivos particulares:

1. Determinar los niveles de inhibina A y B producidos por células de la granulosa humanas en cultivo y en el fluido folicular obtenidos bajo consentimiento de pacientes sometidas a técnicas de fertilización *in vitro*.
2. Correlacionar los niveles de inhibina A y B con los de FSH, hCG, progesterona y estradiol medidos en el fluido folicular de pacientes sometidas a técnicas de fertilización *in vitro*, obtenidos el día de la aspiración folicular.

3. Evaluar la presencia de inhibinas en el medio condicionado proveniente de células de la granulosa-luteínicas humanas utilizando anticuerpos anti las subunidades α , β_A y β_B y ensayar su efecto sobre el crecimiento de células de la granulosa en cultivo.
4. Estudiar el efecto *in vitro* de la inhibina A sobre el crecimiento de células de granulosa en cultivo.
5. Estudiar el efecto *in vitro* de la activina A sobre el crecimiento de células de granulosa inmaduras y maduras en cultivo.
6. Determinar los niveles de inhibina A producidos por células de la granulosa inmaduras de rata en cultivo.
7. Estudiar el efecto *in vivo* de la inhibina A sobre el desarrollo folicular y la apoptosis y la expresión de miembros de la familia del gen bcl-2 en ovarios de ratas tratadas con DES.
8. Estudiar el efecto *in vivo* de la inhibina A sobre el desarrollo folicular y la apoptosis en ovarios de ratas tratadas con PMSG.
9. Estudiar el efecto *in vitro* de la inhibina A sobre la apoptosis, la expresión de miembros de la familia del gen de bcl-2 y la esteroidogénesis en ovarios de ratas tratadas con DES.
10. Estudiar el efecto *in vitro* de la inhibina A sobre la apoptosis, la expresión de miembros de la familia del gen de bcl-2 en ratas tratadas con PMSG.

MATERIALES Y METODOS

1. REACTIVOS

La inhibina A recombinante humana y la activina A recombinante humana (Rose y Gaines Das, 1996) fue obtenida de NIBSC (National Institute for Biological Standards and Controls, Hertfordshire, UK). La eCG, gonadotrofina coriónica equina (Norvomon) fue obtenida de Syntex S.A (Buenos Aires, Argentina). La FSH bovina (FSH S17) fue donada gentilmente por The National Hormone y Pituitary Agency, NIADKK-NIH (Bethesda, MD, USA). El estradiol, la androstenediona, el dietilestilbestro (DES), las hormonas esteroideas: [1,2-3H (N)]-progesterona (40 Ci/mmol), [2,4,6,7- 3H (N)]-estradiol (74 Ci/mmol), el HEPES, el carbón activado, la acrilamida y bis-acrilamida, el dodecil sulfato sódico (SDS), la peroxidasa conjugada a extravidina, el anticuerpo IgG anti conejo conjugado a biotina, la diaminobenzidina (DAB), el Tris, la glicina, el persulfato de amonio, el N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED), los inhibidores de proteasas: PMSF (fenilmetilsulfonil fluoruro), TPCK (N-tosil-L-fenilalanina-clorometil cetona), ZPCK (N-CBZ-L-fenilalanina clorometil cetona), TLCK (1-cloro-3-tosilamido-7-amino-L-2-heptanona) fueron obtenidos en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A). También fueron adquiridos en esta compañía, los esteroides no tritiados correspondientes. El kit de quimioluminiscencia (ECL) fue obtenido de Amersham (Buckinghamshire, UK).

Los factores de crecimiento IGF-1 y TGF β al igual que el Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM, 4.5-g glucose/l), Ham F-12 nutrient mixture (F12), la fungizona (250 μ g/ml), y la gentamicina (10 mg/ml) fueron adquiridas en Gibco Laboratories (Grand Island, NY, USA). La acetona fue adquirida en Merck y el etanol absoluto y el éter dietílico en Anedra (Buenos Aires, Argentina). La solución centellante OptiPhase 'HiSfe'3 fue obtenida de Perkin ElmerTM en ETC Internacional S.A. (Buenos Aires, Argentina). Los anticuerpos utilizados en los radioinmunoensayos, anti-estradiol y anti.progesterona fueron adquiridos en el laboratorio del Dr. D. G. Niswender (Colorado State University, U.S.A). El marcador de peso molecular preteñido fue adquirido en Amersham Life Science. El anticuerpo policlonal hecho en conejo anti-Bax (N-20) y los anticuerpos policlonales hecho en cabra anti-Bcl-2 (N-19), anti-inhibin α (C16), anti-inhibin β_A (C18) y el anti-inhibin β_B (C18) fueron adquiridos en Santa Cruz Biotechnology.

2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA-LUTEÍNICAS HUMANAS.

PROTOCOLO DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA:

Las células de granulosa se obtuvieron de pacientes sometidas a técnicas de fertilización asistida. El material fue provisto por el Centro de Investigaciones en Medicina Reproductiva (Directora: Dra. Estela Lancuba) y por Fertilab (Director: Dr. Blaquier). Luego de la aspiración folicular, se separan los ovocitos para su fertilización y las células de la granulosa con el fluido folicular fueron derivadas al laboratorio. Se centrifugó el fluido folicular y el pellet conteniendo las células de granulosa se procesó para cultivarlas. En cada paciente se determinó el número de ovocitos obtenidos, madurez ovocitaria, porcentaje de fertilización y desarrollo o no de embarazo.

3. AISLAMIENTO CELULAR Y CULTIVO DE CÉLULAS GRANULOSA- LUTEÍNICAS HUMANAS:

Luego de 15 min. de centrifugación a 600 g se resuspende el pellet de las células de la granulosa-luteínicas en 1 o 2 ml de medio de cultivo DMEM, 4,5 g glucosa/l- Ham F:12 (1:1), con Hepes 10 mM. Luego la suspensión celular se siembra en un colchón de Percoll al 70% para separar los glóbulos rojos y se centrifuga a 800 g. durante 20 min. Después se separa la interfase conteniendo las células de la granulosa-luteínicas, se lava y resuspende en DMEM:F12 (1:1) con NaHCO_3 2,2 g/l y 10% suero fetal bovino (SFB). Finalmente se cuenta el número de células vivas con azul de tripan y se siembran 100 μl de una suspensión de $1 \cdot 10^6$ células / ml en placas de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Denmark). Transcurrido ese tiempo se incuban durante otras 48 hs en medio libre de suero y se recolecta el sobrenadante (MC).

4. ANIMALES

Se utilizaron ratas vírgenes prepúberes de la cepa Sprague Dawley (23-25 días) proveídas por el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental. Los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura (22°C) en un foto período de 12 hs (periodo de luz de 7.00 AM a 19.00 PM), recibiendo alimento balanceado y agua ad libitum.

5. TRATAMIENTOS

5.1 Ratas tratadas con DES

Los animales fueron tratados con DES, un análogo de estradiol, utilizando una concentración de 1 mg/rata disuelto en aceite en forma diaria durante tres días consecutivos para estimular el desarrollo de folículos antrales tempranos. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical 24hs luego de la última inyección y los ovarios fueron extraídos para su posterior análisis.

5.2 Ratas tratadas con PMSG

Los animales fueron superovulados con PMSG (posee actividad de FSH) con una única inyección de 25 UI/rata, para estimular el desarrollo de folículos preovulatorios. Los animales fueron sacrificados luego de 48 hs por dislocación cervical y los ovarios fueron extraídos para su posterior análisis.

6. AISLAMIENTO DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA

Luego de la extracción de los ovarios los mismos fueron desgrasados y punzados con una aguja de 30-gauge. Luego fueron incubados durante 15 minutos a 37°C en medio de cultivo DMEM:F12 (1:1)- HEPES y EGTA (6mM) y 5 minutos mas a 37°C en medio de cultivo con sacarosa (0,5M). Luego de la incubación el medio se diluyó con 2 volúmenes de DMEM:F12 (1:1)- HEPES y se dejó que los ovarios sedimentaran. Las células de granulosa se obtuvieron presionando en forma leve los ovarios contra una malla de nylon (Woodruff y Mayo, 1990) y recogiendo el filtrado celular con medio de cultivo. La suspensión celular fue centrifugada a 1000 r.p.m. durante 10 min., el precipitado celular resuspendido en 1 ml de medio de cultivo y sembrado en un gradiente de Percoll 40%. Luego de centrifugar a 1500 r.p.m. por 20 min. se separó la interfase celular y se procedió al conteo de la viabilidad celular por exclusión con Azul de Tripán. El número de células por ovario osciló entre 0,5 y 1×10^6 células por ovario y la viabilidad resultó entre el 35 y el 55 %. Luego se diluyeron las células en DMEM:F12 (1:1)- bicarbonato hasta obtener 1.10^6 células vivas/ml.

7. MEDICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE INHIBINA EN EL MC DE CÉLULAS DE GRANULOSA-LUTEÍNICAS HUMANAS Y EN EL MEDIO CONDICIONADO DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA DE RATA

Se utilizaron enzimoimmunoensayos de alta sensibilidad (ELISA) desarrollados recientemente que permiten medir específicamente la inhibina A y B bioactivas (Groome y col., 1995). Se utilizaron anticuerpos monoclonales dirigidos contra las formas maduras de las subunidades β_A , β_B y α . El fluido folicular se diluyó en suero fetal bovino de acuerdo a la cantidad de inhibina presente en el medio. Antes del ensayo se agregaron 0,5 volúmenes de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 5% a cada muestra y a los estándares y se precalentaron 3 min. a 100 °C. Las muestras fueron tratadas con 1% de peróxido de hidrógeno durante 30 min. a temperatura ambiente. Para amplificar la actividad de la fosfatasa alcalina se utilizó un kit específico (sensitive enzyme-amplified assay de Ampak, DAKO Corp, UK). Se utilizaron como estándares a la inhibina A y B recombinante humana. Por otro lado la activina A, la activina B y la follistatina mostraron menos del 0.1% de reacción cruzada para ambos ensayos. La reacción cruzada de la inhibina A en el ensayo de la inhibina B fue <0.5% y de <0.1% para la inhibina B en el ensayo de la inhibina A (Groome y O'Brien, 1993). La sensibilidad del ensayo fue de 7 pg/ml para la inhibina A, de 15 pg/ml para la inhibina B y de 2 pg/ml para la Pro- α C. Por último los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de <10% para los tres ensayos.

8. CULTIVOS DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA

Para evaluar la proliferación celular se sembraron en placas de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Denmark) cubiertas previamente con colágeno 100 μ l de la suspensión celular por pocillo. Luego de 3 hs de cultivo a 37°C en estufa gaseada, se removió el medio y se agregó medio de cultivo fresco más los estímulos correspondientes, según el experimento. En todos los experimentos de proliferación se utilizó FSH (20 ng/ml), TGF β (5 ng/ml) y estradiol (500 ng/ml) para estimular la proliferación de células de la granulosa inmaduras, provenientes de ratas tratadas con DES y EGF para estimular a las células de la granulosa maduras, provenientes de ratas tratadas con PMSG.

9. PROLIFERACIÓN CELULAR

9.1 Efecto del MC proveniente de células de la granulosa-luteínicas humanas sobre la proliferación de células de granulosa inmaduras de rata

Para evaluar el efecto del MC sobre la proliferación celular se cultivaron células de la granulosa inmaduras de rata con el 10%v/v del MC.

9.2 Presencia de inhibinas en el MC

Para evaluar la presencia de inhibinas en el MC proveniente de células de la granulosa-luteínicas humanas y su efecto sobre la proliferación en células de la granulosa inmaduras de rata, se utilizaron anticuerpos anti las subunidades β_A , β_B y α (1:500).

9.3 Efecto de la inhibina A y de la activina A recombinante humana sobre la proliferación de células de granulosa de rata:

Se utilizaron distintas concentraciones de inhibina A (0,4; 4 y 40 ng/ml) y de activina A (0,4; 4; 40 y 100 ng/ml) para evaluar la proliferación celular.

En todos los casos los estímulos fueron agregados 3 hs después de que se sembraron las células. La proliferación celular se midió por incorporación de timidina radioactiva (0,5 mCi/pocillo) a las 24 hs luego del agregado de los estímulos. Luego de 24 hs más de cultivo se cosechó la placa (Nunc Cell Harvester 8, Intermed).

9.4 Método MTS

La actividad de las enzimas deshidrogenasas en células metabólicamente activas se midió utilizando un ensayo de proliferación celular no radioactivo: CellTiter 96®AQueous (Promega, Buenos Aires, Argentina). Para ello se adicionan 20 μ l por pocillo del reactivo MTS en la placa de cultivo, 72 hs después de la incorporación de los estímulos. Luego de 2 hs el reactivo se reduce a un compuesto soluble en el medio de cultivo y se mide a 490 nm en un lector de ELISA.

10. CULTIVO DE CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS

Se extraen las pituitarias de los animales seleccionados y se las coloca en medio Krebs-Ringer-Bicarbonato, sin calcio ni magnesio. Las hipófisis cortadas en pequeños

fragmentos se incuban en 0.2% de tripsina durante 30 minutos. Luego de la adición de DNA-asa y del inhibidor de tripsina (LBI), los fragmentos se disgregan haciéndolos pasar de 50 a 100 veces por una pipeta Pasteur siliconizada. Las células se filtran a través de una malla fina de nylon (Nytex 160M), se centrifuga 10 min. a 1000 r.p.m y se resuspenden en medio Dulbecco's modified Eagle, suplementado con 10% de suero de caballo, 2.5 % de suero fetal de ternero, 1% MEM aminoácidos no esenciales, antibiótico y antimicótico. Se siembran las células en cámaras de cultivo estériles (Corning, Cluster 96) 50.000 células por pocillo. Luego de 4 días de incubación, las células son lavadas con medio DMEM-F12 libre de suero, conteniendo 0.1% de seroalbúmina bovina (BSA). El día del experimento las células se incuban durante 1 hora con distintas concentraciones de inhibina (0,4; 4; 40 ng/ml). La proliferación celular se midió por incorporación de timidina radioactiva (0,5 mCi/pocillo) a las 24 hs luego del agregado de los estímulos. Luego de 24 hs más de cultivo se cosechó la placa.

11. MEDICIÓN DE ESTEROIDES EN CULTIVOS DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA INMADURAS DE RATA

Para evaluar la producción de esteroides se sembraron en placas de 24 pocillos (Nunc, Roskilde, Denmark) cubiertas previamente con colágeno, 350 µl por pocillo de una suspensión celular de 1.10^6 células/ml. Luego de 3 hs de cultivo a 37°C en estufa gaseada, se removió el medio y se agregó medio de cultivo fresco con y o sin la adición de estímulos. Luego de 24 hs de cultivo se agrega androstenediona (25 µM) para la medición de estradiol. Luego de 24 hs más se guardó el medio de dichos cultivos para la medición de esteroides.

11.1 Medición de esteroides

Se midieron los niveles de progesterona y estradiol por radioinmunoensayo (RIA). Los antisueros se usaron en una dilución apropiada para ligar el 40% del ^3H -esteroide utilizado como trazador (25 pg, aproximadamente 10.000 cpm). Luego de la incubación de 16 hs a 4°C, se separó la hormona libre de la unida al anticuerpo por medio del agregado de 0,2 ml de una suspensión de carbón 0,5% y dextrano 0,05% en el buffer de ensayo: Na_2HPO_4 40mM, NaH_2PO_4 39,5 mM, NaCl 155 mM, azida sódica 0,1% y gelatina 1% pH 7,0 (buffer RIA) y posterior centrifugación. Los sobrenadantes completos fueron transferidos a viales de conteo, a los que se les agregó 2,75 ml de

solución centellante. La radiactividad se determinó en un contador beta de centelleo líquido Beckman LS 1801, con una eficiencia del 62%.

11.2 Determinación de progesterona

El rango de utilidad de ensayo fue de 12,5 a 800 pg de progesterona en un volumen final de 0,5 ml. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron 8,0 y 14,2%, respectivamente.

11.3 Determinación de estradiol

El rango de utilidad de ensayo fue de 1,562 a 800 pg de estradiol en un volumen final de 0,5 ml. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron 7,2 y 12,5%, respectivamente.

12. ENSAYOS IN VIVO

12.1 Ratas tratadas con DES

En forma intrabursa, en uno de los ovarios, se inyectaron 0,5 µg de inhibina A al tercer día del tratamiento con DES, mientras que en el contralateral, usado como control, se inyectó solución fisiológica. Un día más tarde se sacrificaron las ratas y se extrajeron los ovarios para su posterior análisis.

12.2 Ratas tratadas con PMSG

En forma intrabursa, en uno de los ovario, se inyectaron 0,5 µg de inhibina A el segundo día luego de la inyección con PMSG, mientras que en el contralateral, usado como control, se inyectó solución fisiológica. Un día más tarde se sacrificaron las ratas y se extrajeron los ovarios para su posterior análisis.

12.3 Morfología ovárica

Los ovarios de animales superovulados con DES o con PMSG fueron extraídos e inmediatamente fijados en formol 10% durante 12 hs. El fijador fue removido mediante numerosos lavados con poco volumen de etanol 70%, seguido por una deshidratación en alcoholes de gradación creciente hasta etanol 100%, y aclarado con xilol. Los ovarios fijados fueron incluidos en Histowax Reichert-Jung (mezcla de parafina y polímeros con mejor capacidad de penetración; punto de fusión 67°C). El paso siguiente fue el

montado sobre tacos de madera; se tallaron los tacos y se procedió a cortarlos con un micrótopo rotativo Reichert-Jung (espesor de 3 μm), adhiriéndoselos a portaobjetos sin recubrir si los cortes fueron preparados para tinción con hematoxilina-eosina, o cubiertos con polisina, si los cortes se utilizaban para inmunocitoquímica. Los cortes se realizaron con un espesor de 3 μm a intervalos de 50 μm para evitar contar el mismo folículo mas de una vez (Woodruff y col., 1990).

12.4 Coloración con hematoxilina-eosina

Los cortes fueron desparafinados e hidratados, y se procedió a sumergirlos en un coplin con hematoxilina de Mayer (laboratorios Biopur) durante 10 minutos. Se efectuó el viraje en agua común de 2 a 5 minutos, hasta que se observó color violeta. Se colocó el corte en un coplin con eosina alcohólica durante 2 minutos.

12.5 Clasificación y recuento de folículos ováricos

En las secciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina se contaron el número de folículos por ovario. Los folículos se clasificaron en preantrales o antrales según la presencia o ausencia de una cavidad astral y en preovulatorios. La atresia se definió como la presencia de más de 10 células picnóticas, un ovocito degenerado y el adelgazamiento de la capa de células de la granulosa. El número de folículos se determinó en secciones obtenidas de ovarios (n=8) controles (inyectados con solución salina) u ovarios inyectados con inhibina. Para estudiar la morfología ovárica, se analizaron campos seleccionados al azar de cada sección ovárica (6 secciones/ovario, 6-8 ovarios).

12.6 Cuantificación inmunocitoquímica de la apoptosis

Distintas secciones de ovario se procesaron, utilizando un kit de detección de apoptosis Apoptag® (Oncor, Gaithersburg, MD), para localizar los núcleos que exhiben fragmentación del ADN. Este kit utiliza la técnica de TUNEL por la cual se marca el extremo terminal con dUTP-digoxigenina mediante la enzima deoxinucleotidil transferasa (TdT)) (Herde K y col., 1994). Las secciones de ovario de 3 μm de espesor se desparafinaron y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente con proteinasa K (GIBCO, Grand Island, NY) (20 $\mu\text{g/ml}$). La peroxidasa endógena se inactivó con peróxido de hidrógeno 2% en PBS. Luego los preparados se incubaron con

la enzima TdT por 1 hora a 37°C y la reacción de marcación se llevó a cabo incubándolos en un buffer que contenía digoxigenina-dUTP durante 30 minutos. Los tejidos se incubaron con el anticuerpo monoclonal antidigoxigenina conjugado a peroxidasa durante 30 minutos y se visualizaron las células apoptóticas positivas luego de la incubación con el sustrato diaminobencidina. Los controles negativos no incluyeron la enzima TdT. Las secciones fueron contrastadas con hematoxilina. Para determinar el número de células apoptóticas se contaron las células marcadas en los distintos tipos foliculares en campos seleccionados al azar con un aumento de 400x. El índice apoptótico se calculó como el porcentaje de células apoptóticas respecto al número total de células.

13. ENSAYOS IN VITRO

13.1 Aislamiento y cultivo de folículos ováricos de rata

13.1.1 Folículos antrales tempranos

Luego de la extracción de los ovarios de 8 a 12 ratas tratadas con DES se procedió a desgrasarlos y a aislar bajo la lupa los folículos antrales tempranos (~350 µm de diámetro). El cultivo se inició a la hora de haber comenzado el aislamiento. La incubación se realizó en placas de 24 pocillos (20 folículos por pocillos) en medio libre de suero a 37°C en 350 µl DMEM:F12 (1:1 vol/vol)-bicarbonato, suplementado con fungizona (0,5 µg/ml) y gentamicina (50 µg/ml) en presencia o ausencia de distintas concentraciones de inhibina A (0,4; 4; 40; 100 ng/ml). El cultivo se realizó en estufa gaseada 95%O₂-5% CO₂ durante 24 hs. Los folículos se guardaron a -70°C hasta la extracción de ADN o de proteínas.

13.1.2 Folículos preovulatorios

Luego de la extracción de los ovarios de 6 a 10 ratas tratadas con PMSG se procedió a desgrasarlos y a aislar bajo la lupa los folículos preovulatorios (>400 µm de diámetro). El cultivo se realizó con las mismas condiciones que el anterior pero incubando 10 folículos por pocillo. Los folículos se guardaron a -70°C hasta la extracción de ADN o de proteínas.

13.2 Determinación de apoptosis en folículos ováricos

13.2.1 Aislamiento de folículos y extracción del ADN

Luego de la incubación durante 24 hs de los folículos saludables en medio DMEM:F12 con bicarbonato, se los traspasa a un tubo de 1,5 ml, se agrega 200 µl de buffer de digestión (NaCl 100 mM, Tris -HCl 50 mM, EDTA 4 mM, SDS 0,5%, pH 8) junto con proteinasa K (100 µg/ml) por tubo y se los incuba a 55°C durante 4 -5 hs, para facilitar la ruptura de la membrana plasmática y la solubilización de las proteínas. Luego se precipitan las proteínas con acetato de potasio 1 M y 50 % de cloroformo y se centrifuga a 9.000 x g durante 8 minutos a 4°C. La fase acuosa se precipita con 2,5 vol de etanol absoluto durante 30 minutos a -70°C y se centrifuga a 5.000 x g durante 20 minutos a 4°C. Luego se lava con etanol 70%, se resuspenden en 50 µl de agua estéril y se mide la absorbancia a 260nm. Finalmente, las muestras se incuban con RNAasa (10µg/ml) a 37°C durante 1 hs.

13.2.2 Electroforesis en geles de agarosa y cuantificación de la fragmentación de ADN

Las muestras de ADN (4 µg) se separan electroforéticamente en geles de agarosa en una concentración de 1,7% conteniendo bromuro de etidio (0,4 µg/ml) en buffer TBE. La fragmentación del ADN se visualiza en un transiluminador de UV a 302 nm (UVP GDS-8000; Ultraviolet Products Ltd., Cambridge, U.K). El análisis densitométrico del ADN de bajo peso molecular (<15kb) se realiza con un programa de software de cuantificación de imágenes (Scion Image, Scion Corporation). Los resultados obtenidos representan el promedio ± ES de 4 corridas de geles independientes.

13.3 Medición de los niveles de miembros de la familia de bcl-2 por western blot

Se obtienen 250 folículos antrales tempranos por microdissección de ovarios de ratas tratadas con DES y se incuban 24 hs con distintas concentraciones de inhibina A (0,4; 4; 40 y 100 ng/ml). Luego, se homogenizan en buffer de lisis (NP-40 1%, Tris 20 mM pH 8, NaCl 137 mM y glicerol 10%) suplementado con inhibidores de proteasas (PMSF 0,5mM; ZPCK 0,025 mM; TLCK 0,025 mM; TPCK 0,025mM). El lisado se

centrifuga a 4°C a 10.000 x g durante 10 minutos. La medición de proteínas en el sobrenadante se realiza por el método de Bradford (Bio-Rad). Luego de hervir 5 minutos las muestras se siembran en igual cantidad (50 µg de proteína) en cada calle en un gel de poliacrilamida 15% con SDS (SDS-PAGE). Las proteínas separadas por electroforesis fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa en buffer Tris-base 0,025 M (Findlay y col., 2000; Pangas y Woodruff, 2000), glicina 0,192 M, metanol 20%, a 35 V (200 mA) durante 2 hs a 4°C. Los sitios de unión remanentes sobre las membranas se bloquean en TBS con 20 mg/ml de leche en polvo descremada, Tween 20 (0,2 %) durante 1h a temperatura ambiente. Luego se incuban con el anticuerpo policlonal de conejo correspondiente (Bcl-2, Bax, y Bcl-x, 1:200) en buffer de bloqueo durante toda la noche. Luego de lavar con el mismo buffer, se incuba con el 2^{do} anticuerpo: anti-IgG de conejo acoplado a biotina diluido 1:500 en TBS con Tween 20 (0,01%) por 1h a temperatura ambiente. Se lava con TBS con Tween 20 (0,1%) y se realiza una tercera incubación con extravidina unida a peroxidasa en TBS con BSA 1mg/ml durante 1h. Se revela con 3,3'-diaminobencidina 0,4 mg/ml y H₂O₂ 0,01% en buffer de revelado. El control negativo se realiza en ausencia del primer anticuerpo. El contenido de las proteínas en las distintas calles se cuantifica luego por densitometría. Los datos de densidad óptica se expresan como unidades arbitrarias ± ES (n=3). Las cantidades iguales de proteína sembrada se evalúan por tinción de la membrana con rojo Ponceau.

14. EXTRACCIÓN DE ESTEROIDES DE FOLÍCULOS

Se obtienen 100 folículos antrales tempranos por microdissección de ovarios de ratas tratadas con DES y se incuban durante 24 hs con 40 ng/ml inhibina A o con 40 ng/ml de activina. Luego, los grupos de folículos se homogeneizan en acetona (1:10, peso/vol) y se centrifugan a 1600 xg durante 10 min., los sobrenadantes se trasvasan a tubos cónicos y se evapora a sequedad. El remanente se resuspende en 1 ml de agua destilada y luego se incuban en agitación a 50 °C durante 10 min. Al final de la incubación se realizan dos extracciones con éter dietílico (1:2,5 vol/vol) para lo cual se homogeneizan durante 2 min. Las fracciones etéreas se separan por congelación durante 20 min. a -70°C. Luego la fase líquida se evapora y remanente resuspende en 1,4 ml de metanol más 0,6 ml de agua destilada. Luego se agrega n- hexano, se homogeneiza durante 2 min. y se descarta la fase superior. Finalmente se agrega a la fase restante, 2

ml de diclorometano y luego de su homogeneización se descarta la fase superior acuosa y se deja evaporar la fase inferior. Los residuos se resuspenden en buffer RIA y se conservan a -20°C hasta realizarse las correspondientes mediciones.

15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Todos los resultados que se presentan en esta investigación están expresados como el promedio $\pm$ ES. Los geles de agarosa y las membranas de los western blot que se muestran corresponden a experimentos representativos. Las incubaciones, tanto las de cultivos celulares como las foliculares, se realizaron por triplicado. Todos los experimentos se realizaron como mínimo tres veces con 6 animales por grupo experimental. Las comparaciones estadísticas entre los grupos fueron hechas utilizando tests paramétricos o no paramétricos según corresponda, el test usado se indica en la leyenda de cada figura. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa Statistica v5.0. Valores de probabilidad menores que 0,05 fueron considerados significativos.

CAPITULO I

RESULTADOS

1. NIVELES DE INHIBINA A Y B EN EL FLUIDO FOLICULAR DE MUJERES SOMETIDAS A TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA Y SU CORRELACIÓN CON LOS NIVELES HORMONALES Y CON EL EMBARAZO

Hasta la fecha los elementos que se han utilizado como indicadores de la reserva ovárica para la reproducción asistida son marcadores indirectos tales como la edad, los niveles de FSH basal y los niveles post respuesta a pruebas de estimulación, como estradiol basal y la relación FSH/LH, entre otros. Desde un punto de vista teórico, los productos de secreción directos de las células de la granulosa podrían reflejar con mayor exactitud la capacidad secretoria del ovario y el número de folículos. Por ejemplo al conocer y entender el control de la síntesis y secreción de las inhibinas y su papel como regulador de la FSH es que se ha abierto la posibilidad de tomar a esta familia de péptidos como indicador directo de la reserva folicular y marcador de los resultados en reproducción asistida (Hall y col., 1999). Para evaluar este supuesto se atravesaron las siguientes etapas:

- ☞ se determinaron los niveles de inhibina A y B producidos por las células de la granulosa-luteínicas humanas luego de ser cultivadas durante 48 hs.
- ☞ se determinaron los niveles de inhibina A y B en el fluido folicular (FF) de 23 pacientes sometidas a técnicas de fertilización *in vitro* (FIV) y se correlacionaron con los siguientes parámetros: (1) edad de la paciente, (2) el número de ovocitos recuperados, (3) la concentración folicular de FSH, hCG, estradiol y progesterona, y (4) el éxito del embarazo.

Se midió por un enzimoimmunoensayo específico para la forma A y B la producción de inhibinas por células de la granulosa-luteínicas humana luego de 48 hs de cultivo. Los resultados obtenidos mostraron mayores niveles de inhibina A que B ($p<0.05$) (Tabla 1). Dichos péptidos también se midieron en el fluido folicular, obtenido el día de la aspiración, de 23 pacientes sometidas a FIV. En este caso se encontró nuevamente que la concentración de inhibina A era mayor que la de inhibina B ($p<0.05$) (Tabla 1).

Tabla 1. Niveles de Inhibina A y B medidos en FF folicular de pacientes sometidos a FIV o en medio condicionado de cultivo de células de granulosa humanas. Tanto el FF como las células se obtuvieron el día de la aspiración ovocitaria. * $p < 0.05$

Medido en	Inhibina	
	A	B
Medio de cultivo (ng/ml o ng/1.10 ⁶ células)	2,89 ± 0,88*	0,025 ± 0,008
Fluido folicular (ng/mg proteína)	6,87 ± 1,27*	1,24 ± 0,23

Teniendo en cuenta que las células en estudio son granulosa-luteínicas, ya que se obtienen después del tratamiento de las pacientes con FSH y hCG, los resultados obtenidos son concordantes con trabajos previos que demuestran que, si bien la inhibina B es el principal péptido producido por las células de granulosa en la fase de crecimiento folicular, la inhibina A es el principal producto de células foliculares luteinizadas.

También se correlacionaron los niveles de inhibina A y B con la concentración de distintas hormonas en el fluido folicular (*Figura 1*). En este caso se observó una correlación positiva entre la concentración intrafolicular de inhibina A y la de progesterona ($r = 0,47$ $p < 0,05$), la de FSH ($r = 0,74$ $p < 0,05$) y la de estradiol ($r = 0,67$ $p < 0,05$). Del análisis de la *Figura 1* surge asimismo una correlación positiva entre los niveles de estradiol y los de FSH ($r = 0,56$ $p < 0,05$). Debemos señalar que no se encontró ninguna correlación entre los niveles de inhibina A y los de hCG, la edad de las pacientes y los ovocitos recuperados. En cuanto a la inhibina B, no se encontró ninguna correlación entre este péptido y el número de ovocitos recuperados ($r = -0,06$ $p > 0,05$), la progesterona ($r = -0,13$ $p > 0,05$), el estradiol ($r = -0,042$ $p > 0,05$) y la FSH ($r = -0,13$ $p > 0,05$). La correlación entre los niveles de progesterona y los de hCG en el fluido folicular no fue estadísticamente significativo ($r = 0,4$ $p > 0,05$).

De las 23 mujeres incorporadas al estudio el 43,5% logró el embarazo. No obstante no se encontraron diferencias significativas en el número total de embriones recuperados o transferidos, ni en la tasa de fertilización entre las mujeres embarazadas y

las no embarazadas. Sin embargo sí se encontraron diferencias significativas en el número de ovocitos recuperados y la edad de la paciente en estos dos grupos como se puede apreciar en la *Tabla 2*.

En cuanto a los niveles de inhibina en el fluido folicular de estas pacientes se observan mayores niveles de inhibina A en aquellas mujeres que lograron el embarazo, aunque estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas. Por otro lado los niveles de inhibina B en las pacientes embarazadas y no embarazadas fueron similares (ver *Figura 2*).

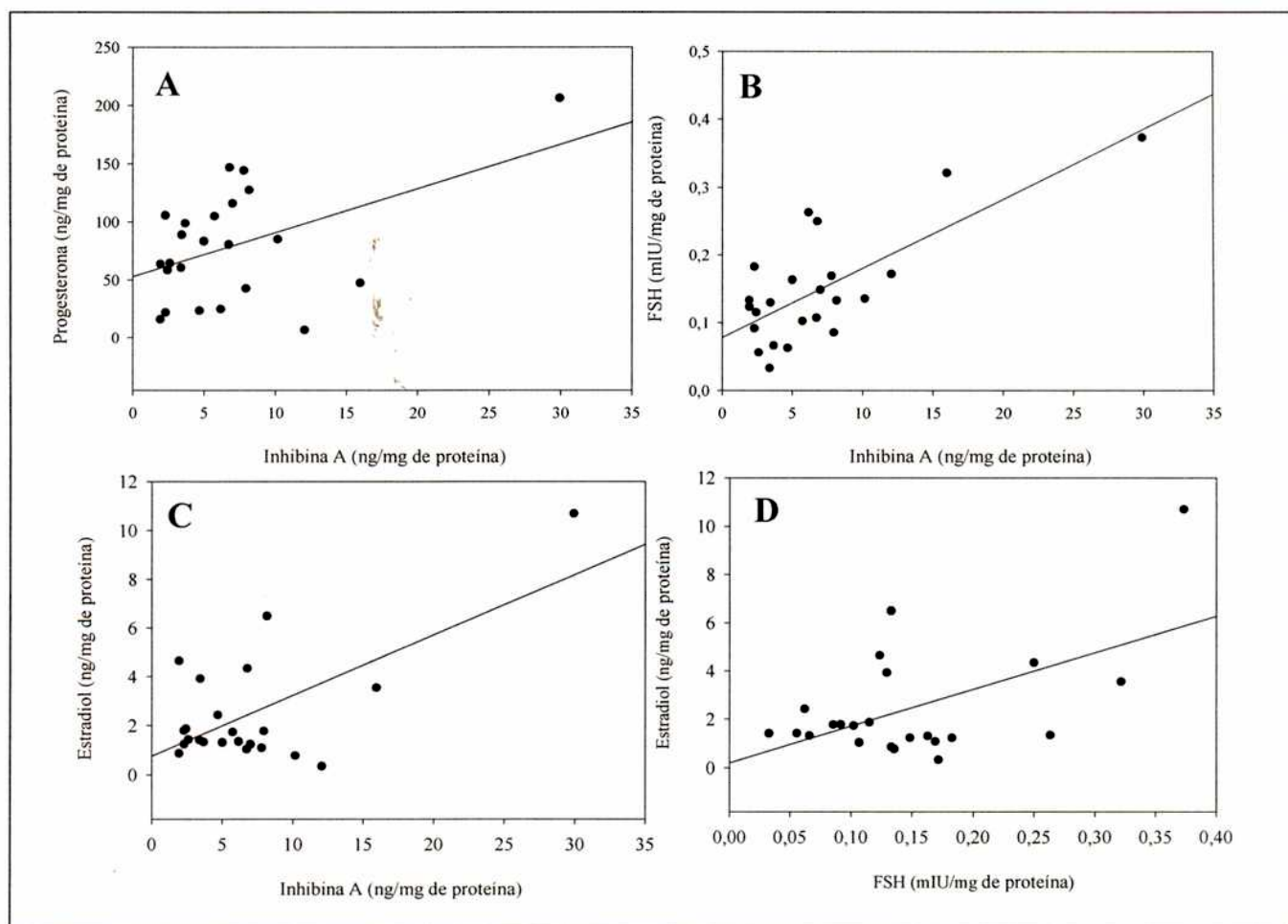


Figura 1. Correlación entre distintos parámetros determinados en el FF de pacientes sometidas a técnicas de fertilización asistida. **A.** Niveles de progesterona e inhibina A, se obtuvo una correlación positiva ($p < 0.05$) con un coeficiente de Pearson de 0,47. **B.** Niveles de FSH e inhibina A, se obtuvo una correlación positiva ($p < 0,05$) con un coeficiente de Pearson de 0,74. **C.** Niveles de estradiol e inhibina A, se obtuvo una correlación positiva ($p < 0,05$) con un coeficiente de Pearson de 0,67. **D.** Niveles de estradiol y FSH, se obtuvo una correlación positiva ($p < 0,05$) con un coeficiente de Pearson de 0,56.

Tabla 2. Parámetros determinados en mujeres embarazadas y no embarazadas sometidas a FIV.

PARÁMETROS	PACIENTES	
	EMBARAZADAS	NO EMBARAZADAS
<i>N</i>	10	13
Edad de la paciente	30,3 ± 1,1	36,4 ± 1,8*
Número de ovocitos recuperados	15,4 ± 1,88	7,07 ± 1,8*
Número de embriones transferidos	4,1 ± 0,48	4,1 ± 0,4
Porcentaje de fertilización	76,07 ± 4,21	76,62 ± 5,88
Porcentaje de implantación	39,83 ± 8,5	
Inhibina A (ng/mg de proteína)	8,42 ± 2,64	5,67 ± 1
Inhibina B (ng/mg de proteína)	1,34 ± 0,27	1,15 ± 0,40

Nota: Los datos se expresan como la media ± ES

* $p < 0,05$ es considerado como significativo.

2. LA INHIBINA COMO UN FACTOR INHIBIDOR DEL CRECIMIENTO FOLICULAR

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que el medio condicionado (MC) de un cultivo de células de granulosa-luteínicas humanas obtenidas de pacientes sometidas a técnicas de reproducción asistida, contiene un factor de naturaleza proteica con un peso molecular mayor a 30 KD. Este factor tendría un carácter inhibitorio del crecimiento folicular (Dain y col., 1993) y existen evidencias preliminares que sugieren que este factor podría ser la inhibina.

En estos estudios las células de la granulosa-luteínicas fueron cultivadas en ausencia (control) presencia y de FSH y estradiol durante 24 hs y se observó que en presencia de estos factores la incorporación de ^3H - timidina era menor que en el control. Para examinar la hipótesis que el efecto inhibitorio de la FSH y el estradiol esta mediado por la secreción de un factor regulador del crecimiento folicular, se recolectó el MC y se ensayó su efecto en un sistema de cultivo de células de la granulosa de rata estimuladas con FSH y estradiol. Este sistema heterólogo posee la ventaja de tener una capacidad proliferativa mayor que los cultivos de células provenientes de humanos. Se

comprobó que la adición de MC (Woodruff y col., 1993) a cultivos de células de la granulosa inmaduras de rata producía una inhibición en la incorporación de ^3H timidina de un 70% para el MC proveniente de células de la granulosa-luteínicas humanas estimuladas con FSH y estradiol ($p < 0,05$) y de un 50% en el caso del MC proveniente de células sin estimular ($p < 0,05$). Sin embargo estas diferencias no resultaron significativas (ver *Figura 2*) (Dain y col., 1993). Además ensayos de ultrafiltración mostraron que el/los factor/es tendrían un peso molecular mayor de 30 kD.

Asimismo, diversos autores han demostrado que las células de la granulosa humanas expresan el ARNm de la inhibina y producen la proteína bioactiva, cuyo peso molecular es de 32 kD (Eramaa y col., 1993; Tsonis y col., 1987).

Por lo tanto, como se comentó en los *Antecedentes*, se postula que además de su acción inhibiendo la secreción de FSH hipofisaria, la inhibina regularía el crecimiento del folículo ovárico.

En base a estas observaciones se decidió evaluar la posibilidad de que la inhibina sea el o uno de los factores presentes en el MC de células de la granulosa-luteínicas humanas, que produce la inhibición de la proliferación de las células foliculares. Para esto se midieron los niveles de inhibina en el medio condicionado de cultivos de células de la granulosa-luteínicas humanas y los resultados mostraron altos niveles de inhibina A ($2,89 \pm 0,88 \text{ ng}/1 \times 10^6 \text{ células/ml}$) y bajos niveles de inhibina B ($0,025 \pm 0,0085 \text{ ng}/1 \times 10^6 \text{ células/ml}$). Estos resultados concuerdan con la dinámica de secreción de inhibina observada durante el ciclo folicular.

Una vez que determinamos la presencia de inhibina en el MC, se ensayó el efecto del MC sobre la proliferación de células de la granulosa inmadura de rata en cultivo, conjuntamente con anticuerpos anti la subunidad α , la subunidad β_A y la subunidad β_B . Como se observa en la *Figura 3* la inhibición de la proliferación celular solo se revierte cuando se utiliza el anticuerpo anti subunidad β_A , lo que nos lleva a postular que el factor es la inhibina A ($\alpha\beta_A$) o es la activina A ($\beta_A\beta_A$). Para verificar que el efecto observado no se debe a la utilización de una inmunoglobulina se utilizó como control un anticuerpo anti cabra, con el cual no se observó ningún efecto.

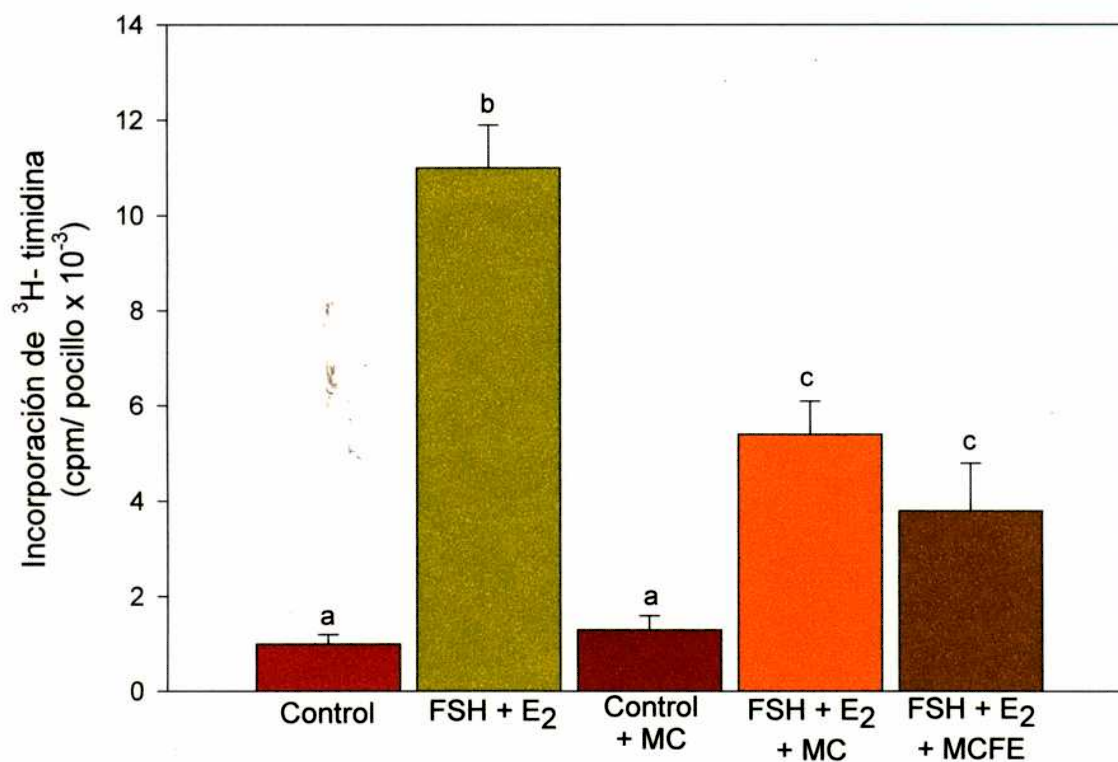


Figura 2. Efecto del medio condicionado obtenido de cultivos de células de la granulosa luteínicas humanas incubadas sin (MC) o con FSH y estradiol (MCFE) sobre la incorporación de ^3H -timidina en cultivos de células de la granulosa de rata. Las células fueron cultivadas en ausencia (control) o en presencia (FSH + E₂) de FSH (20 ng/ml) y estradiol (50 ng/ml). La ^3H timidina fue incorporada el día 1 de plaqueo y la placa cosechada 24 hs después. Los datos se expresan como la media $\pm$ ES. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas $p > 0,05$ entre valores medios, por ANOVA y test de Tukey. **L.B. Dain y col., *Molecular Reproduction y Development*, 1993.**

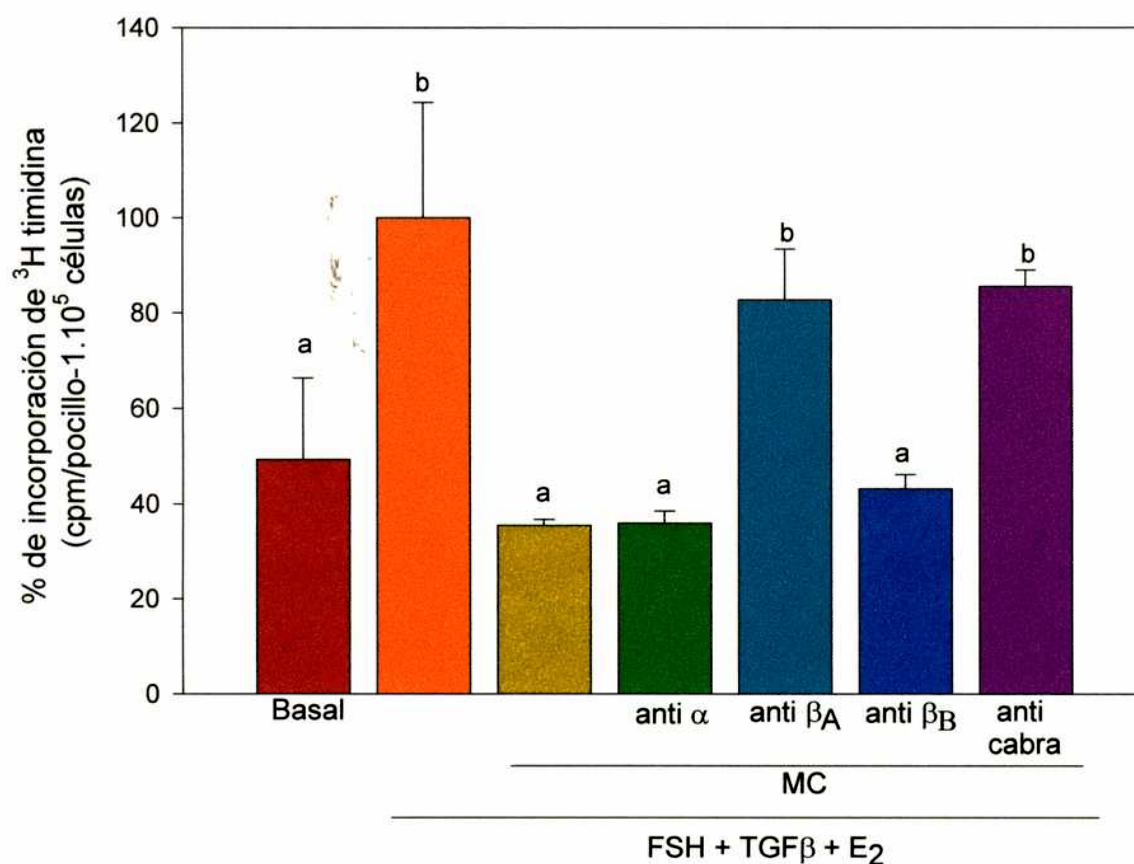


Figura 3. Efecto del medio condicionado (MC) obtenido de cultivos de células de la granulosa luteínicas humanas y de los anticuerpos anti subunidad α , β_A y β_B (1:500) sobre la incorporación de ^3H timidina en cultivos de células de la granulosa de rata. Las células de la granulosa fueron cultivadas en ausencia (Basal) o en presencia (FSH + TGF β + E $_2$) de FSH (20 ng/ml), TGF β (5 ng/ml) y estradiol (500 ng/ml). Todos los estímulos fueron agregados 3 hs después del plaqueo, la ^3H timidina fue adicionada 24 hs mas tarde y la placa cosechada 24 hs después. Los datos se expresan como la media $\pm$ ES. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas $p > 0,05$ entre valores medios por ANOVA y test de Tukey.

DISCUSSION

1. NIVELES DE INHIBINA A Y B EN EL FLUIDO FOLICULAR DE MUJERES SOMETIDAS A TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA Y SU CORRELACIÓN CON LOS NIVELES HORMONALES Y CON EL EMBARAZO

Uno de los problemas más comunes que surgen en los centros que realizan técnicas de reproducción asistida (ART) es el alto porcentaje de fallas en la implantación de los embriones transferidos. Es por esto que surge la necesidad de identificar factores que sean indicativos del éxito del embarazo luego de la transferencia del embrión. Los parámetros que se utilizan actualmente para evaluar el resultado del tratamiento son el tamaño folicular, el grado de maduración del ovocito, los niveles de estradiol y las características morfológicas del embrión transferido. En un intento por identificar aquellos parámetros foliculares que reflejen este proceso, el presente estudio evalúa los niveles de inhibina A y B y su correlación con diferentes hormonas en el fluido folicular y el éxito de embarazo en pacientes sometidas a ART.

Se observó que en las 23 pacientes estudiadas, tanto en el medio condicionado obtenido de cultivos de células de la granulosa-luteínicas como en el fluido folicular, los niveles de inhibina A fueron mayores que los de inhibina B. Esto es un resultado esperado ya que por un lado se sabe que el folículo dominante produce más inhibina A que los folículos subordinados y además sus niveles de inhibina B son bajos. Cabe destacar que las células que producen inhibina en estas pacientes están luteinizadas debido a la estimulación con FSH y hCG y bajo estas condiciones se observa una mayor producción de inhibina A. Tal como se describió *en los Antecedentes*, el patrón de secreción de la inhibina A en suero a lo largo del ciclo menstrual muestra un aumento en la fase periovulatoria, llegando a un pico con el aumento de LH y alcanza los máximos niveles en la fase lútea (de Kretser y col., 2002).

Además se encontró una correlación positiva entre la inhibina A y la FSH y los niveles de estradiol. Este hecho se refleja en los patrones de secreción periovulatorios de la inhibina A, la FSH y el estradiol, donde se ve que las tres hormonas aumentan en este período. Estos resultados sugieren que estas dos últimas hormonas estimulan la producción de inhibina A. Esta hipótesis está en concordancia con estudios previos realizados en cultivos de célula de la granulosa de rata donde se muestra que la FSH y el estradiol son los mayores estimuladores de la producción de inhibina A (Lanuza y col., 1999). De esta manera los niveles foliculares de inhibina A podrían ser un reflejo de la dinámica folicular, de la respuesta a FSH y de la producción de estrógenos.

También se encontró una correlación positiva entre los niveles de inhibina A y los de progesterona, lo que nos lleva a pensar que no se puede descartar un efecto estimulador de hCG sobre la producción de inhibina por las células de la granulosa luteínicas. Estas células han adquirido la capacidad de responder a LH, debido al aumento en la síntesis de receptores de LH, después del estímulo *in vivo* con FSH. (Hsueh y col., 1984; Segaloff y col., 1990). Es significativo destacar que no se encontró ninguna correlación entre los niveles de inhibina B y el de las otras hormonas estudiadas en el fluido folicular. Este resultado probablemente se relacione con el hecho que en este período periovulatorio las células secretan principalmente inhibina A, la cual sería regulada por factores u hormonas presentes en el fluido folicular. Otro dato importante para analizar son los niveles de inhibina A y B en el fluido folicular de pacientes embarazadas y no embarazadas. Lamentablemente, con el número de muestras estudiadas, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de estos péptidos en dichos grupos, sin embargo aquellas pacientes que lograron el embarazo mostraron una tendencia a tener mayores concentraciones de inhibina A comparado con aquellas que no embarazaron. Por su parte (Hall y col., 1999)) encontró mayores niveles de inhibina B en el fluido folicular del folículo más grande aspirado en las pacientes que embarazaron y ninguna diferencia en los niveles de inhibina A.

Desde el inicio de la fertilización *in vitro* se ha convertido en un verdadero desafío tratar de predecir la respuesta a la estimulación de la ovulación. No presentan problemas aquellas pacientes con respuesta folicular normal, pero sí aquellas con respuesta exagerada o pobre. Si se pudiera asesorar a este grupo de pacientes con respecto al comportamiento del ciclo antes del comienzo del mismo, se podría evitar el costo psicológico, social y económico que arroja un resultado desfavorable y ofrecer, en consecuencia, alternativas. Surge así la necesidad de predecir la respuesta y los resultados de las técnicas de fertilización asistida (Hall y col., 1999). Es por esto que se plantean dos problemas a los que hay que tratar de solucionar, predecir el resultado del ciclo antes del comienzo del mismo y predecir el resultado del embarazo.

Para resolver el primer problema habría que concentrarse en aquellos parámetros que, por ejemplo, puedan predecir el número de los ovocitos aspirados. Hasta la fecha parámetros tales como la edad de la paciente, la FSH basal y post prueba de estimulación, la relación FSH/LH, los niveles de estradiol basal, la evaluación

ultrasonográfica de volumen ovárico, el número de folículos antrales, el doppler, entre otros, son utilizados frecuentemente y se correlacionan directamente con el pronóstico del tratamiento. Sin embargo, más recientemente diversos autores, entre ellos (Fried y col., 2003) encontraron que la medición de inhibina B en suero en el día 2 del ciclo puede predecir el número de ovocitos y sería un buen marcador de respuesta ovárica.

En cuanto a la solución del segundo problema, el de predecir el resultado del embarazo, habría que concentrarse en indicadores más directos del funcionamiento ovárico. Es razonable dirigir nuestra atención a los productos de secreción que tienen su origen en células de la granulosa lo cual nos permitiría evaluar con mayor precisión cuál es el potencial reproductivo de los ovarios. Por ejemplo Fried y col. (2003) también observaron que la relación entre IGF-1/IGFBP-1 medida tanto en suero como en el fluido folicular era mayor en el grupo de embarazadas, lo que reflejaría la calidad de los ovocitos.

En lo que respecta al presente trabajo, los niveles de inhibina A medidos en el fluido folicular podrían ser un buen marcador del éxito de la implantación, si con los nuevos estudios ya iniciados en nuestro laboratorio, se observara que esa tendencia se amplía y la diferencia se hace significativa. Es importante destacar que la concentración hormonal en este estudio fue determinada en el fluido folicular de una población de folículos aspirados con un diámetro mayor a 16 mm. Si el objetivo fuese utilizar estos parámetros como marcadores del éxito del embarazo, no sería apropiado medirlos en el fluido folicular de folículos individuales, ya que, teniendo en cuenta que se transfieren mas de un embrión, no sería posible inferir cual de los embriones transferidos se implantó y continuó su desarrollo. La determinación de los niveles de inhibina A o de otros componentes del microambiente folicular secretados por las células foliculares en respuesta al tratamiento con gonadotrofinas, asociado con otros parámetros como la edad de la paciente, el número de ovocitos y de embriones podrían permitir reconocer aquellos ciclos destinados a fallar o podría contribuir a los criterios de criopreservación de los embriones que serán usados en futuras transferencias.

2. LA INHIBINA COMO UN FACTOR INHIBIDOR DEL CRECIMIENTO FOLICULAR

A partir de estudios realizados en nuestro laboratorio por la Dra. Dain (1993) se postuló que la acción de la LH en el arresto de la división celular durante la

diferenciación del folículo ovárico a cuerpo lúteo, estaría mediada por la producción de un factor inhibitorio del crecimiento sintetizado por las mismas células de granulosa. En tal sentido, resultados iniciales han demostrado que el medio condicionado de células granulosa-luteínicas humanas, obtenidas de pacientes sometidas a técnicas de reproducción asistida, contiene un factor de naturaleza proteica con un peso molecular mayor a 30 kD. Cuando se adiciona este MC (10% v/v, recolectado el segundo día de cultivo) provenientes tanto de cultivos de células sin estimular, control, como de células estimuladas con FSH y estradiol, a cultivos de células de la granulosa inmaduras de rata, se produce una importante inhibición en la incorporación de ^3H -timidina (Dain y col., 1993). Esto sugeriría que este factor tendría un carácter inhibitorio del crecimiento folicular.

Asimismo, diversos autores han demostrado que las células de la granulosa-luteínicas humanas expresan el ARNm y producen inhibina bioactiva cuyo peso molecular es de 32 kD (Eramaa y col., 1993; Tsonis y col., 1987). Se postula que, además de su acción inhibiendo la secreción de FSH hipofisaria, la inhibina regula el crecimiento del folículo ovárico. Sobre la base de estas observaciones y a las realizadas por la Dra. Dain es que se sugiere que uno de los factores presentes en el MC, responsable de la inhibición de la proliferación, podría ser la inhibina.

De acuerdo con este supuesto y continuando con las investigaciones que nos lleven a dilucidar cual es el factor inhibitorio presente en el MC se midieron los niveles de estos péptidos en el MC obtenido de cultivos de células de la granulosa-luteínicas humanas sin estimular y se observaron mayores niveles de inhibina A que B. Estos resultados concuerdan con la dinámica de secreción de inhibina observada durante el ciclo folicular. La inhibina B crece en la transición de la fase luteal a la folicular, con un pico en la fase folicular media (Groome y col., 1996), mientras que la inhibina A no comienza a aumentar hasta el incremento de estradiol en la fase folicular tardía, lo que sugiere una secreción por parte del folículo dominante (Groome y col., 1994). Sin embargo cabe señalar que sólo un 10% del MC se adiciona al cultivo de células de la granulosa inmadura de rata, por lo que los niveles de inhibina B (2,5 pg/ml) serían muy bajos como para producir un efecto, mientras que los niveles de inhibina A serían de aproximadamente 30 pg/ml. Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que si bien esta concentración es baja, igualmente estaría ejerciendo un efecto. Aunque no se puede

descartar que sea más de un factor el responsable de la actividad inhibitoria, esto se evidencia en la *Figura 3* de los *Resultados* donde se observa que cuando se incubaba al MC conjuntamente con el anticuerpo anti la subunidad β_A la inhibición de la proliferación producida por el MC se revierte. Es interesante destacar que esa reversión no se observa cuando se incubaba con el anticuerpo anti subunidad α y como se menciono, la inhibina A está compuesta por una subunidad α y una β_A .

Hasta la fecha las investigaciones realizadas con el fin de identificar al receptor de la inhibina han avanzado en forma considerable. Actualmente se proponen dos moléculas como posibles candidatos, el betaglicano-glicano, el cual se une a la inhibina A con alta afinidad, y la proteína que une inhibina o *inhibin binding protein* (InhBP/p120). Sin embargo, ninguna de estas dos proteínas provee un mecanismo de señalización independiente para la inhibina, por lo que se considera mas adecuado referirse a ellas como co-receptores. De esta manera se proponen dos modelos generales que explican cómo las inhibinas afectan las células blanco: uno donde la inhibina compite con la activina por su unión al receptor inhibiendo el camino de señalización de esta última y por lo tanto antagonizando su efecto y otro modelo donde las inhibinas interactuarían con un receptor independiente generando un camino de señalización diferente.

Por investigaciones anteriores se sabe que la activina se une primero a su receptor serina treonina de tipo II, ActRII o IIB para formar un complejo que recluta y activa al receptor de tipo I ALK4, el cual inicia la regulación de la expresión génica vía las proteínas Smad. La inhibina, al igual que la activina, se une al receptor de tipo II de la activina a través del mismo sitio de unión. Este hecho apoya la idea de que la activina y la inhibina se unen al ActRII a través de la subunidad β . A pesar de que las inhibinas y las activinas comparten, o quizás habría que decir mas propiamente, debido a que comparten la subunidad β , funcionan como antagonistas en la mayoría de los contextos fisiológicos. De este modo la inhibina puede antagonizar la acción de la activina bloqueando la unión de ésta al ActRII y evitar así la unión del receptor de tipo I. Sin embargo este modelo de competencia no es consistente ya que la unión de la inhibina al ActRII es muy baja. Este hecho no puede ser explicado por un modelo en donde la inhibina actúe sólo compitiendo con la activina por la unión al receptor de tipo II, pero sí concuerda con la existencia de un componente adicional que sea requerido para la

acción de la inhibina. De esta manera Gray y col. (2001) proponen un modelo (ver *Figura 1*) en el cual el betaglicano-glicano facilita la unión de la inhibina al receptor de tipo II para formar un complejo que no recluta al receptor de tipo I ni activa la señalización de las Smad. En este modelo la asociación de la inhibina con el ActRII a través de la subunidad β y con el betaglicano-glicano a través de la subunidad α , previene la unión de la activina al ActRII y de esta forma se genera un bloqueo competitivo de la acción de la activina (Bernard y col., 2002; Chapman y col., 2002).

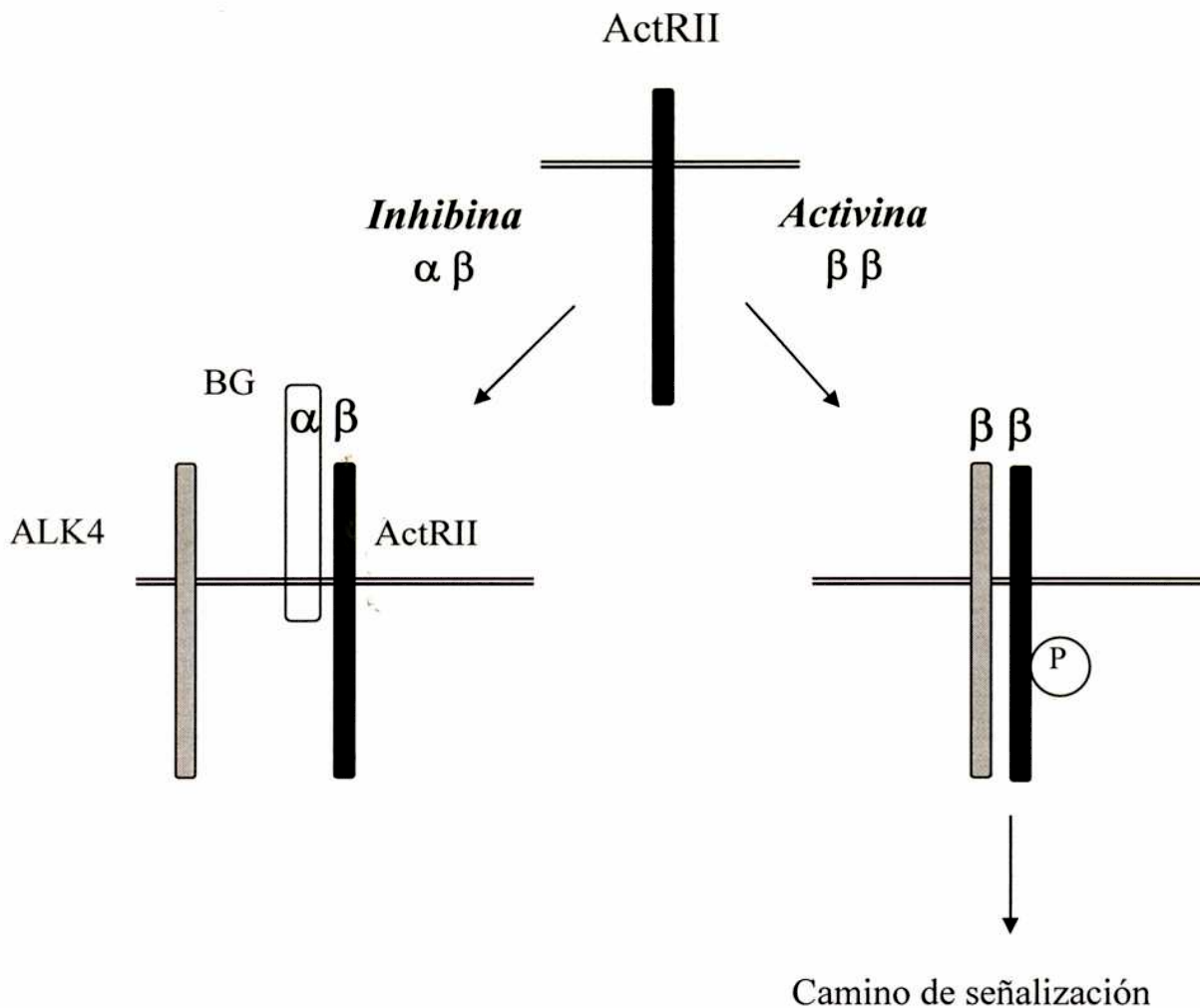


Figura 1. Diagrama del modelo propuesto por Gray PC. y col. (2001) donde el betaglicano-glicano (BG) actúa como un co-receptor de la inhibina con el ActRII. De acuerdo a este modelo el betaglicano-glicano facilita la unión de la inhibina con el ActRII y lleva a la formación de un complejo ternario que incluye a la inhibina, al betaglicano-glicano y al ActRII pero no al ALK4. Se propone que la formación del complejo previene la unión de la activina al ActRII y de esta forma antagoniza la señal de la activina.

Suponiendo que la inhibina actúa según este modelo, podríamos decir que en el caso del experimento que se muestra en la *Figura 3* de los *Resultados*, es la activina A la responsable de la inhibición de la proliferación. De esta forma cuando incubamos con el anticuerpo anti subunidad α no se observa ningún efecto, o sea que la activina A seguiría actuando, pero cuando incubamos con el anticuerpo anti subunidad β_A se bloquea el camino de señalización de la activina, como lo haría la inhibina.

En cambio si suponemos que la inhibina interactúa con un receptor independiente sólo podemos explicar los resultados observados en la *Figura 3* de los *Resultados* si la inhibina se une a su receptor a través de la subunidad β_A , ya que la inhibición de la proliferación no se revierte cuando se incuba con el anticuerpo anti α .

Frente a este panorama es difícil sacar conclusiones definitivas. Como podemos observar sólo se revierte el efecto antiproliferativo del MC cuando se incuba con el anticuerpo anti subunidad β_A . Pero al no tener certeza de la estructura del receptor o del tipo de unión con el mismo, ni a través de que subunidad se produce, no se puede concluir, por el momento, más que la inhibina A o la activina A sería uno de los posibles factores inhibitorios de la proliferación celular presentes en el MC obtenido de células de la granulosa luteínicas humanas.

CAPITULO II

RESULTADOS

1. EFECTO DE LA INHIBINA A SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA INMADURAS DE RATA EN CULTIVO

Con el fin de continuar la evaluación del efecto de la inhibina sobre la proliferación celular, se cultivaron células de la granulosa de rata estimuladas con estradiol, TGF β y FSH con distintas concentraciones de inhibina A recombinante humana. La incorporación de ^3H -timidina inducida por la combinación de FSH, TGF β y estradiol fue considerada como el control y designada arbitrariamente como el 100%. Se observó una inhibición de la proliferación celular del 5,6 % con 0,04 ng/ml de inhibina, del 0,2 % con 0,4 ng/ml, del 15,6 % con 4 ng/ml y del 38,4 % con 40 ng/ml. Sólo hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control cuando se usaron concentraciones de inhibina de 4 y 40 ng/ml (ver *Figura 4*). Ahora bien, a pesar que la incorporación de ^3H -timidina es una técnica usualmente utilizada para medir proliferación celular, no implica necesariamente que la célula haya entrado en la fase de mitosis del ciclo celular, sino que esta replicando su ADN. Con el fin de corroborar esto se puso a punto otro método colorimétrico, no radioactivo, denominado MTS, que mide el número de células viables en proliferación. En primera instancia se hizo una curva de tiempo para ver en qué momento, luego del agregado de los estímulos a la placa de cultivo, se veían mayores diferencias en la inhibición de la proliferación cuando se incubaba con 40 ng/ml de inhibina. Como se observa en la *Figura 5* el tiempo elegido fue el de 72 hs que es donde la inhibina produjo una inhibición de la proliferación de aproximadamente el 40 %. Con esta técnica se observó el mismo patrón de disminución de la proliferación que el observado con el método de incorporación de ^3H -timidina. En este caso la inhibición de la proliferación fue del 1,5 % con 0,04 ng/ml ($p > 0,05$) de inhibina, del 7,3 % con 0,4 ng/ml ($p > 0,05$), del 17,5 % con 4 ng/ml ($p > 0,05$) y del 36,1 % con 40 ng/ml ($p < 0,05$), como se muestra en la *Figura 4*. Para visualizar mejor esta disminución de la proliferación se graficaron en la *Figura 6* los datos obtenidos por el método de incorporación de ^3H -timidina y se observó un efecto dosis respuesta para la inhibina con un valor estimado de IC_{50} de 4,8 ng/ml.

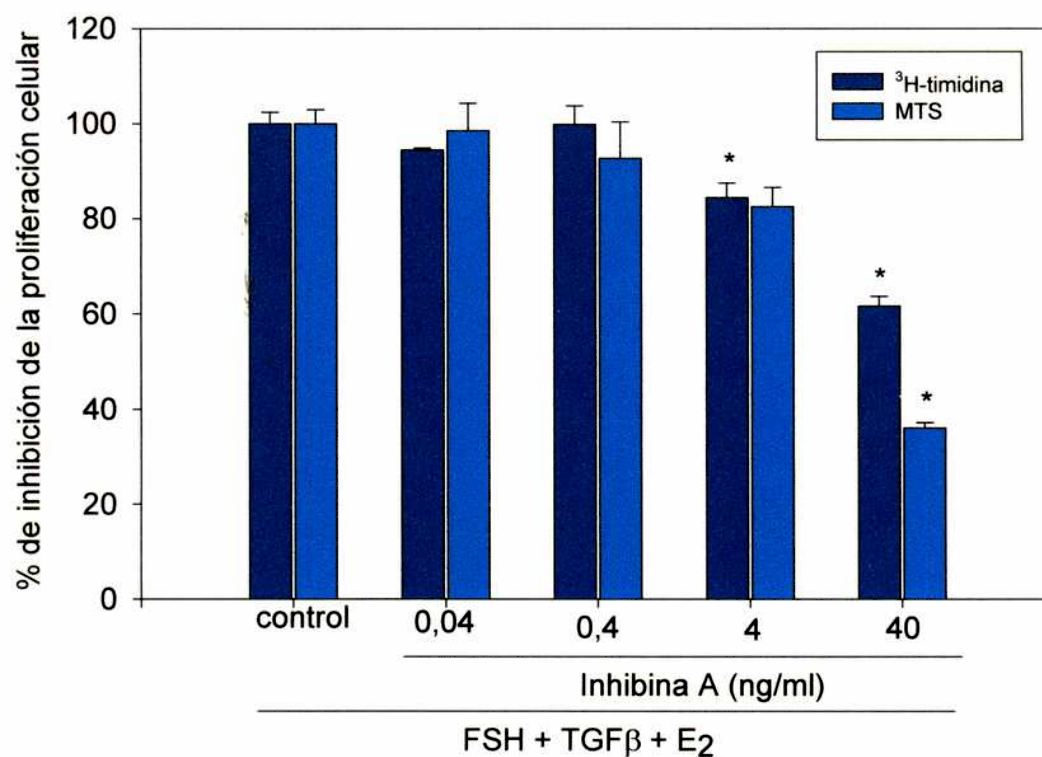


Figura 4. Porcentaje de inhibición de la proliferación celular medido como incorporación de ³H-timidina y metabolismo celular en cultivos de células de la granulosa de rata. Se plaquearon 1x10⁶ células/pocillo. La ³H-timidina se adicionó 1 día después del plaqueo y los cultivos se cosecharon 24 hs más tarde, mientras que el MTS se adicionó 72 hs luego del plaqueo y se midió 2 hs más tarde. Los valores están expresados como % de inhibición con respecto al control (FSH + estradiol + TGFβ) por quintuplicado ± ES. * p<0,05 vs su respectivo control por ANOVA y test de Tukey.

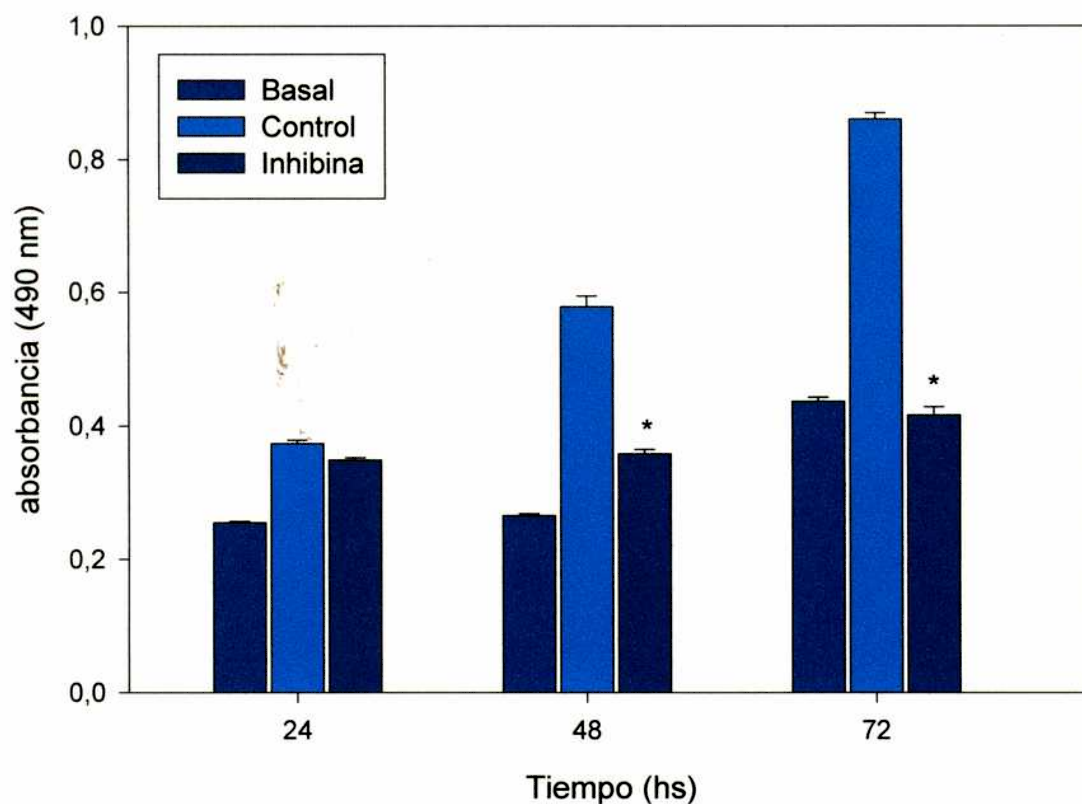


Figura 5. Inhibición del metabolismo celular medido por el método de MTS en cultivos de célula de la granulosa de rata. Se plaquearon 1×10^5 células/pocillo en ausencia (Basal), en presencia de FSH+TGF β +estradiol (Control) y en presencia de estos tres factores más 40 ng/ml de inhibina A (Inhibina). El MTS se adicionó 24, 48 o 72 hs luego del plaqueo y se midió 2 hs más tarde. Los valores se realizaron por quintuplicado y están expresados como la media $\pm$ ES.
* $p < 0,05$ vs el control por ANOVA y test de Tukey.

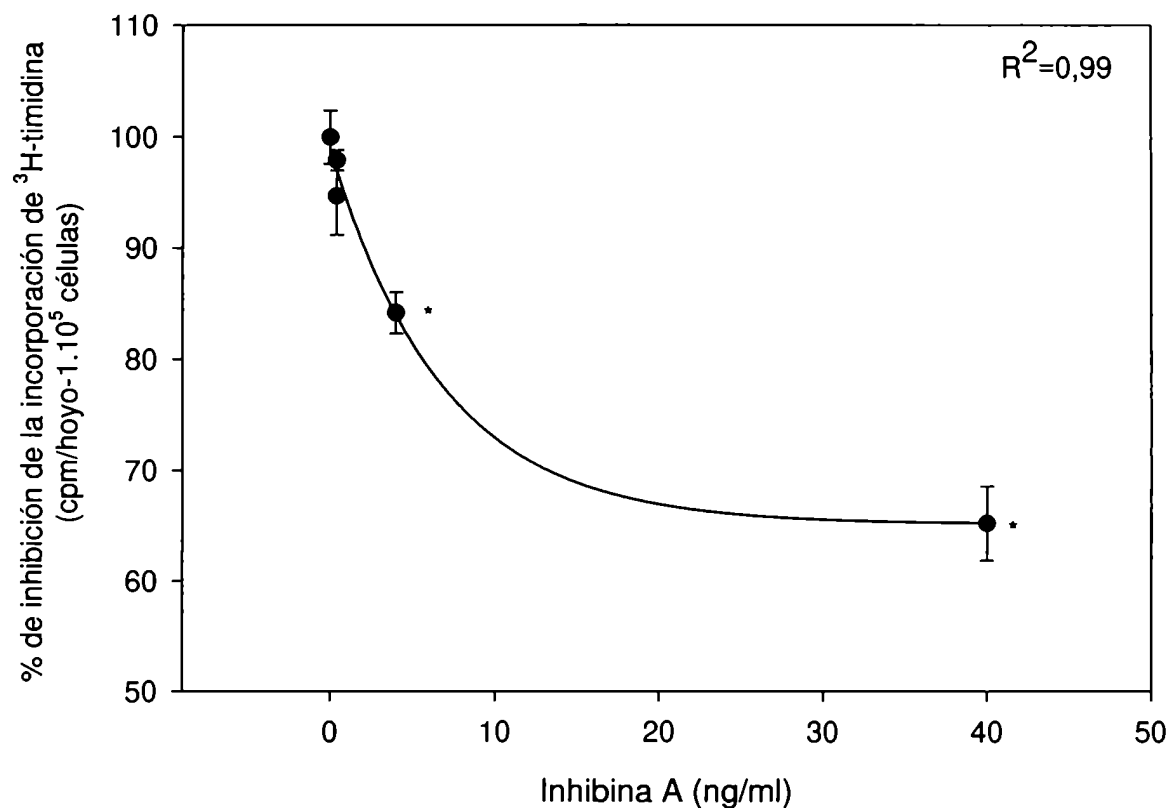


Figura 6. Porcentaje de inhibición de la síntesis de ADN medido por incorporación de ³H-timidina en función de la concentración de inhibina A. Se cultivaron las células de la granulosa (1x10⁵ cells/pocillo) en presencia de FSH (20 ng/ml), TGFβ (5 ng/ml) y estradiol (500 ng/ml) y la incorporación de ³H-timidina inducida por la combinación de estos tres factores fue considerada como el control y designada arbitrariamente como el 100%. La ³H-timidina fue adicionada 1 día después del plaqueo y la placa cosechada 24 hs mas tarde. Los valores se expresan como la media ± ES de incubaciones por triplicado de 4 experimentos independientes, * p<0.05 vs. el control por ANOVA y test de Tukey.

Para descartar la posibilidad de que la inhibina endógena secretada por las células de la granulosa en cultivo estuviera enmascarando el efecto observado por el agregado de inhibina A recombinante humana, se midieron los niveles de la proteína secretados por estas células en respuesta a los estímulos utilizados anteriormente (FSH, E₂, TGF β), en una curva de tiempo (ver *Figura 7*).

Observamos que a tiempos cortos de cultivo, los niveles de inhibina A producidos por las células de la granulosa de rata son menores que los capaces de producir la inhibición de la proliferación: 0,2 ng/ml a las 2hs; 0,04 ng/ml a las 4hs; 0,7 ng/ml a las 8hs; 1,5 ng/ml a las 16hs; 3,2 ng/ml a las 24hs.

3. EFECTO DE LA ACTIVINA A SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA INMADURAS DE RATA EN CULTIVO

Hasta el momento varios autores han observado que en diferentes tejidos la activina y la inhibina poseen efectos antagónicos. Para corroborar este hecho se cultivaron células de la granulosa de rata estimuladas con estradiol, TGF β y FSH con distintas concentraciones de activina A recombinante humana y se midió proliferación celular. Nuevamente la incorporación de ³H-timidina inducida por la combinación de FSH, TGF β y estradiol fue considerada como el control y designada arbitrariamente como el 100%. Se observó un aumento de la proliferación celular del 2,5 % con 4 ng/ml de activina, del 41,4 % con 40 ng/ml y del 38 % con 100 ng/ml. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control cuando se usaron concentraciones de activina de 40 y 100 ng/ml (ver *Figura 8*).

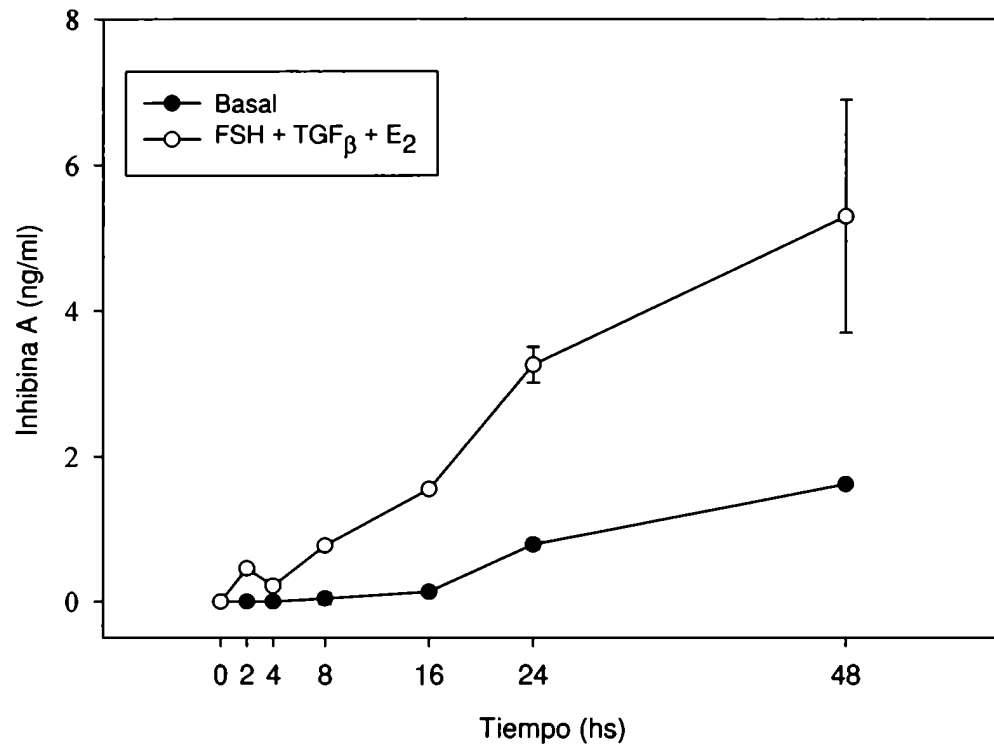


Figura 7. Efecto del tiempo de cultivo en la producción de inhibina A en células de la granulosa de rata. Se recolectó el medio condicionado a las 0, 2, 4, 8, 16, 24 y 48 hs luego del agregado de los estímulos (FSH+TGF β +E₂) y se midió la inhibina A en el medio condicionado por ELISA de dos sitios.

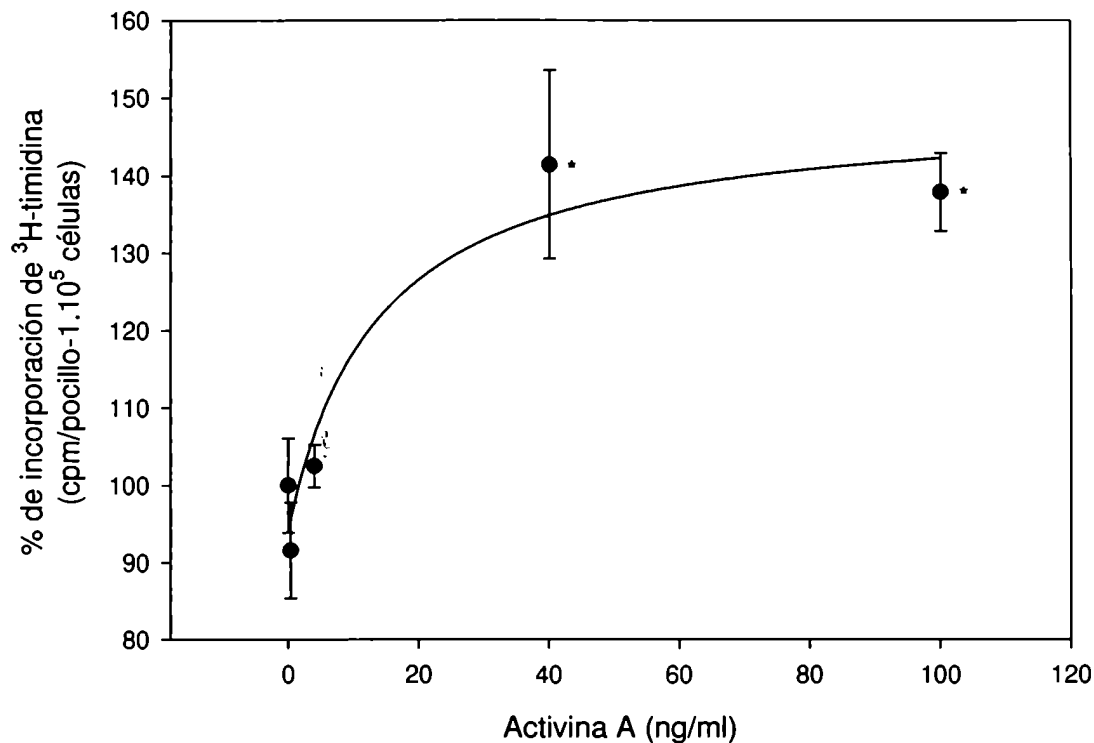


Figura 8. Porcentaje de aumento de la síntesis de ADN medido por incorporación de ³H-timidina en función de la concentración de activina A. Se cultivaron las células de la granulosa (1×10^5 cells/pocillo) en presencia de FSH (20 ng/ml), TGF β (5 ng/ml) y estradiol (500 ng/ml) y la incorporación de ³H-timidina inducida por la combinación de estos tres factores fue considerada como el control y designada arbitrariamente como el 100%. La ³H-timidina fue adicionada 1 día después del plaqueo y la placa cosechada 24 hs mas tarde. Los valores se expresan como la media $\pm$ ES de incubaciones por triplicado de 4 experimentos independientes, * $p < 0.05$ vs. el control por ANOVA y test de Tukey.

4. PRODUCCIÓN DE PROGESTERONA Y ESTRADIOL EN CULTIVOS DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA DE RATAS

Se determinó la acumulación de progesterona y estradiol en el medio condicionado de células de la granulosa luego de 48 hs de cultivo (ver *Tabla 3*). El agregado de FSH y TGF β produjo una estimulación de la producción de estos esteroides, pero estos valores no se modificaron con la incubación con inhibina.

Tabla 3. Efecto de la FSH, el TGF β y la inhibina A sobre la producción de progesterona y estradiol en cultivos de células de la granulosa de rata.

Tratamiento	FSH	TGF β	Inhibina A	Progesterona (ng/ml)	Estradiol (ng/ml)
Basal	-	-	-	6.6 $\pm$ 1.9 ^a	0.5 $\pm$ 0.06 ^a
Control	+	+		81.8 $\pm$ 2.8 ^b	25.8 $\pm$ 4.9 ^b
Inhibina	+	+	+	70.8 $\pm$ 7.6 ^b	17.2 $\pm$ 0.7 ^b

Los valores se expresan como la media $\pm$ ES, letras distintas indican diferencias significativas por ANOVA y Tukey test (P<0.05).

Como la segunda hipótesis derivada que se planteara en la investigación es que la inhibina secretada por el folículo dominante actúa sobre los folículos subordinados de la cohorte en progresión inhibiendo su desarrollo, utilizamos hasta el momento como modelo, cultivos de células de la granulosa *inmadura*. Dichas células, se las denomina así ya que fueron obtenidas de ovarios de ratas tratadas con el análogo de estradiol DES y provienen de folículos preantrales y antrales temprano.

En cambio, en el caso de la evaluación del efecto de la inhibina sobre la proliferación celular en el folículo dominante, se utilizó como modelo cultivos de células de la granulosa *maduras*. Dichas células provienen de folículos antrales maduros y preovulatorios y son obtenidas de ovarios de ratas tratadas con PMSG, una hormona que tiene acción de FSH.

5. EFECTO DE LA INHIBINA A SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA MADURAS DE RATA EN CULTIVO

Del examen de la *Figura 9*, surge que no se encontraron diferencias significativas en los niveles de incorporación de ^3H -timidina con distintas concentraciones de inhibina, pero sí se observa un pronunciado aumento del 165% con 40 ng/ml de activina. En este caso, se utilizó como estímulo de la proliferación celular al factor de crecimiento epidérmico EGF, ya que estas células no responden a FSH por haber sido expuestas previamente a esta hormona con el tratamiento con PMSG.

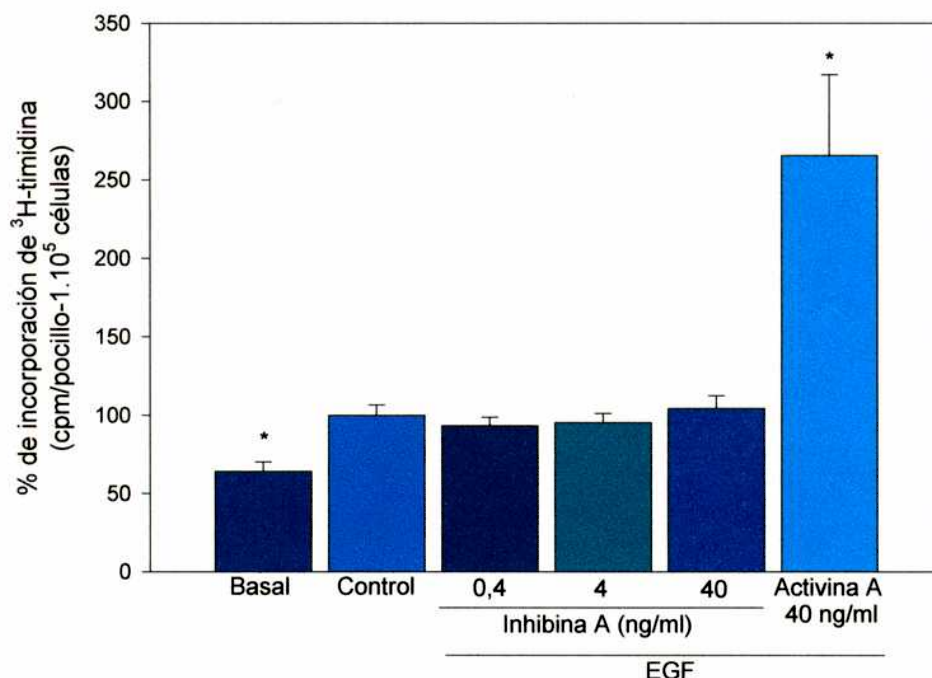


Figura 9. Porcentaje de incorporación de ^3H -timidina en función de la concentración de distintas hormonas. Se cultivaron las células de la granulosa (1×10^5 células/pocillo) en ausencia (Basal), en presencia de EGF (100 ng/ml) (Control) y en presencia de EGF y distintas concentraciones de inhibina A (0,4; 4 y 40 ng/ml) o 40 ng/ml de activina A. Los valores están expresados como el % de estimulación con respecto al control. La ^3H -timidina fue adicionada 1 día después del plaqueo y la placa cosechada 24 hs mas tarde. Los valores se expresan como la

media $\pm$ ES de incubaciones por triplicado de 3 experimentos independientes, * $p < 0.05$ vs. el control por ANOVA y test de Dunnet.

6. EFECTO DE LA INHIBINA A SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS HIPOFISARIAS DE RATA EN CULTIVO

Con el fin de evaluar el efecto de la inhibina sobre la proliferación de otro tipo celular, distinto de las células foliculares y que no responde a la inhibina, se hicieron cultivos de células hipofisarias y se las incubó con distintas concentraciones de esta hormona. Como se aprecia en la Figura 10 no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de incorporación de ^3H -timidina entre el control y las distintas concentraciones de inhibina. Esto demuestra que la acción de la inhibina sobre las células de granulosa es específica de dicho tipo celular.

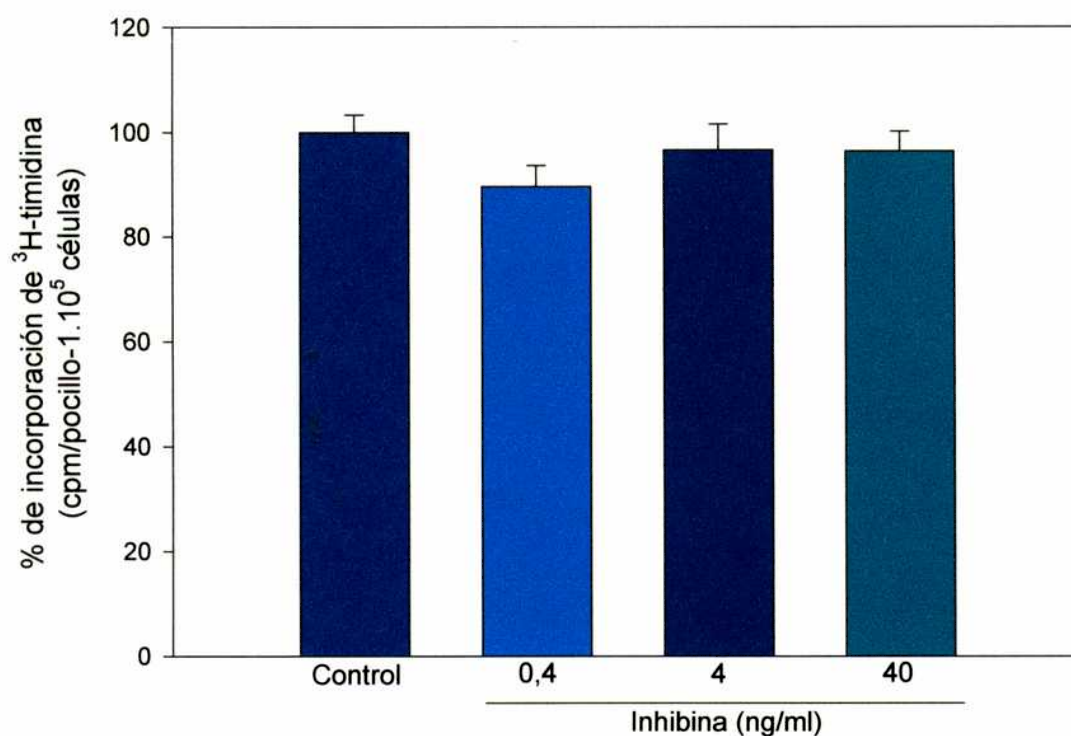


Figura 10. Porcentaje de incorporación de ³H-timidina en función de la concentración de inhibina A. Se cultivaron las células hipofisarias (5×10^4 células/pocillo) en ausencia: control y en presencia de distintas concentraciones de inhibina A (0,4; 4; 40 ng/ml. La ³H-timidina fue adicionada 1 día después del plaqueo y la placa cosechada 24 hs mas tarde. Los valores se expresan como la media $\pm$ ES de incubaciones por triplicado de 2 experimentos independientes, $p > 0.05$ por ANOVA.

DISCUSSION

1. EFECTO DE LA INHIBINA A Y LA ACTIVINA A SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA, INMADURAS Y MADURAS, DE RATA EN CULTIVO

Luego de comprobar la presencia de inhibinas en el MC proveniente de células de la granulosa-luteínicas humanas, se decidió continuar investigando el rol de esta glicoproteína en el proceso de foliculogénesis. Como ya se mencionó en los *Antecedentes*, al realizar un compendio de las evidencias encontradas en los estudios realizados hasta el momento, ya sea principalmente *in vitro*, en folículos aislados, en células de la granulosa, o en células tecales y ovocitos, notamos que todos contribuyen a sostener que la follistatina, las activinas y las inhibinas ejercen un efecto local en el ovario. Este efecto autócrino-parácrino influiría sobre la modulación del crecimiento folicular, la respuesta a gonadotrofinas, la esteroidogénesis, la maduración ovocitaria, la ovulación y la función del cuerpo lúteo (Knight y Glister, 2001).

De los experimentos realizados en rata que se presentan en esta segunda parte de la tesis, se observa que concentraciones fisiológicas de inhibina A producen un importante efecto inhibitorio de la proliferación en cultivos de células de la granulosa estimulados con FSH, TGF β y estradiol. Este efecto podría ser producido por una interferencia en el mecanismo de acción de alguno de estos factores estimuladores de la proliferación o por un aumento de la apoptosis. Si se tratase de un aumento en los niveles apoptóticos de estas células, no se debería excluir una disminución en el sistema de reparación del ADN, ya que se ha demostrado en el ovario que la caspasa-3 cliva la enzima de reparación del ADN, PARP (poly ADP- ribosa polimerasa), luego de la inducción de la apoptosis (Boone y Tsang, 1998).

Con respecto a la posible interferencia en el mecanismo de acción de alguno de estos tres factores, el más probable de sufrir este efecto o este proceso sería el TGF β por el hecho de pertenecer a la misma superfamilia de la inhibina. Como se mencionó anteriormente, la inhibina bloquearía la transducción de la señal de la activina uniéndose al betaglicano, antes conocido como receptor de tipo III del TGF β , a través de su subunidad α y al receptor de tipo II de la activina (ActRII) a través de su subunidad β . Otros estudios hechos con betaglicano indicaron que también podría actuar como un co-receptor del TGF β (Bernard y col., 2001). De esta forma la inhibina podría estar interfiriendo en el mecanismo de acción del TGF β , compitiendo por la unión al

betaglicano. Sin embargo hemos observado que una preincubación de 3 hs con TGF β no modifica el efecto de la inhibina (datos no mostrados).

En cambio cabe destacar que se observó que la inhibina A es producida *in vitro* por las células de la granulosa inmaduras y que su producción está estimulada por los tres factores: FSH, TGF β y estradiol. Esto concuerda con los estudios realizados por Lanuza y col. (1999) en el mismo tipo de cultivo, donde se evidencia que en condiciones experimentales estos tres factores son estímulos sumamente potentes para la producción de inhibina A (Findlay, 1993; Findlay y col., 2001; Lanuza y col., 1999). Sin embargo cuando se analiza la secreción de esta proteína en cultivo, se observa que a tiempos cortos, los niveles de inhibina A producidos por las células de la granulosa de rata son menores que los capaces de producir la inhibición de la proliferación: 3,2 ng/ml a las 24hs.

En contraposición, cuando estos cultivos son incubados con distintas concentraciones de activina, se observa un aumento de la proliferación celular, un efecto claramente antagónico al de la inhibina. Esta observación concuerda con otros estudios realizados con células de la granulosa obtenidas de ratas prepúberes tratadas con DES, las cuales ya poseen la capacidad de responder a FSH. Por ejemplo, en presencia de FSH, la activina aumenta la actividad de la aromatasa, la producción de estradiol, los sitios de unión a LH, la producción de progesterona y el número de receptores de FSH (Findlay, 1993). Además se suman a lo anterior estudios hechos en cultivos de folículos preantrales, provenientes de ratones prepúberes, que mostraron que la activina A produce un aumento en el diámetro folicular. Estas observaciones realizadas *in vitro* presentan a la activina como un regulador autocrino que promueve la foliculogénesis durante los estadios preantral y antral temprano del crecimiento folicular, ya que estos resultados fueron obtenidos de células de la granulosa indiferenciadas provenientes de ratas prepúberes tratadas con DES. Es conveniente destacar en este punto que los estudios hechos en diversos laboratorios con activina son, por cierto, mucho mas extensos que los hechos con inhibina.

Ahora bien, en cultivos de células de la granulosa maduras, obtenidas de ratas tratadas con PMSG, la inhibina no tiene efecto sobre la proliferación, mientras que la activina sí. Este hecho otorga fundamento a la segunda hipótesis derivada, donde se

plantea que la inhibina producida por las células de la granulosa del folículo dominante actúa como un factor paracrino inhibiendo el crecimiento de folículos subordinados de la cohorte en progresión.

Pero al respecto debemos añadir que la inhibina secretada por el folículo dominante no impide su propio crecimiento. Entonces cabe preguntar, ¿por qué ocurre esto?, ¿es que acaso existe algún factor protector que previene este efecto? o ¿es que existe una diferencia en el número o en la funcionalidad de los receptores?. Lamentablemente con la poca información disponible respecto de la identidad de los receptores de inhibina y la transducción de la señal, no se puede dar respuesta a los interrogantes planteados. Sin embargo podemos especular acerca de posibles factores que protejan al folículo dominante de la acción antiproliferativa de la inhibina. Uno de los factores que surgió como probable candidato fue el estradiol. Sin embargo estudios preliminares hechos en cultivos de células de la granulosa inmaduras realizados en esta investigación mostraron que no habría diferencias en la inhibición de la proliferación con inhibina cuando se usan distintas concentraciones de estradiol.

El desarrollo y el crecimiento folicular en los mamíferos esta íntimamente relacionado con las variaciones en la expresión y con la regulación de las enzimas esteroidogénicas ováricas. Como se sabe las gonadotrofinas tienen un rol principal en estos procesos y se encuentran moduladas por varias hormonas como los andrógenos, los estrógenos y una gran variedad de factores de crecimiento. En los últimos años han surgido muchos trabajos que demuestran una acción local, autocrina/paracrina, de la activina, la inhibina y la folistatina en la esteroidogénesis ovárica. Cabe mencionar que el rol de la inhibina como un regulador ovárico autocrino/paracrino es objeto de controversias. Existe un trabajo donde se muestra un efecto inhibitorio de la inhibina en la actividad de la aromatasa P450 y en la producción de estrógenos en cultivos de células de la granulosa de rata (Ying y col., 1986). Sin embargo estos resultados no han sido confirmados hasta la fecha (Hutchinson y col., 1987; Miro y col., 1991; Miro y Hillier, 1992; Sugino y col., 1988). Dentro de estos trabajos podemos citar el de Ghersevich y col. (2000) donde se muestra que con concentraciones de hasta 100 ng/ml, no hay ningún efecto de la inhibina sobre la actividad de la 17HSD de tipo I basal o estimulada con AMPc, ni sobre los niveles de su ARNm o sobre la expresión del ARNm de la aromatasa P450 en células de la granulosa obtenidas de ratas prepúberes

tratadas con DES. Por su parte, los resultados de la investigación que se presentan en esta tesis muestran que la inhibina no tiene efecto alguno en la producción de progesterona o estradiol en cultivos de células de la granulosa inmadura de rata. Todas estas observaciones apoyan la suposición de que la inhibina no ejerza ningún efecto en la esteroidogénesis de células de la granulosa no luteinizadas.

Pero cabe señalar que por otra parte existen trabajos donde se muestra que la inhibina tiene un potente efecto estimulador en la producción de andrógenos inducido por LH en las células tecaales humanas y de rata pero no en bovinos, un efecto que sería atenuado por la activina (Hsueh y col., 1987). Si esto se confirmara *in vivo*, la inhibina incrementaría el suministro de andrógenos, o sea el sustrato para la producción de estrógenos, lo cual sería particularmente interesante para aquellos folículos estrogénicos, ya que asumirían la dominancia. A medida que el folículo dominante emerge, el incremento en la producción de inhibina y estradiol-17 β disminuye la secreción de FSH y de esta forma se restringe el crecimiento de los folículos antrales no dominantes. El folículo dominante podría sobrevivir a este decremento en el suministro de FSH por la acción local de factores como el IGF-1, EGF y FGF, los cuales sensibilizarían a las células foliculares frente a la estimulación con gonadotrofinas, compensando de esta forma el decremento de FSH. Por su parte, los folículos no dominantes no poseerían estos mecanismos y por lo tanto estarían destinados a la atresia (Findlay, 1993).

Por otro lado es de destacar que la activina sí posee un rol activo en la esteroidogénesis ovárica. Por ejemplo la activina sola o en presencia de AMPc regula positivamente la actividad de la 17HSD y la expresión del ARNm de la 17HSD y de la aromatasas P450 en cultivos de células de la granulosa inmadura de rata (Ghersevich y col., 2000). Además la activina A aumenta la producción de estradiol en cultivos de células de la granulosa provenientes de folículos antrales de oveja y de rata (Miro y col., 1991; Shidaifat y col., 2001). Por su parte Li y col (1995) y Miro y Hillier (1996) observaron un aumento de la proliferación inducido por la activina en cultivos de células de la granulosa provenientes de folículos, tanto pequeños como grandes, de rata. Todas estas observaciones están de acuerdo con el aumento en la incorporación de ^3H -timidina que se muestra en los cultivos de ratas tratadas tanto con DES como con PMSG (*Figura 8 y 10 de Resultados*). Al analizar los anteriores estudios en su conjunto

se puede concluir que la activina es uno de los principales factores reguladores de la foliculogénesis. La función de esta glicoproteína es la de promover un microambiente estrogénico el cual está asociado con la diferenciación de células de la granulosa y el crecimiento folicular.

Como conclusión podemos decir que las inhibinas, las activinas, el IGF-1 y sus proteínas de unión, tienen un efecto directo e indirecto en las células de la granulosa y teca modulando el desarrollo folicular y la esteroidogénesis (Roche, 1996). Es por esto que sobre la base de los resultados mostrados hasta el momento en esta tesis y a la bibliografía es que se sugiere que la inhibina producida por el folículo dominante, podría actuar como un factor paracrino inhibiendo el crecimiento de folículos vecinos modulando de esta forma el mecanismo de selección folicular.

CAPITULO III

RESULTADOS

1. ENSAYOS *IN VIVO*

En los experimentos realizados hasta el momento se observó que la inhibina A ejerce un efecto inhibitorio sobre la proliferación de células de la granulosa inmaduras, provenientes de ratas estimuladas con DES. Mientras que no tiene efecto alguno sobre la proliferación de células de la granulosa maduras, provenientes de ratas tratadas con PMSG. Sobre la base de estas observaciones se decidió evaluar en estos mismos modelos, el efecto de la inhibina A sobre el desarrollo folicular y la apoptosis *in vivo*. Para la realización de estos ensayos se utilizó un modelo de inyección intraovárica de inhibina, como se describe en la sección *Materiales y Métodos*.

1.1 Efecto *in vivo* de la inhibina A sobre el desarrollo folicular y la apoptosis en ratas tratadas con DES

La histología ovárica que se observa en la *Figuras 11*, muestra un efecto inhibitorio de esta proteína sobre el desarrollo folicular inducido por DES. En los ovarios que fueron inyectados con inhibina se observó un aumento significativo, en el número de folículos preantrales (FP). Asimismo en los ovarios control el número de folículos por sección de ovario fue de $4,1 \pm 0,4$; mientras que en los tratados con inhibina ese número ascendió a $7,5 \pm 1,1$ ($p < 0.05$). En contraposición, en los ovarios inyectados con inhibina el número de folículos antrales tempranos (FAT) disminuyó con respecto al control de $48,3 \pm 1,9$ a $39,3 \pm 2,3$ ($p < 0.05$) (ver *Figura 13 A*). Este evento indicaría que la inhibina produce un retraso en el desarrollo folicular, impidiendo que los folículos preantrales avancen en su desarrollo al estadio antral temprano. Cabe señalar que el número de folículos sanos en ambos tipos foliculares (FP + FAT) fue similar en los ovarios control (97,6%) y en los ovarios inyectados con inhibina (96,9%).

Ahora bien, para estudiar si estos cambios observados en la inhibición del crecimiento inducido por el tratamiento con inhibina estaban mediados por fenómenos apoptóticos, se midió el grado de apoptosis mediante la técnica de TUNEL. Se observó que la inhibina produce un aumento de 3 y 4 veces en el porcentaje de células apoptóticas de FP y FAT, respectivamente (Control = FP: $0,11 \pm 0,06$; FAT: $0,41 \pm 0,08$; Inhibina = FP: $0,33 \pm 0,08$; FAT $1,62 \pm 0,2$) (ver *Figuras 12 y 13B*). Hay que señalar que en los folículos estudiados la apoptosis se limitó principalmente a las células de la granulosa. Solo se observó marca en algunas células de la teca dispersas.

Con el fin de complementar los estudios hechos con TUNEL se evaluaron en estos mismos cortes, teñidos con hematoxilina-eosina, los criterios morfológicos característicos de la apoptosis. En la *Figura 14* se observa a un FAT proveniente de un ovario tratado con inhibina en el estadio II de la atresia. Este estadio se caracteriza por la presencia de núcleos picnóticos en células de la granulosa periantrales (10-30%) y restos celulares en la cavidad antral. De la cuantificación de las células presentando dichos criterios morfológicos surge la *Figura 15*. En este gráfico se observa nuevamente un aumento en el porcentaje de células apoptóticas en FP (Control: $6,9 \pm 0,5$; Inhibina: $9,2 \pm 0,4$) y en FAT (Control: $11,45 \pm 0,74$; Inhibina: $18,7 \pm 0,5$). Estos resultados sugieren que el efecto de la inhibina en el reclutamiento o la atresia folicular estaría mediado por la apoptosis.

Dado que ambos métodos son utilizados para determinar la muerte celular se los comparó para evaluar el grado de apoptosis detectado por cada uno. Como se observa en la *Figura 16* existe una correlación entre los niveles de apoptosis encontrados con la técnica TUNEL y en los hallados en los cortes teñidos con hematoxilina-eosina. No obstante se visualiza que el análisis de los criterios morfológicos es un método mucho más sensible a la hora de determinar células apoptóticas. Por ejemplo en este caso, el número de células apoptóticas encontradas es 10 veces superior.

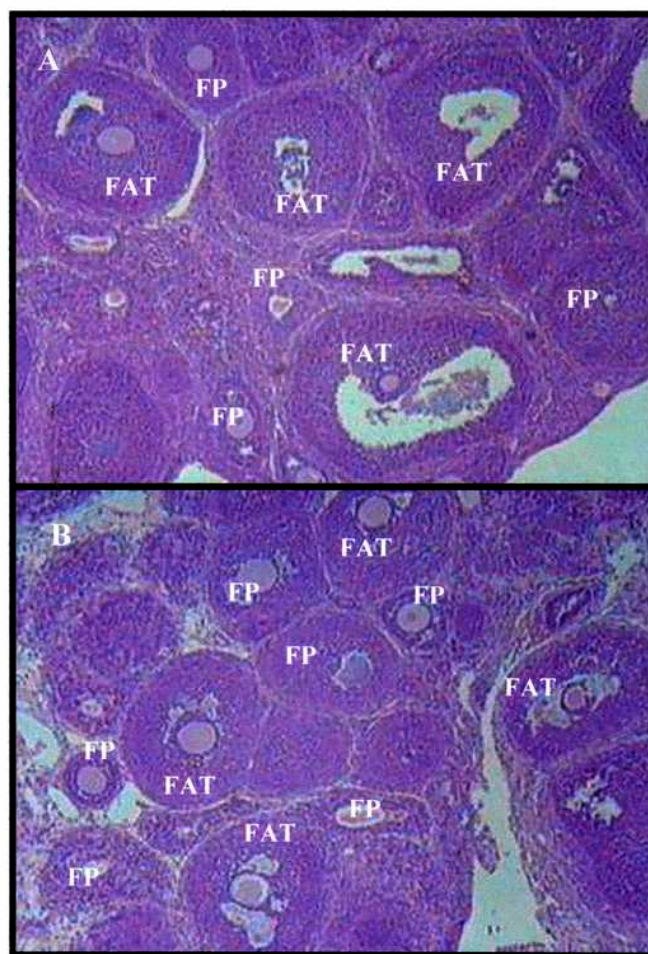


Figura 11. Fotomicrografía de secciones ováricas teñidos con hematoxilina-eosina provenientes de ratas estimuladas con DES e inyectadas intrabursa con vehículo (control) o con inhibina (0,5 $\mu\text{g}/\text{ovario}$). **A.** Ovarios control. **B.** Ovarios inyectados con inhibina. Nótese la presencia de mayor cantidad de folículos preantrales con respecto al control. FAT: folículo antral temprano; FP: folículo preantral. Aumento: 40X.

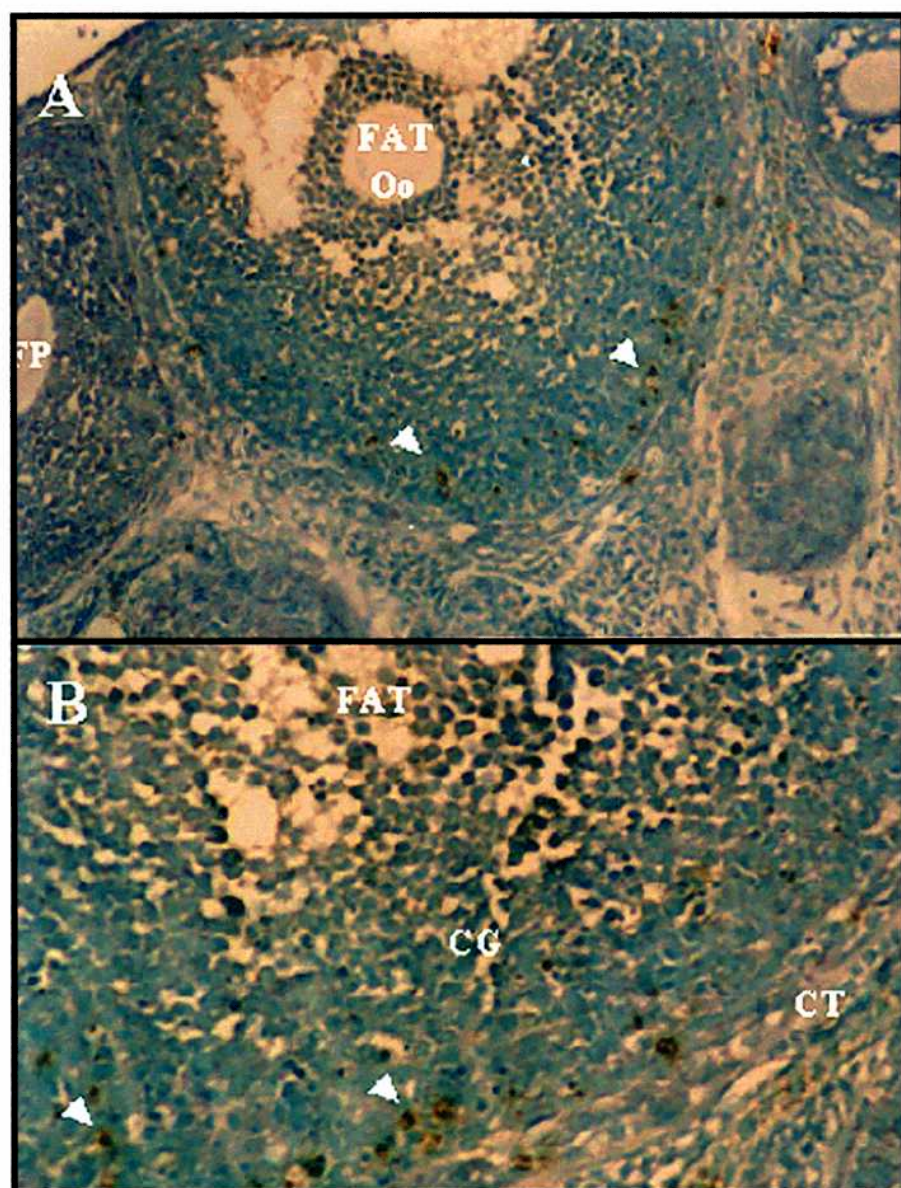


Figura 12. Microfotografía de secciones ováricas provenientes de ratas estimuladas con DES e inyectadas intrabursa con vehículo (control) o con inhibina (0,5 $\mu\text{g}/\text{ovario}$). La apoptosis se determinó utilizando la técnica de TUNEL. Nótese la presencia de células teñidas positivamente señaladas por las flechas. Las secciones de ovario procesadas sin la enzima transferasa terminal y por lo tanto sin reacción colorimétrica fueron consideradas como control. FAT: folículo antral temprano, FP: folículos preantral, Oo: ovocito; CG: célula de la granulosa; CT: célula de la teca. A: 100X, B: 200X.

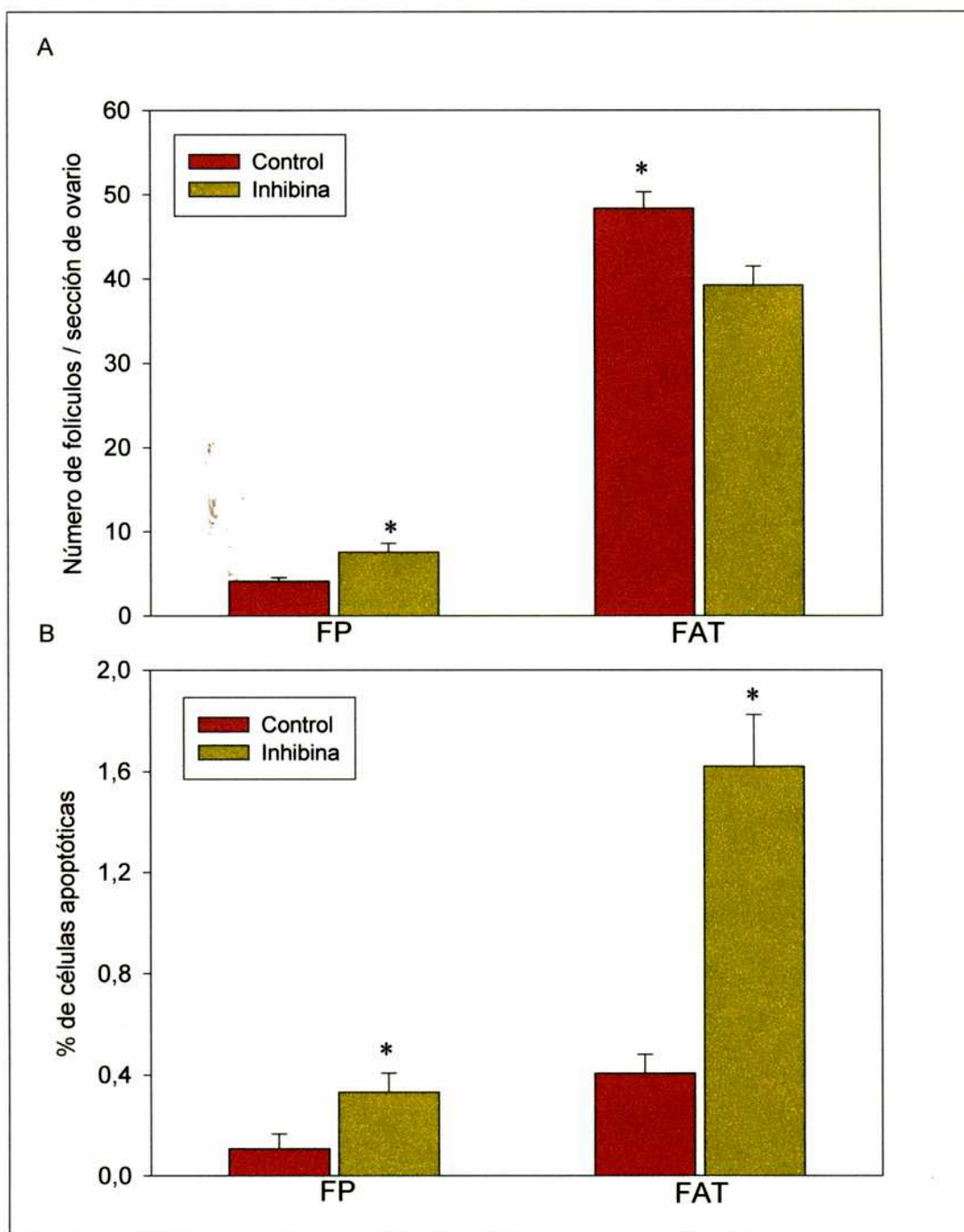


Figura 13. Efecto *in vivo* de la inhibina sobre el número de folículos y el % de células apoptóticas en FP y FAT en cortes de ovarios provenientes de ratas estimuladas con DES. Control: ovario inyectado con vehículo; Inhibina ovario inyectado con inhibina (0,5 µg/ovario). **A.** Los valores se expresan como la media del número de folículos por corte de ovario ± ES. El ANOVA mostró diferencias significativas entre los ovarios control y los tratados con inhibina en FP y FAT ($p < 0,05$). **B.** Análisis de la fragmentación apoptótica del ADN (técnica TUNEL) observada en la Figura 12. Los valores se expresan como la media del porcentaje de células apoptóticas por campo ± ES. El ANOVA mostró diferencias significativas entre los ovarios control y los tratados con inhibina en FAT ($p < 0,05$). El número de células apoptóticas se determinó contando las células marcadas a 400X, en distintos campos seleccionados aleatoriamente. FP: folículo preantral; FAT: folículo antral.

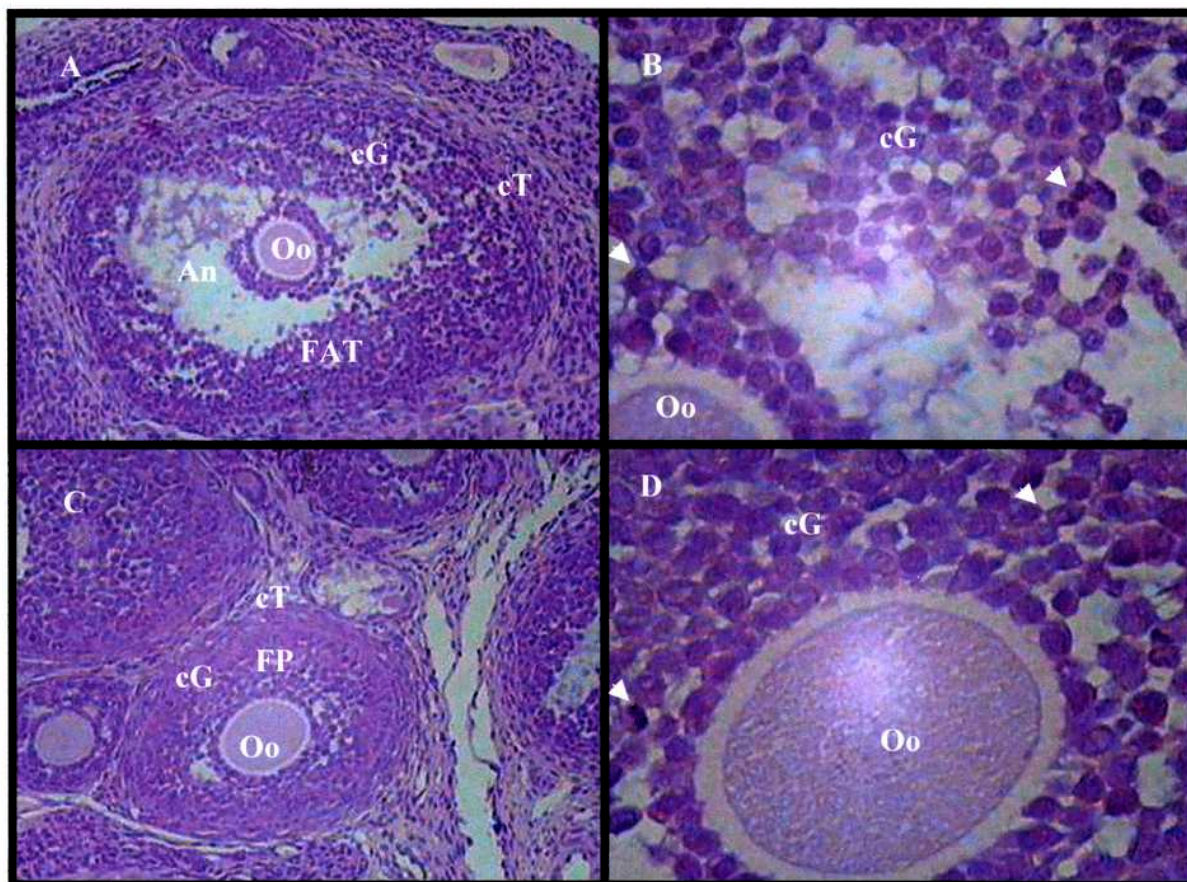


Figura 14. Fotomicrografía de secciones ováricas provenientes de ratas estimuladas con DES e inyectadas intrabursa con inhibina ($0,5 \mu\text{g}/\text{ovario}$). Se evaluó la apoptosis celular utilizando los criterios morfológicos característicos: formación de cuerpos apoptóticos, condensación y marginación de la cromatina. Nótese la presencia de células teñidas positivamente señaladas por las flechas en el panel B y D. FP: folículos preantrales, FAT: folículos antrales temprano, Oo: ovocito; cG: células de la granulosa; cT: célula de la teca, An: antro *A* y *C*: 100X, *B* y *D*: 400X.

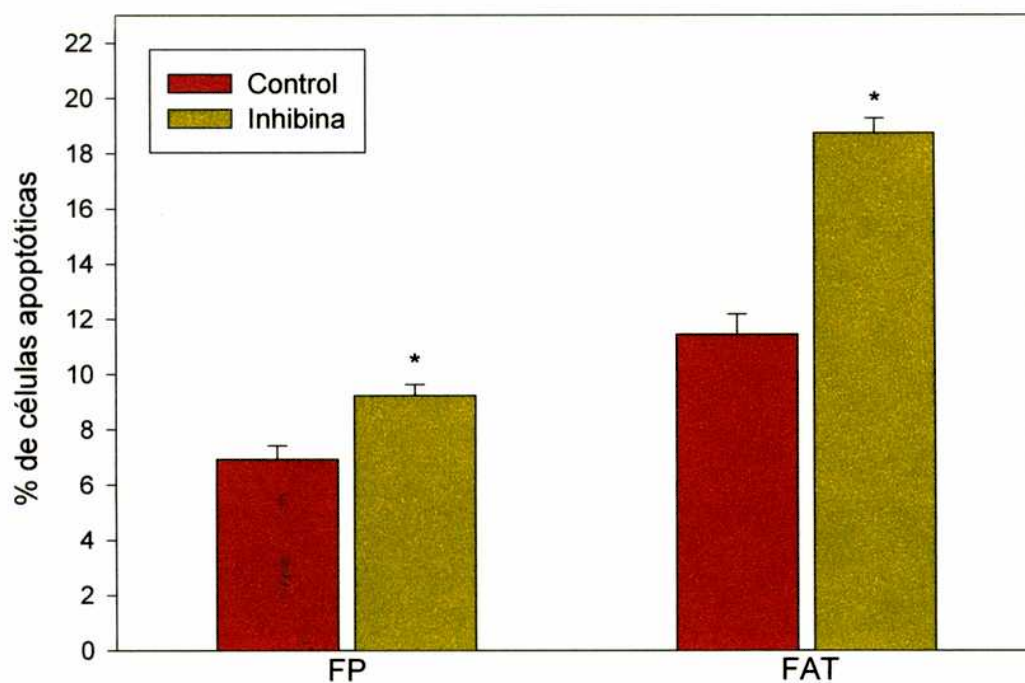


Figura 15. Efecto *in vivo* de la inhibina sobre el % de células apoptóticas en FP y FAT en cortes de ovarios teñidos con hematoxilina-eosina provenientes de ratas estimuladas con DES. Control: ovario inyectado con vehículo; Inhibina ovario inyectado con inhibina (0,5 µg/ovario). Los valores se expresan como la media ± ES. El test t no pareado mostró diferencias significativas entre los ovarios control y los tratados con inhibina ($p < 0,05$). El porcentaje de células apoptóticas se determinó contando las células marcadas a 400X, en distintos campos seleccionados aleatoriamente. FP: folículo preantral; FAT: folículo antral.

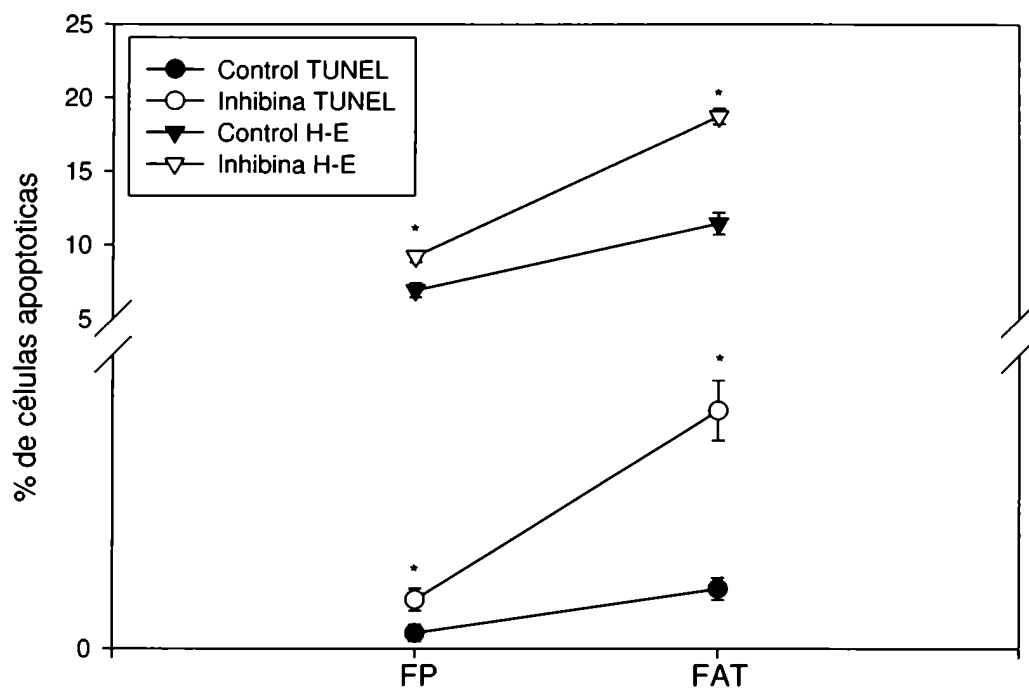


Figura 16. Porcentaje de células apoptóticas vs. tipo de folículo medido por la técnica TUNEL y por criterios morfológicos mediante una tinción con hematoxilina-eosina en cortes de ovario provenientes de ratas estimuladas con DES, Control: ovario inyectado con vehículo; Inhibina ovario inyectado con inhibina (0,5 $\mu\text{g}/\text{ovario}$). Los valores se expresan como la media del porcentaje de células apoptóticas por campo $\pm$ ES. El test t no pareado mostró diferencias significativas entre los ovarios control y los tratados con inhibina en FP y en FAT (* $p < 0,05$) por ambos métodos. El porcentaje de células apoptóticas se determinó contando las células marcadas a 400X, en distintos campos seleccionados aleatoriamente.

1.2 Efecto *in vivo* de la inhibina A sobre la expresión de proteínas pro y antiapoptóticas en ratas tratadas con DES

Como se sabe, existen proteínas relacionadas con el gen *bcl-2* (Bcl-2, Bax) que son importantes reguladores de la apoptosis ovárica (Davis y Rueda, 2002; Tilly y col., 1995). Con el fin de correlacionar la fragmentación del ADN obtenida por inmunocitoquímica, inducida por la inhibina, con la expresión de proteínas pro y/o antiapoptóticas, se propuso estudiar a los miembros de la familia de Bcl-2.

A partir de cortes de los mismos ovarios utilizados para determinar la apoptosis, se evaluó por inmunocitoquímica la tinción positiva para Bax y Bcl-2. Como se observa en la *Figura 17* existe una alta señal positiva para Bax en las células de la granulosa de FP y FAT. Esta marca es mucho mas abundante en las células de la granulosa periantrales de los ovarios que fueron expuestos a la inhibina, mientras que en las células tecales la marca se encuentra en algunas células dispersas. En forma opuesta se observa que la marca para Bcl-2 se hace más intensa en las células de la granulosa de FP y FAT de ovarios control y su localización no sigue un patrón definido (ver *Figura 18*). Cabe destacar que se observa marca en las células de la teca de ambos tipos foliculares, tanto en ovarios control como tratados. De la cuantificación de las marcas observadas en las células de la granulosa (ver *Figura 19*) se deduce que en los ovarios tratados con inhibina, ambos tipos foliculares presentan un aumento de la inmunoreacción para la proteína proapoptótica Bax y una disminución de la proteína antiapoptótica Bcl-2. Los FP que fueron expuestos a inhibina muestran un incremento en la marca para Bax del 80% y una disminución del 67% para Bcl-2 con respecto al control. Por otra parte los FAT que fueron expuestos a inhibina muestran un incremento en la marca para Bax del 130% y una disminución del 77% para Bcl-2 con respecto al control. Esto se puede visualizar mejor aún analizando la relación entre Bax/Bcl-2, donde un valor mayor que 1, estaría indicando una tendencia por parte de esa célula a ir a la apoptosis, mientras que un valor menor que 1 estaría indicando una tendencia a la supervivencia. De esta forma, como se observa en la *Tabla 4*, ambos tipos foliculares provenientes de ovarios que fueron expuestos a la inhibina, muestran una tendencia a conducirse a la apoptosis y esta tendencia es más marcada en los FAT.

Tabla 4. Relación Bax/Bcl-2 en folículos preantrales y folículos antrales tempranos provenientes de ovarios control y los tratados con inhibina.

TRATAMIENTO	TIPO DE FOLÍCULO	
	FP	FAT
CONTROL	0,9	5,9
INHIBINA	0,85	9,5

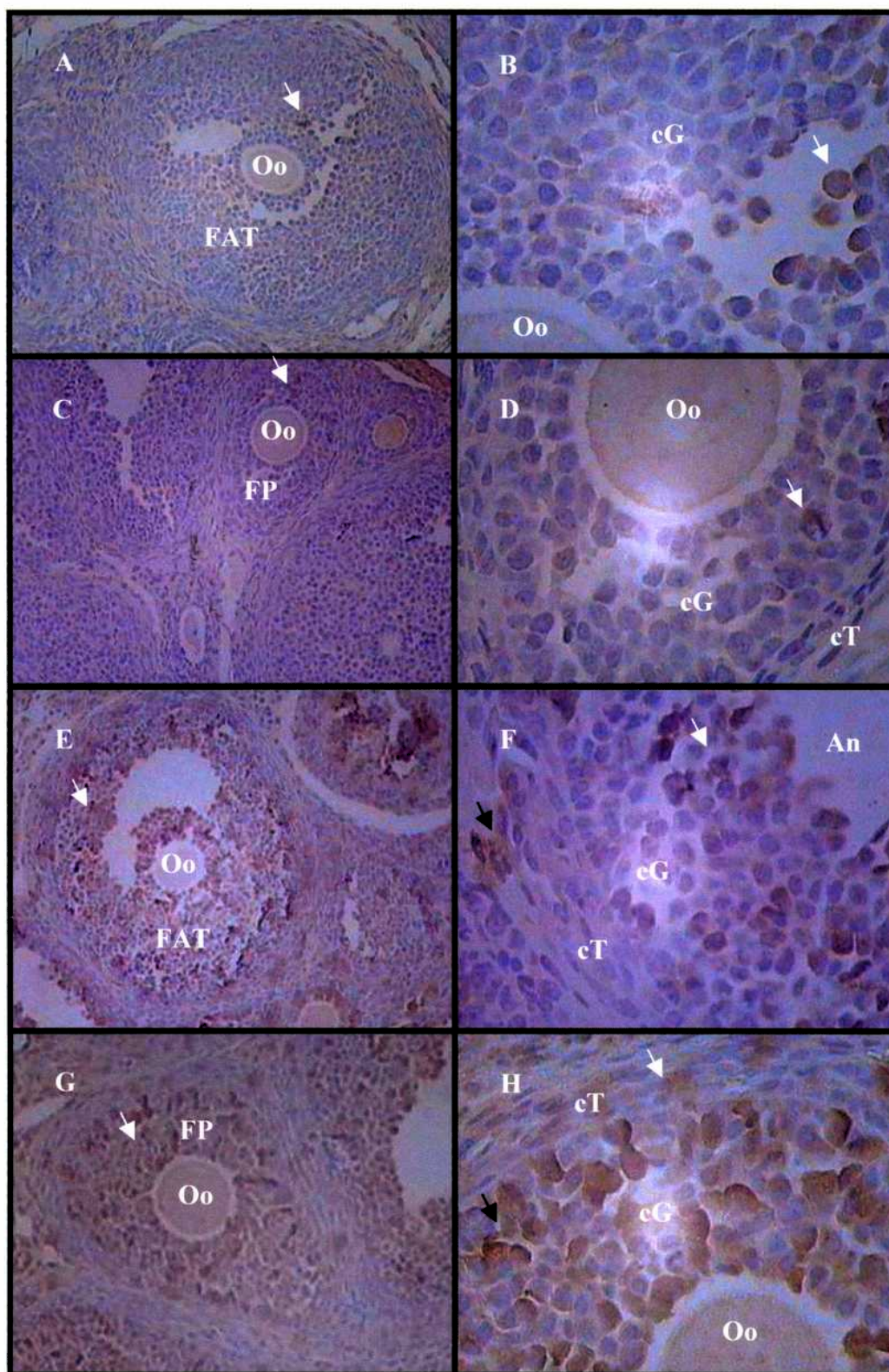


Figura 17. Fotomicrografía de secciones ováricas provenientes de ratas estimuladas con DES e inyectadas intrabursa con vehículo (control) o con inhibina (0,5 mg/ovario). **A, B, C y D.** Ovarios control, se observa una marca positiva para Bax (flecha blanca) en las células de la granulosa periantrales de FP y FAT. **E, F, G y H.** Ovarios inyectados con inhibina, se observa una marca positiva para Bax (flecha blanca) en las células de la granulosa de FP y FAT y algunas células de la teca (flecha negra), panel F y H. FP: folículos preantrales, FAT: folículos antrales temprano, Oo: ovocito; cG: células de la granulosa; cT: célula de la teca, An: antro. **A, C, E y G:** 100X, **B, D, F y H:** 400X.

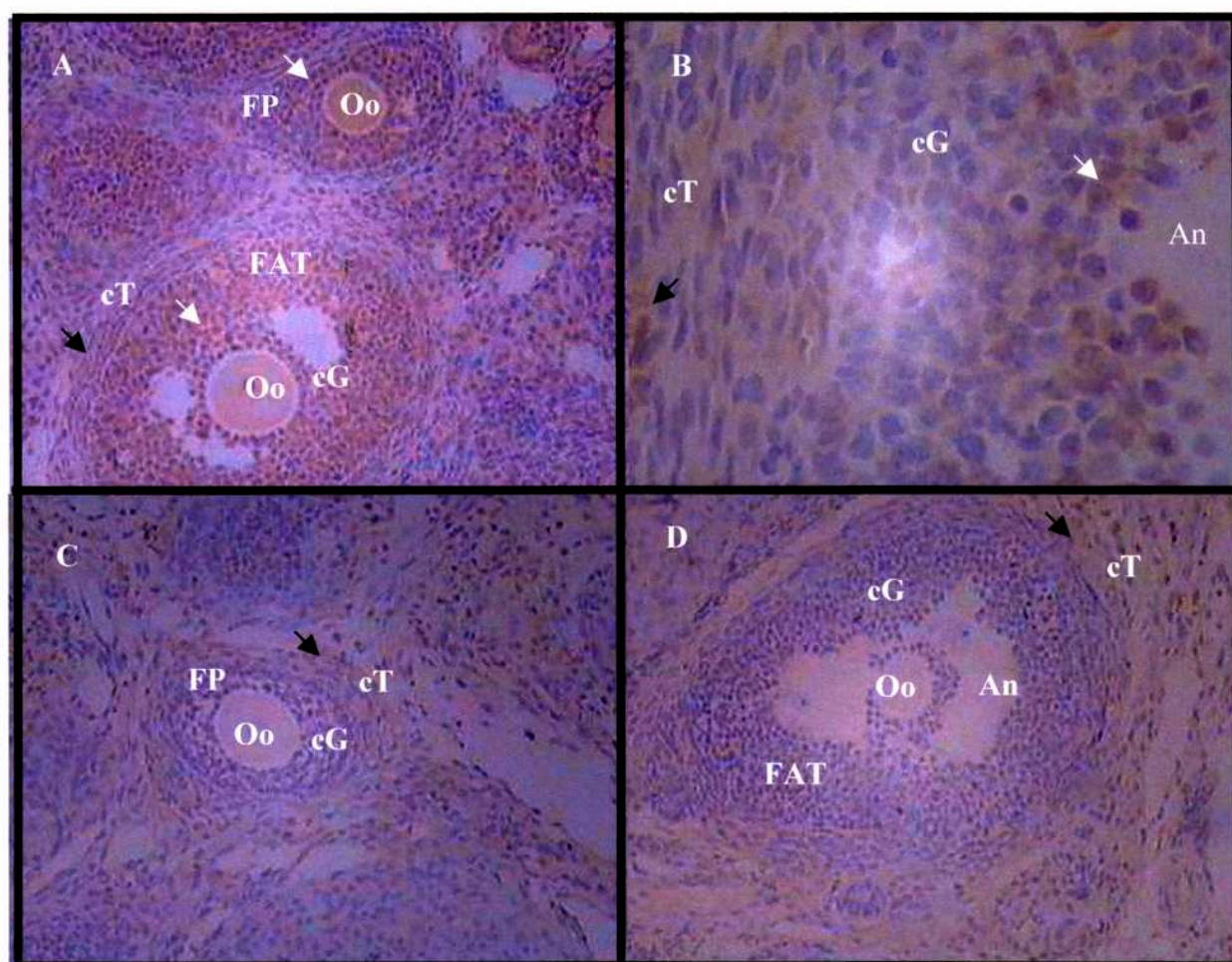


Figura 18. Microfotografía de secciones ováricas provenientes de ratas estimuladas con DES e inyectadas intrabursa con vehículo (control) o con inhibina (0,5 $\mu\text{g}/\text{ovario}$). **A** y **B**. Ovarios control: se observa una marca positiva para Bcl-2 en las células de la granulosa (flecha blanca) y de la teca (flecha negra) de FP y FAT. **C** y **D**. Ovarios inyectados con inhibina: se observa una marca postiva para Bcl-2 en las células de la teca (flecha negra) de FP y FAT. FP: folículos preantrales, FAT: folículos antrales temprano, Oo: ovocito; cG: células de la granulosa; cT: célula de la teca, An: antro. **A**, **C** y **D** 100X, **B** 400X

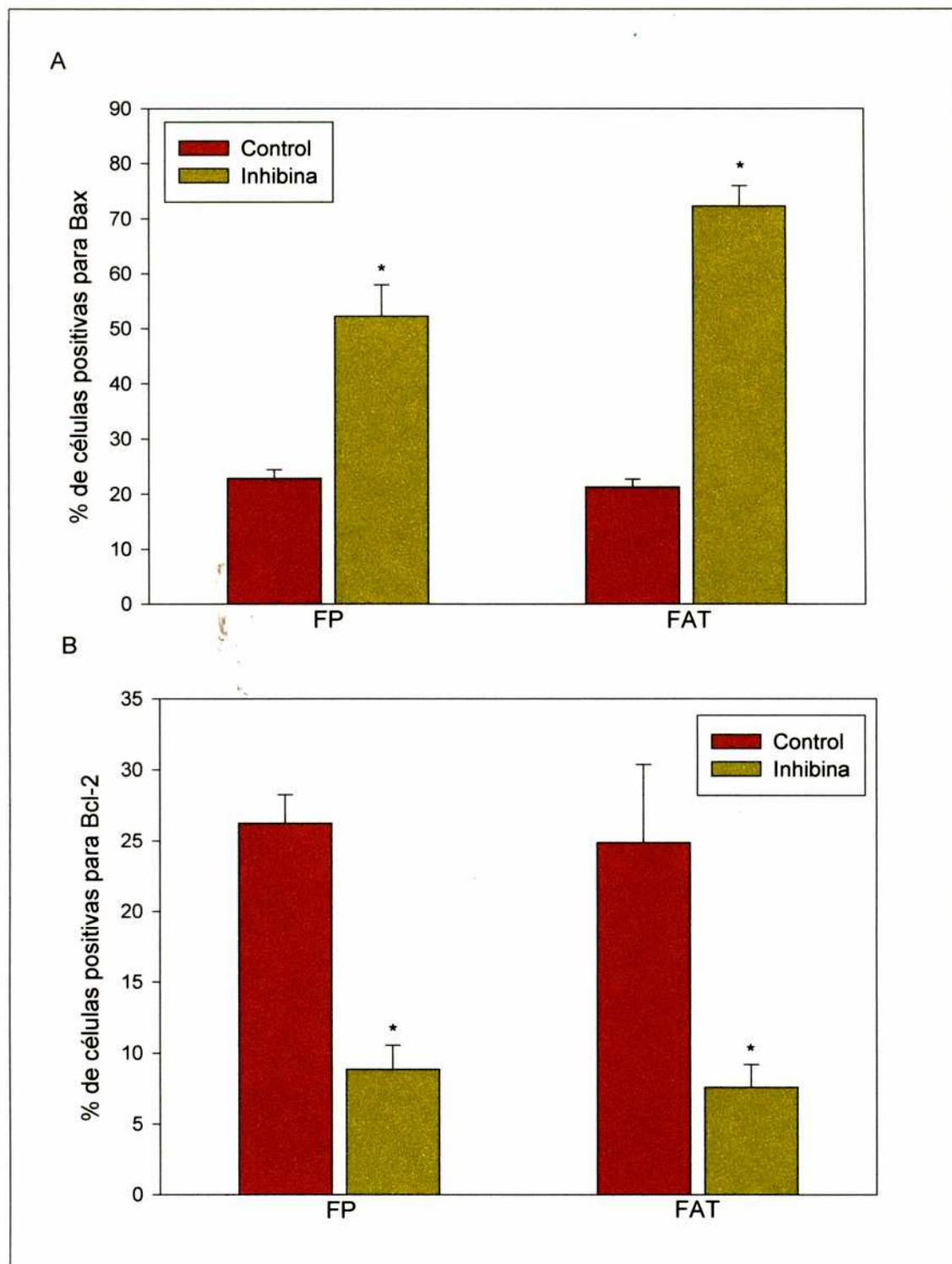


Figura 19. Efecto *in vivo* de la inhibina sobre la expresión de proteínas proapoptóticas (Bax) y antiapoptóticas (Bcl-2) en FP y FAT en cortes de ovarios provenientes de ratas estimuladas con DES. Control: ovario inyectado con vehículo; Inhibina ovario inyectado con inhibina (0,5 µg/ovario). **A.** Los valores se expresan como la media del % de células positivas para Bax ± ES. Se encontraron diferencias significativas entre los ovarios control y los tratados con inhibina en FP y FAT por test t no pareado, * $p < 0,05$. **B.** Los valores se expresan como la media del % de células positivas para Bcl-2 ± ES. Se encontraron diferencias significativas entre los ovarios control y los tratados con inhibina en FP y FAT por test t no pareado, * $p < 0,05$. FP: folículo preantral; FAT: folículo antral.

1.3 Efecto *in vivo* de la inhibina A sobre el desarrollo folicular y la apoptosis en ratas tratadas con PMSG

Luego de haber observado que el análisis de los criterios morfológicos es un método mucho más sensible que TUNEL a la hora de determinar células apoptóticas, se utilizó este método para determinar los niveles de fragmentación del ADN en cortes de ovarios inyectados con inhibina provenientes de ratas tratadas con PMSG.

La histología ovárica que se observa en la *Figura 20 y 21A* muestra un efecto de esta proteína sobre el desarrollo folicular inducido por PMSG. En los ovarios que fueron inyectados con inhibina se observó, con respecto al control, un aumento ($p < 0,05$) en el número de FP de 1,4 veces y una disminución en el número de FAT, aunque esta disminución no fue significativa. Mientras que el número de FPO no se modificó. Este evento indicaría que la inhibina produce un retraso en el desarrollo folicular, impidiendo que los folículos preantrales avancen en su desarrollo al estadio antral temprano.

Ahora bien, para estudiar si fenómenos apoptóticos están involucrados en estos cambios observados en el crecimiento folicular, se evaluó la atresia en estos mismos cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina (ver *Figura 20 y 21B*). Se observó que la inhibina produce una disminución en el porcentaje de células apoptóticas de FPO ($p < 0,05$, Control: $9,6 \pm 0,4$; Inhibina: $7,1 \pm 0,4$), FAT ($p < 0,05$, Control: $9,2 \pm 0,4$; Inhibina: $6,7 \pm 0,4$) y FP ($p > 0,05$, Control: $7,8 \pm 0,6$; Inhibina: $6,5 \pm 0,5$).

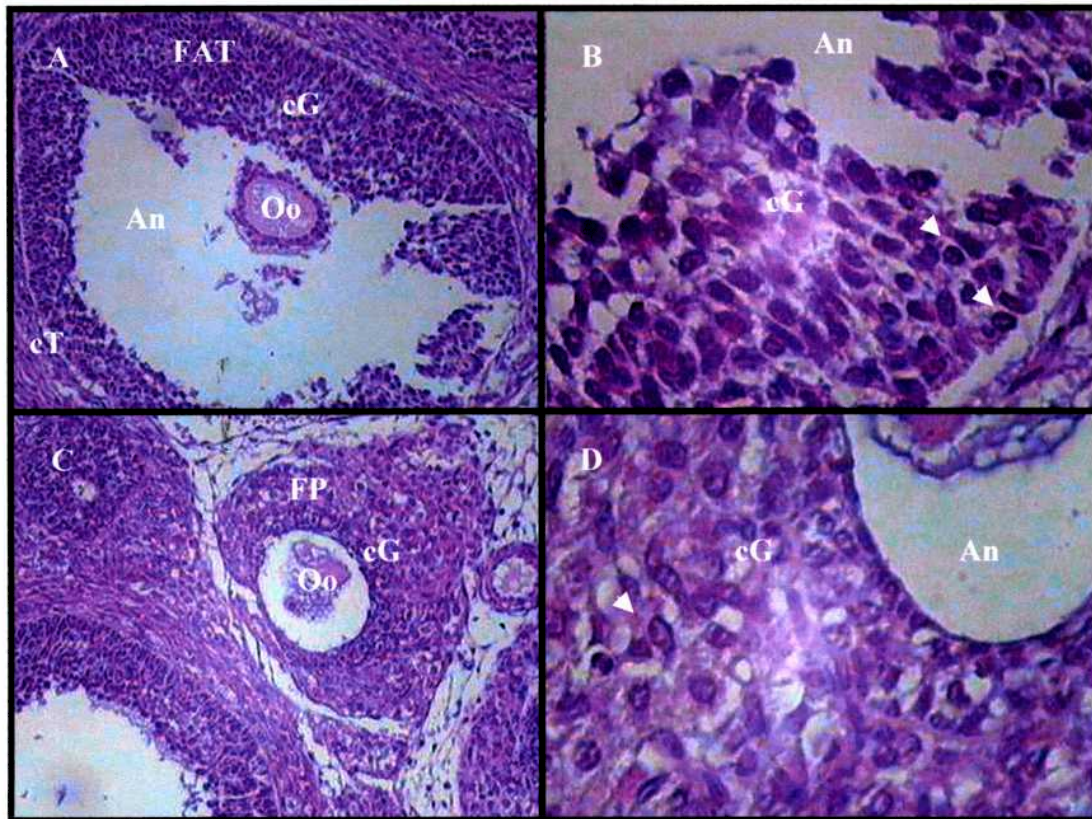


Figura 20. Fotomicrografía de secciones ováricas teñidas con hematoxilina-eosina provenientes de ratas estimuladas con PMSG e inyectadas intrabursa con inhibina (0,5 μ g/ovario). **A, B, C y D.** Nótese la marginación de la cromatina en las células de la granulosa apoptóticas tanto de FP como de FAT (flecha, panel B y D). FP: folículos preantrales, FAT: folículos antrales temprano, Oo: ovocito; cG: células de la granulosa; cT: célula de la teca, An: antro **A** y **C**: 100X, **B** y **D**: 400X.

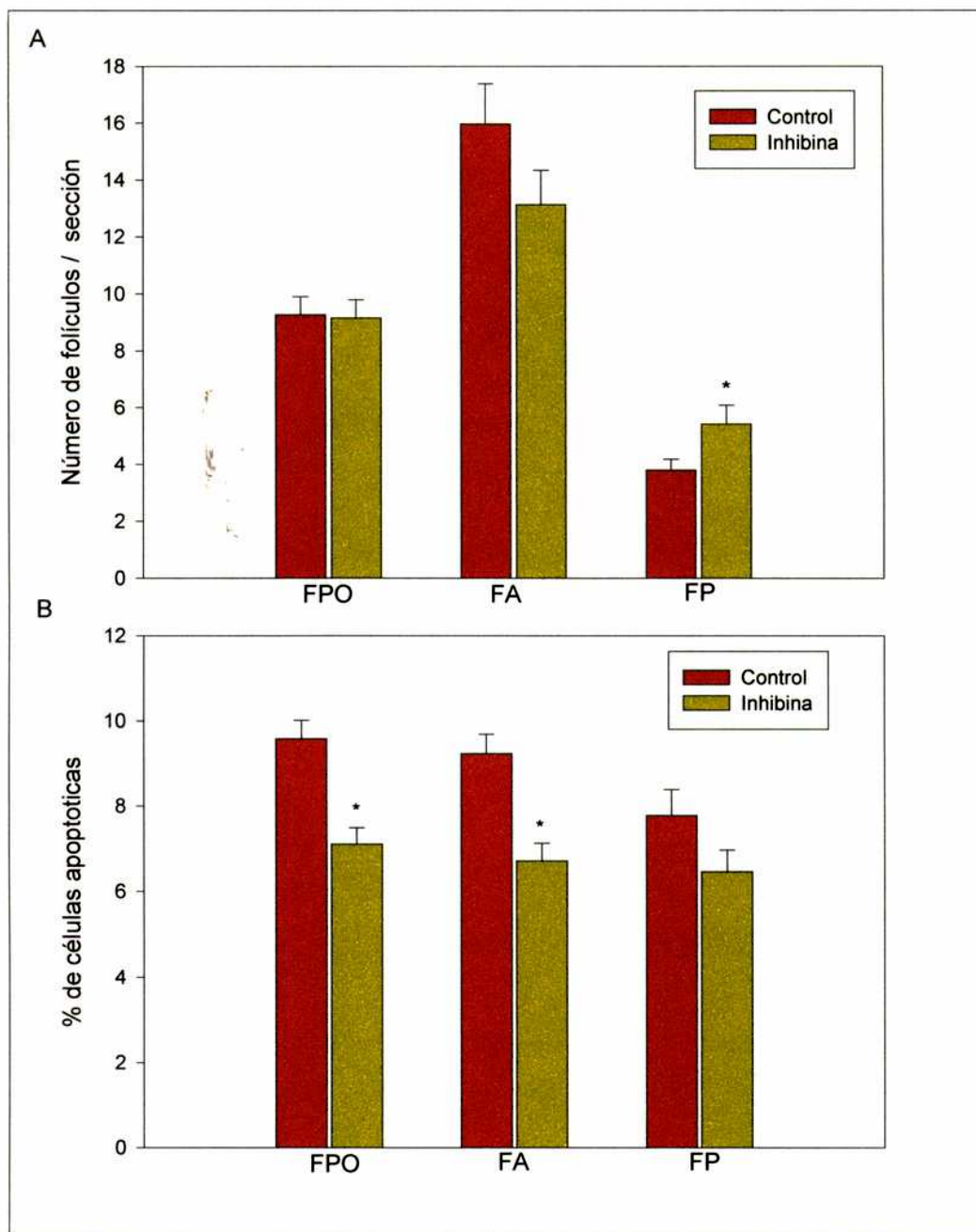


Figura 21. Efecto *in vivo* de la inhibina sobre el número de folículos y el % de células apoptóticas en FP y FAT en cortes de ovarios provenientes de ratas estimuladas con PMSG. Control: ovario inyectado con vehículo; Inhibina ovario inyectado con inhibina (0,5 µg/ovario). **A.** Los valores se expresan como la media del número de folículos por corte de ovario ± ES. El test t no pareado solo mostró diferencias significativas entre los FP tratados con inhibina y su control ($p < 0,05$). **B.** Los valores se expresan como la media porcentaje del número de células apoptóticas por campo ± ES. El número de células apoptóticas se determinó contando las células marcadas a 400X, en distintos campos seleccionados aleatoriamente. El análisis del test t no pareado mostró diferencias significativas entre los FPO y los FAT tratados con inhibina y su control ($p < 0,05$). FPO: folículo preovulatorio; FA: folículo antral; FP: folículo preantral.

2. ENSAYOS *IN VITRO*

2.1 Efecto *in vitro* de la inhibina A sobre la apoptosis en folículos antrales tempranos provenientes de ratas tratadas con DES

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo* se continuó con estudios *in vitro* utilizando cultivos de folículos. Para ello se aislaron mecánicamente bajo la lupa folículos antrales tempranos provenientes de ratas tratadas con DES y se los cultivó en presencia y en ausencia de inhibina A.

El cultivo de folículos representa un buen modelo para estudiar la acción de factores hormonales y los mecanismos que regulan la atresia folicular, ya que tiene la ventaja de conservar la integridad del folículo y por lo tanto la de mantener intacta la comunicación paracrina entre las células de la granulosa y las células de la teca.

2.1.1 Cuantificación de la apoptosis por electroforesis en geles de agarosa

Para evaluar la activación de la apoptosis folicular inducida por la inhibina A, se realizaron cultivos de FAT en medio libre de suero con diferentes concentraciones de la hormona (4 y 40 ng/ml), durante 24 hs. Luego de la incubación, se extrajo el ADN de dichos folículos y se realizó un electroforesis en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Los resultados mostraron que los folículos que fueron incubados 24 hs en medio libre de suero presentaban una fragmentación espontánea del ADN (calle 4). Estos niveles de fragmentación apoptótica fueron considerados como el control y designados arbitrariamente como el 100%. En contraposición la degradación del ADN fue mínima en aquellos folículos que no fueron incubados (control 0 hs, calle 3) (ver *Figura 22*). El análisis densitométrico de estos geles mostró un aumento significativo ($p < 0.05$) en el patrón típico de degradación del ADN en los folículos que fueron incubados con inhibina en comparación con el control 24 hs. Cuando los folículos fueron incubados con 4 ng/ml de inhibina el clivaje del ADN apoptótico aumentó significativamente en un 86% (calle 5), mientras que dicho incremento fue del 107% (calle 6) cuando los folículos fueron incubados con 40 ng/ml de inhibina ($p < 0.05$).

2.1.2 Cuantificación de los niveles de las proteínas de la superfamilia del gen bcl-2

Para analizar los contenidos proteicos foliculares de Bax y Bcl-2 se aislaron nuevamente FAT por microdisección y se incubaron 24 hs con distintas concentraciones

de inhibina A (0,4; 4; 40 y 100 ng/ml) en medio libre de suero. Los resultados del western blot y las curvas dosis-respuesta se muestran en la *Figura 23*. Al igual que los experimentos anteriores, los niveles de las proteínas encontrados para aquellos folículos que fueron incubados en medio libre de suero y en ausencia de inhibina, fueron considerados como el control y designados arbitrariamente como el 100%.

Se puede observar que los niveles de la proteína Bax aumentan con respecto al control en presencia de inhibina y los niveles máximos se evidencia a una dosis de 40 ng/ml con un incremento de 175% ($p < 0,05$). Por otro lado se observa que los niveles de Bcl-2 no varían con respecto al control a medida que aumenta la concentración de inhibina ($p > 0,05$). Nuevamente, es importante evaluar la relación Bax/Bcl-2, en este caso se tomaron los valores de la densitometría para la dosis de 40 ng/ml de inhibina y se encontró que esta relación es de 2,5. Este hallazgo es importante ya que se sabe que una relación Bax/Bcl-2 mayor que 1, condiciona el destino de una célula a sufrir apoptosis.

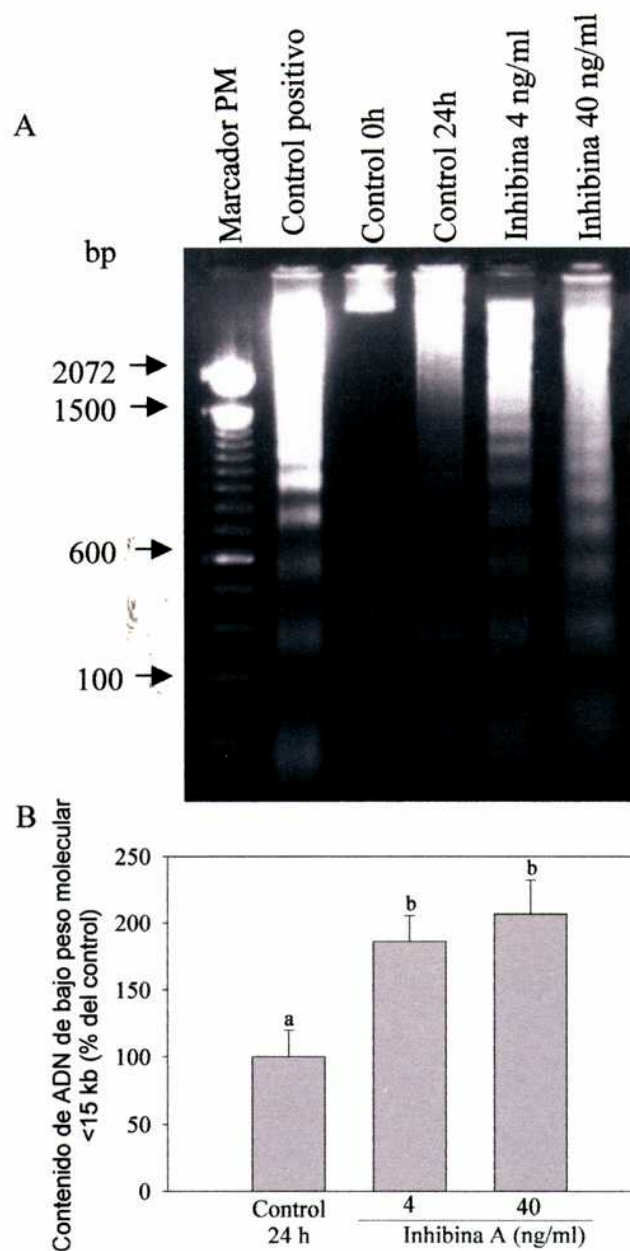


Figura 22. Fragmentación del ADN apoptótico en FAT incubados 24 hs en medio libre de suero en presencia y ausencia de inhibina A (4 y 40 ng/ml). **A.** Gel de agarosa representativo. El ADN de los folículos incubados se visualiza por tinción con bromuro de etidio. Control positivo: timocitos, control 0 hs folículos sin incubar, control 24 hs folículos incubados en medio libre de suero. **B.** Estimación cuantitativa del contenido de ADN de bajo peso molecular (<15 kilobases). Los resultados obtenidos del análisis densitométrico del gel se expresan como la media del porcentaje de aumento con respecto al control de 24 hs $\pm$ ES, de tres experimentos independientes. Los valores con letras distintas indican diferencias significativas por ANOVA y test de Tukey ($p < 0,05$).

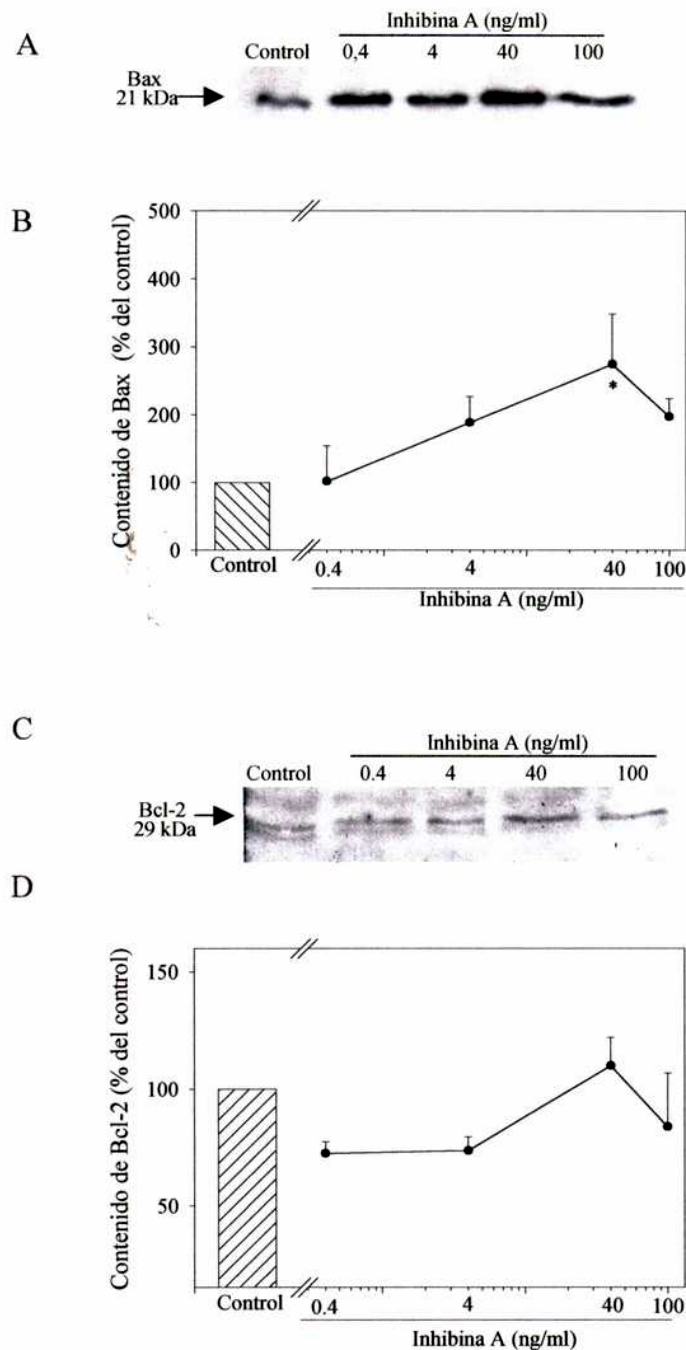


Figura 23. Curva dosis-respuesta para determinar el contenido proteico de Bax y Bcl-2 en FAT incubados 24 hs con distintas concentraciones de inhibina A (0,4; 4; 40 y 100 ng/ml). **A y C.** Inmunoblots representativos para Bax y Bcl-2 respectivamente. **B y D.** Cuantificación densitométrica para Bax y Bcl-2 respectivamente. Los datos se expresan como la media del % del contenido proteico con respecto al control $\pm$ ES de tres blots independientes. * $p < 0,05$ vs su control respectivo usando el test de Kruskal-Wallis seguido del test de Dunn.

2.1.3 Niveles de progesterona y estradiol en tejido folicular

Se midieron los niveles de esteroides extraídos de FAT incubados durante 24 hs con 40 ng/ml de inhibina. Se observó que la inhibina no produjo ningún cambio sobre la producción de progesterona (Control: $7 \pm 0,3$ ng/ml-100 folículos; Inhibina: $6 \pm 0,6$ ng/ml-100 folículos; $p > 0,05$). Por otro lado la producción de estradiol en estos tipos de folículos es tan baja que no pudo ser detectada por el RIA.

2.2 Efecto *in vitro* de la inhibina A sobre la apoptosis en folículos antrales provenientes de ratas tratadas con PMSG

Al igual que los ensayos realizados con ovarios de ratas tratadas con DES se aislaron mecánicamente bajo la lupa folículos antrales provenientes de ratas tratadas con PMSG y se los cultivó durante 24 hs en medio libre de suero en presencia y en ausencia de inhibina A.

2.2.1 Cuantificación de la apoptosis por electroforesis en geles de agarosa

Los resultados obtenidos de la electroforesis en geles de agarosa mostraron que los folículos que fueron incubados 24 hs en medio libre de suero presentaban nuevamente una fragmentación espontánea del ADN. Estos niveles de fragmentación apoptótica fueron considerados como el control y designados arbitrariamente como el 100%. En contraposición la degradación del ADN fue mínima en aquellos folículos que no fueron incubados (control 0 hs) (ver *Figura 24*). Del análisis densitométrico de estos geles se deduce que concentraciones crecientes de inhibina (0,4; 4; 40 ng/ml) no tienen ningún efecto en la fragmentación del ADN de folículos antrales.

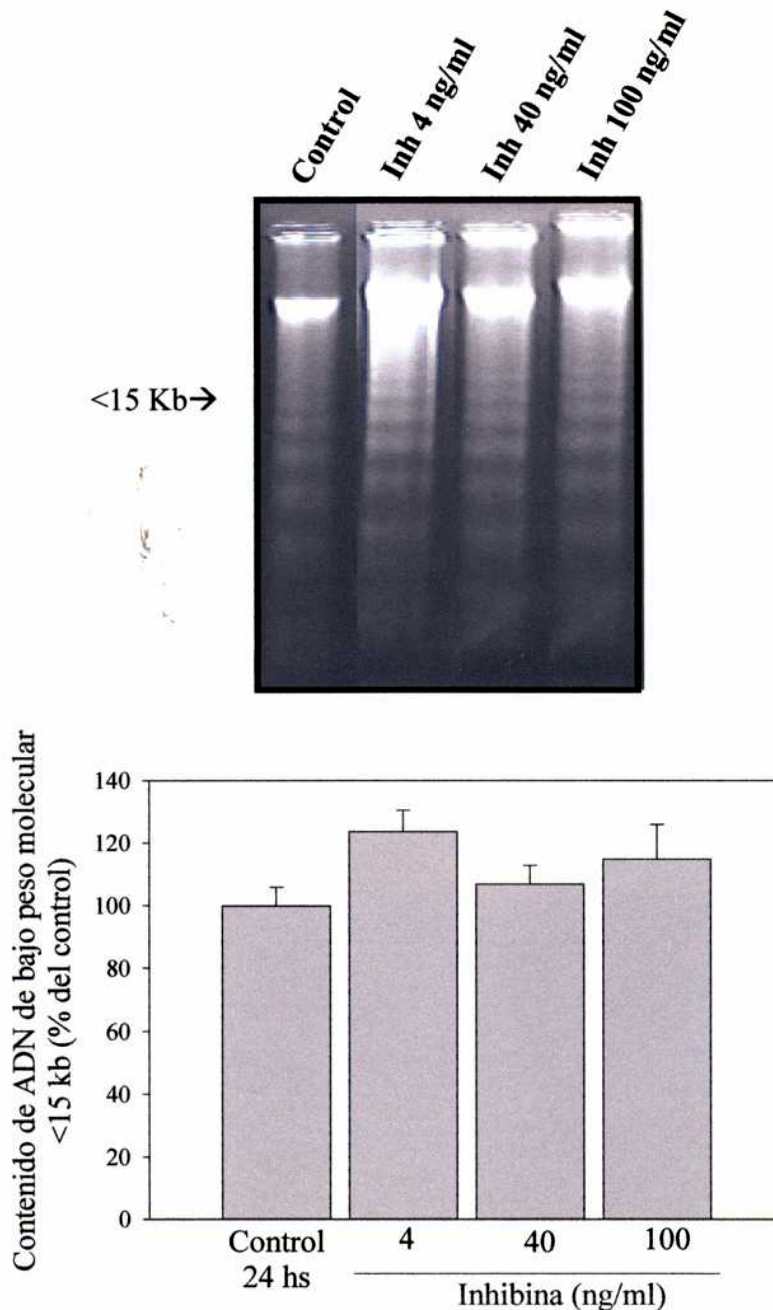


Figura 24. Fragmentación del ADN apoptótico en FAT incubados 24 hs en medio libre de suero en presencia y ausencia de inhibina A (Inh: 4, 40 y 100 ng/ml). **A.** Gel de agarosa representativo. El ADN de los folículos incubados se visualiza por tinción con bromuro de etidio. Control 0 hs folículos sin incubar, control 24 hs folículos incubados en medio libre de suero. **B.** Estimación cuantitativa del contenido de ADN de bajo peso molecular (<15 kilobases). Los resultados obtenidos del análisis densitométrico del gel se expresan como la media del porcentaje de aumento con respecto al control de 24 hs $\pm$ ES, de tres experimentos independientes. El ANOVA no mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($p>0,05$).

DISCUSSION

1. EVALUACIÓN DE LOS ENSAYOS *IN VIVO* E *IN VITRO* REALIZADOS EN RATAS TRATADAS CON DES

En esta parte de la investigación nos centramos primero en estudiar el efecto *in vivo* de la inhibina. Para esto utilizamos un modelo de inyección intraovárica utilizado por Woodruff y col. (1990). Este modelo usado para analizar el rol de la inhibina en el ovario tiene tres ventajas:

☞ Al utilizarse animales inmaduros que no se encuentran bajo la influencia de LH, FSH, estradiol o progesterona, es más fácil manipular el ambiente hormonal en forma exógena.

☞ Como la inhibina actúa en otros órganos además del ovario, con la inyección intraovárica se crea un sistema cerrado que focaliza la acción de la glicoproteína.

☞ El efecto de la FSH endógena y otras hormonas circulantes sobre el desarrollo folicular fue controlado internamente usando el ovario contralateral como control. Por lo tanto cualquier alteración en el desarrollo folicular que se observe entre el ovario control y el tratado es el resultado de la acción local de la inhibina administrada y no de eventos dependientes de gonadotrofinas.

El análisis histológico de la morfología de los ovarios control e inyectados con inhibina, mostró un efecto inhibitorio de esta proteína sobre el desarrollo folicular inducido por DES. A partir del recuento de folículos en ambos tipos de ovarios se observa un aumento significativo en el número de folículos preantrales y una disminución significativa en el número de folículos antrales tempranos. Estos resultados indican que la inhibina estaría interfiriendo en el desarrollo folicular, retrasando el crecimiento de los folículos antrales tempranos reteniéndolos en el estadio preantral. Es importante señalar que cada sección de ovario de 3 μm fue tomada dejando intervalos de 50 μm entre cada una. Este intervalo fue elegido en base a la observación que el diámetro promedio de un ovocito es de 80 μm , de esta manera no se cuenta un mismo folículo dos veces (Woodruff y col., 1990).

Ahora bien, con el objetivo de estudiar si estos cambios observados en la inhibición del crecimiento inducido por el tratamiento con inhibina estaban mediados por fenómenos apoptóticos, se midió la fragmentación del ADN mediante la técnica

TUNEL. Se observó que la inhibina produce un aumento de 3 y 4 veces en el porcentaje de células apoptóticas de FP y FAT, respectivamente. Es interesante destacar que en todos los folículos analizados la apoptosis estuvo confinada principalmente a las células de la granulosa. Sin embargo se observaron marcas en algunas células de la teca aisladas. Estas observaciones están en concordancia con otros estudios hechos también en rata tratadas con DES. Billig y col. analizaron *in situ* la fragmentación del ADN utilizando un método no isotópico de marcado y demostraron que las células de la granulosa son el sitio preponderante donde se lleva a cabo la apoptosis, mientras que las células de la teca y el tejido intersticial presentan una marca mínima (Woodruff y col., 1990). Esto se debe a que en realidad, la mayoría de las células de la teca en vez de morir por apoptosis son reincorporadas al intersticio ovárico (Palumbo y Yeh, 1994). Este evento sería específico de los roedores ya que en folículos atrésicos de otras especies, como la ovina y la porcina, se han encontrado núcleos picnóticos en células tecales (Hubbard y Greenwald, 1985).

El kit Apoptag® utilizado para la determinación de la muerte celular programada, distingue apoptosis de necrosis ya que detecta el ADN clivado y la condensación de la cromatina asociada a la apoptosis. Sin embargo en ciertas circunstancias se pueden marcar células que exhiben necrosis. También puede ocurrir, en raras ocasiones, que la fragmentación del ADN sea incompleta o esté ausente. Es por eso que es importante complementar los resultados obtenidos con esta técnica con la evaluación de criterios morfológicos, tales como la presencia de núcleos picnóticos que presentan condensación y marginación de la cromatina. La visualización de los resultados del Apoptag® revelan una tinción *in situ* y focalizada dentro del núcleo apoptótico y de los cuerpos apoptóticos. Esta tinción positiva se correlaciona con los criterios bioquímicos y morfológicos típicos de la apoptosis. Por estas razones los criterios morfológicos se evaluaron en cortes de ovarios teñidos con hematoxilina-eosina. Se observó que el porcentaje de células apoptóticas aumentaba con respecto al control 1,3 veces en los FP y 1,6 veces en los FAT provenientes de ovarios inyectados con inhibina.

De la comparación de estos dos métodos surge que ambos son buenos indicadores de la apoptosis, ya que existe una correlación entre los niveles de fragmentación del ADN encontrados con la técnica TUNEL y con los hallados en los cortes teñidos con hematoxilina-eosina. La técnica TUNEL fue más sensible a la hora de encontrar

diferencias entre los niveles de apoptosis entre el control y el tratado, mientras que la evaluación de los criterios morfológicos fue mas sensible para determinar cantidad de células presentando clivaje del ADN.

Existe un estudio previo (Woodruff y col., 1990), del cual tomamos el modelo experimental de inyección intraovárica de la inhibina, que muestra por el contrario, un efecto atresico de la activina y un efecto proliferativo de la inhibina. A este respecto cabe destacar que los modelos experimentales utilizados son diferentes. Estos experimentos difieren de los nuestros en varios puntos. Primero inyectan 1 μ g de inhibina por ovario, el doble de lo que se utilizó en nuestra investigación. Segundo utilizan otro modelo experimental: inyectan inhibina/activina sola o inhibina/activina más PMSG y a las 24 hs recuentan el número de folículos y miden incorporación de ^3H -timidina, la cual también fue coinyectada con los otros factores. En este trabajo, el efecto en el desarrollo folicular de los ovarios inyectados con inhibina más PMSG no fue muy diferente del de PMSG solo. La inhibina produce un pequeño aumento en el crecimiento folicular y lleva a incrementar la población de folículos de 350-500 μm . Además de acuerdo con este trabajo la administración de activina bloquea el desarrollo folicular y produce atresia en ovarios de ratas sin tratar y tratadas con PMSG. Pero debemos señalar nuestra divergencia respecto de estos resultados. Los resultados de nuestra investigación muestran por el contrario, un efecto atresico de la inhibina y una inhibición del crecimiento. Es importante señalar que es difícil evaluar el efecto autocrino/paracrino de un factor en ambientes hormonales tan diferentes como lo son hembras vírgenes, tratadas con DES y tratadas con PMSG. La administración de PMSG a ratas prepúberes induce un estadio de desarrollo folicular más avanzado que el presentado con el tratamiento con DES, del cual se obtienen principalmente folículos antrales tempranos.

Con respecto a los estudios sobre apoptosis, aunque esta fue caracterizada originariamente sobre la base de los cambios morfológicos que ocurrían en la célula que se estaba muriendo, estudios adicionales revelaron que uno de los eventos principales asociados con la apoptosis es el clivaje del ADN nuclear en oligonucleosomas de múltiplos de 180 pares de bases. Esta fragmentación del ADN en oligonucleosomas puede ser detectada en forma hisotológica, como vimos anteriormente, o en forma

bioquímica y puede ser usado como marcador para dilucidar los eventos asociados con el inicio de la apoptosis (Tilly y col., 1995).

En un esfuerzo por acercarse a la situación de lo que sucede *in vivo*, para los estudios *in vitro* se utilizaron cultivos de FAT intactos y saludables en medio libre de suero. Este sistema tiene la ventaja de conservar la integridad del folículo a estudiar y por lo tanto la de mantener intacta la comunicación paracrina entre las células de la granulosa y las células de la teca.

Entonces para corroborar las observaciones hechas *in vivo* se incubaron FAT durante 24 hs en medio libre de suero. Los estudios realizados en geles de agarosa demostraron ausencia de fragmentación apoptótica del ADN en FAT sin incubar, en contraste con los folículos incubados durante 24 hs. Los altos niveles de endonucleasas y cationes como el calcio y el magnesio presentes en estos cultivos foliculares podrían ser las causas de la apoptosis espontánea observada. A este respecto Zelennick y col (1989) demostraron que altas concentraciones de estos factores activarían a las endonucleasas y que éstas degradarían el ADN. Además la ausencia de suero en el medio de cultivo, el cual contiene gran cantidad de factores tróficos, acelerarían este proceso.

La incubación de FAT con diferentes concentraciones de inhibina (4 y 40 ng/ml) provocó un aumento en la fragmentación espontánea del ADN. Estos resultados demuestran que el tratamiento con inhibina sensibiliza a las células de la granulosa a la apoptosis.

Entonces, además del efecto antiproliferativo de la inhibina, el tratamiento *in vitro* reveló un aumento significativo en la fragmentación del ADN en FAT cultivados en medio libre de suero. La importancia fisiológica de estos hallazgos reside en el hecho que aunque la atresia ocurre en todos los estadios del desarrollo folicular, la mayoría de los folículos degeneran, presumiblemente por apoptosis, en el estadio antral temprano (Chun y col., 1996; Hirshfield, 1991a). Cabe recordar que el pasaje del estadio preantral tardío al antral temprano es un período de crecimiento continuo y dependiente de gonadotrofinas, principalmente de FSH, donde se produce la selección de los folículos que continúan creciendo hasta el estadio preovulatorio. Asimismo han surgido numerosos trabajos que estudian los factores intraováricos involucrados en la regulación

de la apoptosis en el estadio antral y de De Graff en ratas (Hirshfield, 1991a; Tsafirri y Braw, 1984; Wyllie y col., 1980). Pero no se han realizado muchas investigaciones con respecto a los factores intraováricos encargados de regular este proceso antes de la transición al estadio antral (Asselin y col., 2000; Durlinger y col., 2000).

En los últimos años se ha propuesto a los miembros de la familia del gen *bcl-2* como importantes reguladores del destino de las células de la granulosa durante el desarrollo folicular en diversas especies. El destino de una célula durante el desarrollo está regulado en parte por el balance entre los represores de la muerte (*Bcl-2* y *Bcl-x_{long}*) y los inductores de muerte celular (*Bax* y *Bcl-x_{short}*). Más precisamente se ha observado que estas proteínas interactúan entre ellas formando homo- y/o heterodímeros y su abundancia relativa en un tipo de célula es la que determina si irá a la atresia o sobrevivirá (Hsu y Hsueh, 2000; Tilly y col., 1995). Es por lo detallado anteriormente que se decidió evaluar la expresión y la localización de dichas proteínas en nuestro modelo experimental.

A partir de los ensayos *in vivo* se evaluó la localización de estas proteínas por inmunocitoquímica. Se observó una alta expresión para *Bax* principalmente en el citoplasma de las células de la granulosa periantrales de FP y FAT, más que en las células de la granulosa próximas a la lámina basal. Esta marca es mucho mas abundante en las células de la granulosa de los ovarios que fueron expuestos a la inhibina, mientras que en las células tecales la marca es leve en los dos tratamientos. En este punto cabe destacar que el patrón de localización de la proteína es similar al de células apoptóticas. En cambio se observa que *Bcl-2* se localiza en forma dispersa en las células de la granulosa de FP y de FAT de ovarios control. Mientras que en los ovarios inyectados con inhibina la marca es muy baja. Al analizar el balance entre *Bax* y *Bcl-2* se observó que la relación es mayor que 1 en aquellos ovarios que fueron inyectados con inhibina. Como mencionamos anteriormente esto estaría indicando una tendencia por parte de las células de la granulosa de FP y FAT de conducirse a la apoptosis.

Por otra parte, utilizando la técnica *western blot* se pudo observar que los niveles de *Bcl-2* en FAT incubados 24 hs con concentraciones crecientes de inhibina, se mantienen constantes. En cambio, los niveles de *Bax* aumentan a medida que aumenta la concentración de inhibina, encontrándose la estimulación máxima con 40 ng/ml. Por lo tanto, el análisis de la expresión de proteínas pro- y anti-apoptóticas en el ovario de

ratas inmaduras tratadas con DES, indica que la apoptosis observada en los FAT estimulada por la administración *in vivo* de inhibina, está asociada con un marcado aumento en los niveles de Bax y una expresión constitutiva de Bcl-2. En este sentido el análisis del balance entre Bax/Bcl-2 es también, en ambos tipos foliculares, mayor que 1, lo que indica que en dichas células se han disparado los mecanismos de muerte celular programada. Este patrón de expresión fue observado también por Tilly y col. (1995) en cultivos de folículos en ausencia de gonadotrofinas. Ellos demostraron que la atresia folicular y la apoptosis en células de la granulosa en este tipo de cultivo, ocurre en ausencia de cualquier cambio significativo en los niveles del ARNm de bcl-2. Sin embargo se observa un marcado aumento en los niveles del mensajero de bax.

En cuanto al análisis del balance entre Bax y Bcl-2 cabe agregar que, si bien se observó un aumento en la relación de la expresión de estas dos proteínas en aquellos folículos que fueron incubados con 40 ng/ml de inhibina, no se observaron cambios en los niveles de Bcl-2 con respecto al control. Mientras que sí se observó una disminución en los niveles de Bcl-2 en los ensayos *in vivo*. A este respecto podemos afirmar que los ensayos *in vivo* representan un mejor reflejo de la fisiología ovárica

Todos estos resultados estarían indicando que la inhibina induce la apoptosis en células de la granulosa de FP y FAT de ovarios provenientes de ratas tratadas con DES, a través de la activación de la expresión de algunos de los miembros de la familia del gen bcl-2. El mecanismo por el cual la inhibina activa estos eventos premitocondriales, todavía lo desconocemos. Pero lo que sí se demuestra en esta investigación es que esta glicoproteína provoca un desbalance en la expresión de las proteínas Bax y Bcl-2 que llevan a la apoptosis. El segundo paso, siguiendo el camino de activación del cual participan estas proteínas, es el mitocondrial, el cual provoca un desequilibrio homeostático y la consecuente liberación de proteínas que activan caspasas. Por último existe una fase postmitocondrial durante la cual las proteínas liberadas activan al Apaf-1 y a la caspasa-9. Este complejo denominado apoptosoma dispara una cascada de activaciones de otras caspasas (3 y 6) que llevan a la estimulación de las endonucleasas que clivan el ADN. En este sentido es importante destacar que estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio muestran un aumento en la expresión de caspasa-3 activa en FAT incubados durante 24 hs con inhibina cuando se lo compara con folículos

incubados en medio libre de suero. Dichos estudios y la medición de la actividad de la caspasa-3 se están llevando a cabo en la actualidad.

Por último los estudios sobre esteroidogénesis mostraron que la inhibina no estaría involucrada en la regulación de la producción de estradiol o progesterona en éste modelo experimental. Este resultado está en concordancia con otros trabajos, como por ejemplo el de Ghersevich y col. (2000) donde se observa que la inhibina, en concentraciones de hasta 100 ng/ml, no tiene efecto alguno en la actividad basal o estimulada por AMPc de la enzima 17HSD, ni sobre los niveles del ARNm de la 17HSD de tipo 1 en células de la granulosa obtenidas de ratas estimuladas con DES. Por lo tanto estos resultados apoyan la idea (Hillier y Miro, 1993; Hutchinson y col., 1987; Sugino y col., 1988) que la inhibina probablemente no ejerza ningún efecto sobre la esteroidogénesis en células de la granulosa no luteinizadas.

2. EVALUACIÓN DE LOS ENSAYOS *IN VIVO* E *IN VITRO* REALIZADOS EN RATAS TRATADAS CON PMSG

Como se mencionó anteriormente, de la comparación de los dos métodos utilizados para medir apoptosis surgió que la evaluación de los criterios morfológicos es un método más sensible a la hora de determinar los niveles de fragmentación del ADN. Es por esto que se evaluaron cortes de ovarios inyectados con inhibina provenientes de ratas tratadas con PMSG. El análisis de la histología ovárica muestra un efecto de esta proteína sobre el desarrollo folicular inducido por PMSG. En los ovarios inyectados con inhibina se observa que el número de FPO no se modifica, mientras que los FAT disminuyen y los FP aumentan. Esto nos estaría mostrando que la inhibina produce un retraso en el desarrollo de los folículos del estadio preantral al antral temprano, al igual que se observa con las ratas DES. Sin embargo, no tiene ningún efecto en el crecimiento de los folículos una vez que alcanzaron la madurez y están próximos a ser ovulados.

Además se evaluó en estos mismos cortes de ovario el porcentaje de células apoptóticas. Los resultados mostraron sorprendentemente que la inhibina produce una disminución en los niveles apoptóticos de FPO, FAT y FP, aunque este decremento no fue significativo en los FP. Sin embargo los ensayos *in vitro* de cultivos de folículos mostraron que la inhibina no tiene ningún efecto sobre la fragmentación del ADN. Pero éste método de medición de la apoptosis es menos eficiente que el primero. A este

respecto cabe señalar que estos folículos fueron expuestos a la acción estimuladora del PMSG durante dos días, antes de la inyección con inhibina. En este contexto gran parte de los folículos alcanzaron el estadio preovulatorio antes de haber sido expuestos a este factor. Como se sabe, la FSH sería el principal factor encargado de regular la supervivencia celular en el estadio antral de desarrollo. Ahora bien, se podría pensar que la inhibina está interactuando de alguna forma con el mecanismo de acción de rescate de la FSH, potenciándolo. Sin embargo cabe recordar que la inhibina fue inyectada en el ovario 48 hs después del PMSG.

Muchos estudios recientes han comenzado a caracterizar la regulación de los estadios tempranos de desarrollo folicular y esta saliendo a la luz que la regulación de la supervivencia en los folículos preantrales difiere, en alguna forma de la de folículos más maduros y diferenciados (Asselin y col., 2000). Los resultados presentados en esta Tesis estarían sugiriendo un efecto diferencial de la inhibina sobre el crecimiento, según se trate de un folículo inmaduro o de uno maduro. De hecho Yokota y col. (1997) proponen un efecto paradójico de la activina en el ovario de ratones. Sus resultados indican que la activina A es foliculotrófica en el ovario de ratones prepúberes, mientras que no tiene ningún efecto en el ovario ratones de adultos (Yokota y col., 1997).

CONCLUSION

En los últimos años han crecido considerablemente las investigaciones que ponen en evidencia una acción autocrina/paracrina local de la inhibina, la activina y la follistatina en la foliculogénesis y esteroidogénesis ovárica (Findlay, 1993; Woodruff y col., 1990; Xiao y col., 1990). A partir de este marco conceptual, presentado en los *Antecedentes*, se planteó como problema de la investigación realizada el estudio del papel de la inhibina durante el proceso de foliculogénesis.

Para responder esta incógnita se planteó como hipótesis principal que la inhibina actúa como un factor autocrino y/o paracrino regulando el proceso de selección folicular.

Dado que este enunciado es de alto grado de generalidad, se consideró necesario, para una adecuada puesta a prueba, el planteamiento de las siguientes hipótesis derivadas:

1. Las células de la granulosa-luteínicas humanas en cultivo producen inhibina y se considera a este factor como el responsable de la inhibición del crecimiento folicular.
2. La inhibina A, producida por las células de la granulosa del folículo dominante, actúa como un factor paracrino impidiendo el crecimiento de folículos vecinos de la cohorte en progresión.
3. La inhibina A producida por el folículo dominante no tiene efecto sobre el crecimiento del propio folículo.
4. La inhibición del crecimiento de los folículos subordinados, producida por la inhibina A se debe a la activación de mecanismos apoptóticos.
5. La inhibina A producida por el folículo dominante no tiene efecto sobre la apoptosis de las células del mismo folículo.

Para la puesta a prueba de estas hipótesis se diseñaron dos modelos experimentales. Por un lado se administró DES a ratas prepúberes para obtener una población de folículos antrales tempranos y ensayar el efecto *in vivo* e *in vitro* de la inhibina A. Éste es un buen modelo para poner a prueba las hipótesis derivadas 1, 2 y 4 ya que de esta forma se imita a una población de folículos subordinados. Asimismo se utilizó un modelo de ratas inmaduras superovuladas con gonadotrofinas (PMSG), con el objetivo

de estimular la foliculogénesis hasta el estadio de folículo preovulatorio. A su vez también constituyó un buen modelo para estudiar las hipótesis derivadas 3 y 5 ya que a los folículos preovulatorios se los considera como dominantes.

Los resultados obtenidos y expuestos en esta Tesis confirman que la inhibina A es producida *in vitro* por las células de la granulosa en cultivo obtenidas de ovarios de ratas estimuladas con DES y que su producción es estimulada por FSH, TGF β y estradiol. Asimismo se observó que concentraciones fisiológicas de inhibina A disminuyen la proliferación celular inducida por estos tres factores. Este efecto puede deberse a la interferencia en los mecanismos de estimulación de la proliferación generados por FSH, TGF β y estradiol o por un aumento de la apoptosis celular.

Además del efecto antiproliferativo, se observó en este mismo modelo experimental que la administración de inhibina A *in vivo* produce un retraso en el desarrollo folicular, lentificando el pasaje de folículos del estadio preantral al antral temprano. Conjuntamente con este retraso en la foliculogénesis, dichos folículos presentaron un aumento significativo de la apoptosis. Los hallazgos fueron confirmados por ensayos *in vitro* donde se observa que la incubación de folículos antrales tempranos aislados de ovarios provenientes de ratas tratadas con DES, produce un aumento significativo en la fragmentación del ADN. La relevancia fisiológica de este evento radica en el hecho que la atresia si bien ocurre en todos los estadios de desarrollo, se observa que la mayoría de los folículos degeneran en el estadio antral temprano (Chun y col., 1996; Hirshfield, 1991b).

Cabe señalar, además, que se ha caracterizado a los miembros de la familia del gen de bcl-2 como importantes reguladores de la apoptosis ovárica en las células de la granulosa (Boise y col., 1993; Oltvai y col., 1993). Una de estas proteínas, denominada Bax contrarresta el efecto antiapoptótico de Bcl-2.

En nuestro modelo experimental de ratas estimuladas con DES se observó que la incubación *in vitro* de folículos antrales tempranos con inhibina A no produce cambios en los niveles proteicos de Bcl-2, pero sí incrementa los niveles del contenido de Bax luego de 24 hs de incubación. Es de destacar que esta misma observación se comprobó con los ensayos *in vivo*.

El análisis de los resultados obtenidos sugieren que el efecto de la inhibina en el reclutamiento o la atresia folicular está mediado por la apoptosis.

Por otra parte estos resultados muestran que la inhibina A no produce modificaciones en los niveles de progesterona y estradiol. Este hecho está en concordancia con otros estudios que demuestran que la inhibina no modula directamente la esteroidogénesis en cultivos de células de la granulosa no luteinizadas (Ghersevich y col., 2000).

En lo que respecta a los resultados de los ensayos realizados con el segundo modelo experimental, su análisis muestra que la inhibina A no tiene efecto alguno sobre la proliferación de células de la granulosa en cultivo, provenientes de ovarios de ratas estimuladas con gonadotrofinas. Tampoco se observa ningún efecto de esta glicoproteína sobre la fragmentación del ADN en cultivos de folículos preovulatorios. Por otro lado la administración in vivo de inhibina en estas ratas produce, al igual que en el modelo de ratas DES, un retraso en el desarrollo folicular de folículos inmaduros, pero no tiene ningún efecto en el crecimiento de folículos preovulatorios. Asimismo, en todos los tipos foliculares estudiados se observa una disminución de la apoptosis. Esta observación puede estar relacionada con el hecho de que se trata de ovarios estimulados con un análogo de FSH y como se sabe, esta gonadotrofina rescata a los folículos de la atresia.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente y desde una perspectiva más amplia, se afirma que el surgimiento del folículo dominante y de los folículos subordinados es el resultado de la interacción entre la estimulación de la FSH y la acción de diversos factores intraováricos (Baker y Spears, 1999). En este contexto se reconoce también la relevancia de la regulación interfolicular en este proceso. Particularmente se ha descrito en varias especies la presencia de factores en el fluido folicular de folículos dominantes que tendrían una acción inhibitoria sobre el crecimiento de folículos subordinados (Cahill y col., 1985; Campbell y col., 1991; Chakravorty y col., 1993; Dain y col., 1993; di Zerega y col., 1982). Nuestros resultados sugieren que la inhibina producida por el folículo dominante puede ser uno de esos factores que participan en la regulación de la foliculogénesis.

Por lo expuesto hasta aquí consideramos que, el principal aporte de esta investigación radica en demostrar por primera vez que la acción intraovárica de la inhibina A involucra en folículos preantrales y antrales tempranos de ratas tratadas con DES: una disminución en la proliferación de las células de la granulosa inmaduras, un aumento en la apoptosis y un aumento en los niveles de proteínas proapoptóticas del gen de la familia de bcl-2.

A continuación sintetizamos, a manera de conclusión, los resultados de las hipótesis:

La primer parte de la hipótesis derivada 1 “las células de la granulosa-luteínicas humanas producen inhibina” ha sido corroborada, mientras que la segunda parte, “se considera a este factor como el responsable de la inhibición del crecimiento folicular”, no ha sido corroborada ni refutada. Esto se debe a que, como se detalla en el *Capítulo I*, hasta la fecha no está claro cual es el mecanismo de acción de la inhibina en este aspecto. Al no tener certeza de cómo es el receptor o de cómo es la unión con el mismo, o a través de qué subunidad, no podemos concluir si es la inhibina A o la activina A uno de los factores responsables de la inhibición de la proliferación celular presentes en el MC obtenido de células de la granulosa luteínicas humanas.

Con respecto a la segunda hipótesis derivada “la inhibina A, producida por las células de la granulosa del folículo dominante, actúa como un factor paracrino impidiendo el crecimiento de folículos vecinos de la cohorte en progresión”, ha sido corroborada por los experimentos expuestos, en el *Capítulo II* y con los experimentos in vivo presentados en el *Capítulo III*. Utilizando el modelo de ratas DES, se observó que la inhibina A produce una disminución de la proliferación de las células de la granulosa en cultivo y un retraso en el desarrollo folicular en ovarios inyectados con inhibina A. Además, como se describió en los *Antecedentes*, el folículo dominante presenta altas concentraciones de inhibina, mientras que los folículos subordinados y los atrésicos poseen bajas concentraciones. En este sentido se puede afirmar que esta hipótesis ha sido corroborada.

La tercer hipótesis derivada “la inhibina A producida por el folículo dominante no tiene efecto sobre la proliferación de las células del mismo folículo”, ha sido corroborada a partir del resultado de los experimentos cuyo detalle se encuentra en el

Capítulo II y con los experimentos *in vivo* presentados en el *Capítulo III*. Utilizando el modelo de ratas PMSG, se observa que la inhibina A no produce ningún efecto sobre la proliferación de las células de la granulosa en cultivo y tampoco genera ningún cambio en el desarrollo de folículos preovulatorios en ovarios inyectados con inhibina A.

En cuanto a la cuarta hipótesis derivada, “la inhibición del crecimiento de los folículos subordinados se debe a la activación de mecanismos apoptóticos”, ha sido corroborada por los resultados que arrojaron los experimentos realizados y que se desarrollan en el *Capítulo III*. Se observa tanto *in vivo* como *in vitro* un aumento de la apoptosis en folículos preantrales y antrales tempranos de ovarios de ratas tratadas con DES. Además se observa un aumento en el balance de proteínas pro y antiapoptóticas Bax/Bcl-2, que se correlaciona con el aumento de la apoptosis

Finalmente la sexta hipótesis derivada, “la inhibina A producida por el folículo dominante no tiene efecto sobre la apoptosis de las células del mismo folículo”, ha sido parcialmente refutada. Los experimentos *in vivo* que se presentan en el *Capítulo III* muestran una disminución de la apoptosis en las células de la granulosa de folículos preovulatorios de ovarios provenientes de ratas tratadas con PMSG. Como se mencionó en la discusión, se podría pensar que la inhibina está interactuando de alguna forma con el mecanismo de acción de rescate de la FSH, potenciándolo. Estos resultados sugieren un efecto diferencial de la inhibina sobre la apoptosis, según se trate de un folículo inmaduro o de uno maduro.

En su conjunto los experimentos efectuados demuestran que la inhibina producida por el folículo dominante actuaría en forma paracrina sobre los folículos subordinados, inhibiendo su crecimiento y favoreciendo la activación de los mecanismos apoptóticos que los llevarán a la atresia. De esta manera consideramos que la inhibina participa en el mecanismo de selección folicular.

Así, los resultados obtenidos apoyan con alto grado de probabilidad lo afirmado en la hipótesis principal, la inhibina actúa como un factor autocrino y/o paracrino regulando el proceso de selección folicular, al tiempo que constituyen una respuesta acorde al problema que motivó la investigación.

BIBLIOGRAFIA

Anderson E, Little B. The ontogeny of the rat granulosa cell. Toft DO and Ryan RJ. 203-225. 1985. Illinois, USA. Proceedings of the Fifth Ovarian Workshop. Ovarian Workshops.

Antonsson B, J C Martinou, 2000, The Bcl-2 protein family: Exp.Cell Res., v. 256, p. 50-57.

Arai KY, K Ohshima, G Watanabe, K Arai, K Uehara, K Taya, 2002, Dynamics of messenger RNAs encoding inhibin/activin subunits and follistatin in the ovary during the rat estrous cycle: Biol Reprod., v. 66, p. 1119-1126.

Asselin E, C W Xiao, Y F Wang, B K Tsang, 2000, Mammalian follicular development and atresia: role of apoptosis: Biol Signals Recept., v. 9, p. 87-95.

Baffy G, T Miyashita, J R Williamson, J C Reed, 1993, Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from an IL-3- dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production: J.Biol.Chem., v. 268, p. 6511-6519.

Baker SJ, N Spears, 1999, The role of intra-ovarian interactions in the regulation of follicle dominance: Hum.Reprod.Update., v. 5, p. 153-165.

Banka CL, G F Erickson, 1985, Gonadotropin-releasing hormone induces classical meiotic maturation in subpopulations of atretic preantral follicles: Endocrinology, v. 117, p. 1500-1507.

Bernard DJ, S C Chapman, T K Woodruff, 2001, An emerging role for co-receptors in inhibin signal transduction: Mol.Cell Endocrinol., v. 180, p. 55-62.

Bernard DJ, S C Chapman, T K Woodruff, 2002, Inhibin binding protein (InhBP/p120), betaglycan, and the continuing search for the inhibin receptor: Mol.Endocrinol., v. 16, p. 207-212.

Biscak T.A., Cajender S.B., Vale W., A J Hsueh, 1988, Inhibin: studies of stored and secreted forms by biosynthetic labeling and immunodetection in cultured rat granulosa cells: Endocrinology, v. 122, p. 741-748.

Bloom W., Fawcett W.D., 1997, Tratado de Histología, Madrid, Mc. Graw Hill - Interamericana.

Boise LH, M Gonzalez-Garcia, C E Postema, L Ding, T Lindsten, L A Turka, X Mao, G Nunez, C B Thompson, 1993, bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death: Cell, v. 74, p. 597-608.

Boone DL. y Tsang TK., 1995, Identification of a deoxyribonucleasa I-like endonuclease in rat granulosa and luteal cell nuclei: Biol Reprod., v. 53, p. 1057-1065.

Boone DL, B K Tsang, 1998, Caspase-3 in the rat ovary: localization and possible role in follicular atresia and luteal regression: Biol.Reprod., v. 58, p. 1533-1539.

Cahill LP, M A Driancourt, W A Chamely, et.al., 1985, Role of intrafollicular regulators and FSH in growth and development of large antral follicles in sheep: J Reprod.Fertil., v. 75, p. 599-607.

Campbell BK, H M Picton, G E Mann, et.al., 1991, Effect of steroid and inhibin-free ovine follicular fluid on ovarian follicles and ovarian hormone secretion: J Reprod.Fertil., v. 93, p. 81-96.

Caron MG, S Goldstein, K Savard, J M Marsh, 1975, Protein kinase stimulation of a reconstituted cholesterol side chain cleavage enzyme system in the bovine corpus luteum: J Biol Chem, v. 250, p. 5137-5143.

Carr B, 1998, Disorders of the ovaries and female reproductive tract, in JD Wilson, DW Foster, HM Kronenberg, y PR Larsen (eds), Williams Textbook of Endocrinology: p. 751-775.

Chakravorty A, V B Mahesh, T M Mills, 1993, Control of peptides regulating mitosis of granulosa cells in immature rat ovary by oestrogen and gonadotrophin: J Reprod.Fertil., v. 97, p. 91-100.

Chang H, A L Lau, M M Matzuk, 2001, Studying TGF-beta superfamily signaling by knockouts and knockins: Mol.Cell Endocrinol., v. 180, p. 39-46.

Chang SC, W Anderson, J C Lewis, R J Ryan, Y K Kang, 1977, The porcine ovarian follicle. II. Electron microscopic study of surface features of granulosa cells at different stages of development: Biol Reprod., v. 16, p. 349-357.

Chapman SC, D J Bernard, J Jelen, T K Woodruff, 2002, Properties of inhibin binding to betaglycan, InhBP/p120 and the activin type II receptors: Mol.Cell Endocrinol., v. 196, p. 79-93.

Chong H.; S.A Pangas; D.J Bernard y col., 2000, Structure and expression of a membrane component of the inhibin receptor system: Endocrinology, v. 141, p. 2600-2607.

Chun SY, Eisenhauer KM, Minami S, Billig H, Perlas E, Hsueh JW, 1996, Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor: Endocrinology, v. 137, p. 1447-1456.

Clark BJ, S C Soo, K M Caron, Y Ikeda, K L Parker, D M Stocco, 1995, Hormonal and developmental regulation of the steroidogenic acute regulatory protein: Mol.Endocrinol., v. 9, p. 1346-1355.

Dain LB, M A Bley, J L Baranao, M Tesone, 1993, Evidence for the production of a growth-inhibitory factor by human granulosa-luteal cells: Mol.Reprod.Dev., v. 36, p. 159-163.

Daud AI, F M Bumpus, A Husain, 1988, Evidence for selective expression of angiotensin II receptors on atretic follicles in the rat ovary: an autoradiographic study: Endocrinology, v. 122, p. 2727-2734.

- Davis J.S., B R Rueda, 2002, The corpus luteum: an ovarian structure with maternal instincts and suicidal tendencies: *Front Biosci*, v. 7, p. 1978.
- de Kretser,DM, M P Hedger, Loveland K.L.L., D J Phillips, 2002, Inhibins, activins and follistatin in reproduction: *Hum.Reprod.Update*..
- Dhanasekaran N, N R Moudgal, 1989, Studies on follicular atresia: role of gonadotropins and gonadal steroids in regulating cathepsin-D activity of preovulatory follicles in the rat: *Mol.Cell Endocrinol.*, v. 63, p. 133-142.
- di Zerega G.S., Goebelsmann U., Nakamura R.M., 1982, Identification of protein(s) secreted by preovulatory ovary which suppresses the follicle response to gonadotropins: *J Clin.Endocrinol.Metab*, v. 54, p. 1091-1096.
- Driancourt MA., Gougeon A., Royere D., C Thibault, 1993, Ovarian Function, en C Thibault, MC Levasseur, y Hunter R.H.F. (eds), *Reproduction in Mammals and Man*: Paris, Editorial Ellipses.
- Drummond AE, M Dyson, E Thean, N P Groome, D M Robertson, J K Findlay, 2000, Temporal and hormonal regulation of inhibin protein and subunit mRNA expression by post-natal and immature rat ovaries: *J.Endocrinol.*, v. 166, p. 339-354.
- Durlinger AL, P Kramer, B Karels, J A Grootegoed, J T Uilenbroek, A P Themmen, 2000, Apoptotic and proliferative changes during induced atresia of pre- ovulatory follicles in the rat: *Hum.Reprod.*, v. 15, p. 2504-2511.
- Eramaa M, K Heikinheimo, T Tuuri, K Hilden, O Ritvos, 1993, Inhibin/activin subunit mRNA expression in human granulosa-luteal cells: *Mol.Cell Endocrinol.*, v. 92, p. R15-R20.
- Erickson GF, D A Magoffin, C A Dyer, C Hofeditz, 1985, The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships: *Endocr.Rev.*, v. 6, p. 371-399.
- Findlay JK, 1993, An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis: *Biol.Reprod.*, v. 48, p. 15-23.
- Findlay JK, A E Drummond, K L Britt, M Dyson, N G Wreford, D M Robertson, N P Groome, M E Jones, E R Simpson, 2000, The roles of activins, inhibins and estrogen in early committed follicles: *Mol.Cell Endocrinol.*, v. 163, p. 81-87.
- Findlay JK, A E Drummond, M Dyson, A J Baillie, D M Robertson, J F Ethier, 2001, Production and actions of inhibin and activin during folliculogenesis in the rat: *Mol.Cell Endocrinol.*, v. 180, p. 139-144.
- Fortune JE, D T Armstrong, 1977, Androgen production by theca and granulosa isolated from proestrous rat follicles: *Endocrinology*, v. 100, p. 1341-1347.
- Fraser HM, G M Lunn, 1993, Does inhibin have an endocrine function during the menstrual cycle?: *Biol Reprod.*, v. 48, p. 15-23.

Fraser HM, G M Lunn, P T K Saunders, 1993, Localization of inhibin/activin subunit mRNAs during the luteal phase in the primate ovary: *J Mol.Endocrinol.*, v. 120, p. 245-257.

Fried G, Remaeus K, Krog E, Cesiczky G, Aanesen A, Tally M., 2003, Inhibin B predicts oocyte number and the ratio IGF-I/IGFBP-1 may indicate oocyte quality during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization.: *Assist Reprod Genet*, v. 20, p. 167-176.

Ghersevich S, L Akinola, T Kaminski, M Poutanen, V Isomaa, R Vihko, P Vihko, 2000, Activin-A, but not inhibin, regulates 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity and expression in cultured rat granulosa cells: *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.*, v. 73, p. 203-210.

Goldenberg RL, J L Vaitukaitis, G T Ross, 1972, Estrogen and follicle stimulation hormone interactions on follicle growth in rats: *Endocrinology*, v. 90, p. 1492-1498.

Gosden R, N Spears, 1997, Programmed cell death in the reproductive system: *Br Med Bull*, v. 53, p. 644-661.

Gray PC, L M Bilezikjian, W Vale, 2001, Antagonism of activin by inhibin and inhibin receptors: a functional role for betaglycan-glycan: *Mol.Cell Endocrinol.*, v. 180, p. 47-53.

Greenwald GS, 1989, Temporal and topographic changes in DNA synthesis after induced follicular atresia: *Biol Reprod.*, v. 41, p. 175-181.

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)*, v. 40, p. 717-723.

Groome NP, P J Illingworth, M O'Brien, R Pai, F E Rodger, J P Mather, A S McNeilly, 1996, Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle: *J Clin.Endocrinol.Metab*, v. 81, p. 1401-1405.

Groome NP, P J Illingworth, M O'Brien, J Priddle, K Weaver, A S McNeilly, 1995, Quantification of inhibin pro-alpha C-containing forms in human serum by a new ultrasensitive two-site enzyme-linked immunosorbent assay: *J.Clin.Endocrinol.Metab*, v. 80, p. 2926-2932.

Groome NP, M O'Brien, 1993, Two-site immunoassays for inhibin and its subunits. Further applications of the synthetic peptide approach.: *Journal of Immunological Methods*, v. 165, p. 167-176.

Hall JE, C K Welt, 2000, Inhibin and Female Reproduction, in Filicori M. (ed), *Endocrine basis of reproductive function*: Boloña, Monduzzi editore, p. 151-168.

Hall JE, C K Welt, D W Cramer, 1999, Inhibin A and inhibin B reflect ovarian function in assisted reproduction but are less useful at predicting outcome: *Hum.Reprod.*, v. 14, p. 409-415.

Herde K, De Pestel G, Roels F, 1994, In situ end labelling of fragmented DNA in induced ovarian atresia: *Biochem Cell Biol*, v. 72, p. 581-586.

Hillier SG, R A Knazek, G T Ross, 1977, Androgenic stimulation of progesterone production by granulosa cells from preantral ovarian follicles: further in vitro studies using replicate cell cultures: *Endocrinology*, v. 100, p. 1539-1549.

Hillier SG, A M van den Boogaard, L E Reichert, Jr., E V van Hall, 1980, Alterations in granulosa cell aromatase activity accompanying preovulatory follicular development in the rat ovary with evidence that 5 α -reduced C19 steroids inhibit the aromatase reaction in vitro: *J.Endocrinol.*, v. 84, p. 409-419.

Hillier SG, E L Yong, P J Illingworth, D T Baird, R H Schwall, A J Mason, 1991, Effect of recombinant inhibin on androgen synthesis in cultured human thecal cells: *Mol.Cell Endocrinol.*, v. 75, p. R1-R6.

Hillier S.G., Miro F., 1993, Inhibin, activin, and follistatin: potencial roles in ovarian physiology: *Ann.N.Y.Acad.Sci*, v. 687, p. 29-38.

Hirshfield AN, 1988, Size-frequency analysis of atresia in cycling rats: *Biol.Reprod.*, v. 38, p. 1181-1188.

Hirshfield AN, 1991a, Development of follicles in the mammalian ovary: *Int.Rev.Cytol.*, v. 124, p. 43-101.

Hirshfield AN, 1991b, Development of follicles in the mammalian ovary: *Rev Cytol*, v. 124, p. 43-101.

Hsu SY, A J Hsueh, 2000, Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm: *Physiol Rev.*, v. 80, p. 593-614.

Hsueh AJ, E Y Adashi, P B Jones, T H Welsh, Jr., 1984, Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells: *Endocr.Rev.*, v. 5, p. 76-127.

Hsueh AJ, 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.U.S.A*, v. 84, p. 5082-5086.

Hubbard C.J., Greenwald G.S., 1985, Morphological changes in atretic Graafian follicles during atresia in the hamster: *Anat rec*, v. 212, p. 353-357.

Hutchinson LA, J K Findlay, de VF, D M Robertson, 1987, Effects of bovine inhibin, transforming growth factor-beta and bovine activin A on granulosa cell differentiation: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 146, p. 1405-1412.

Kaufmann SH, W C Earnshaw, 2000, Induction of apoptosis by cancer chemotherapy: *Exp.Cell Res.*, v. 256, p. 42-49.

Kerr JF, A H Wyllie, A R Currie, 1972, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics: *Br.J.Cancer*, v. 26, p. 239-257.

Khan MI, S Rosberg, M Lahav, S A Lamprecht, G Selstam, H Herlitz, K Ahren, 1979, Studies on the mechanism of action of the inhibitory effect of prostaglandin F₂ alpha on cyclic AMP accumulation in rat corpora lutea of various ages: *Biol Reprod.*, v. 21, p. 1175-1183.

Kim JM, Y D Yoon, B K Tsang, 1999, Involvement of the Fas/Fas ligand system in p53-mediated granulosa cell apoptosis during follicular development and atresia: *Endocrinology*, v. 140, p. 2307-2317.

Knight PG, C Glister, 2001, Potencial local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary: *Reproduction*, v. 121, p. 503-512.

Knudson CM, K S Tung, W G Tourtellotte, G A Brown, S J Korsmeyer, 1995, Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death: *Science*, v. 270, p. 96-99.

La Polt PS, D Soto, J G Su, C A Campen, J Vaughan, Vale W., A J Hsueh, 1989, Activin stimulation of inhibin secretion and messenger RNA levels in cultured granulosa cells: *Mol.Endocrinol.*, v. 3, p. 1666-1673.

Lamprecht,SA, H V Herlitz, K E Ahren, 1975, Induction by PGF₂a of 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in first generation corpora lutea of the rat: *Mol.Cell Endocrinol.*, v. 3, p. 273-282.

Lanuza GM, N P Groome, J L Baranao, S Campo, 1999, Dimeric inhibin A and B production are differentially regulated by hormones and local factors in rat granulosa cells: *Endocrinology*, v. 140, p. 2549-2554.

LeMaire WJ, R Leidner, J M Marsh, 1975, Pre and post ovulatory changes in the concentration of prostaglandins in rat graafian follicles: *Prostaglandins*, v. 9, p. 221-229.

Lewis KA, P C Gray, A L Blount, 2000, Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling: *Nature*, v. 404, p. 411-414.

Li J, H Sasaki, Y L Sheng, D Schneiderman, C W Xiao, F Kotsuji, B K Tsang, 2000, Apoptosis and chemoresistance in human ovarian cancer: is Xiap a determinant?: *Biol Signals Recept.*, v. 9, p. 122-130.

Li R, D M Phillips, J P Mather, 1995, Activin promotes ovarian follicle development in vitro: *Nature*, v. 136, p. 849-856.

Maravei D.V., Morita Y., Kuida K., Tilly JL. Pre and postnatal ovarian apoptosis defects in caspase-9 deficient mice. *Endocrine Society Annual Meeting* . 2001. Ref Type: Abstract

Martin SJ, D R Green, 1995, Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts?: *Cell*, v. 82, p. 349-352.

Matikainen T., Perez G.I., Zheng T.S., Kluzak T.R., B R Rueda, Flavell R.A., Tilly JL, 2001, Capase-3 gene knockout defines cell lineage specificity for programmed cell death signaling in the ovary: *Endocrinology*, v. 142, p. 2468-2480.

- Matzuk MM, M J Finegold, J G Su, A J Hsueh, A Bradley, 1992, Alpha-inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice: *Nature*, v. 360, p. 313-319.
- Mayo KE, 1994, Inhibin and activin: *Trends Endocrinol.Metab.*, v. 5, p. 407-414.
- McCullagh G., 1932, Dual endocrine activity of the testes: *Science*, v. 76, p. 19-20.
- McDonnell TJ, G Nunez, F M Platt, D Hockenberry, L London, J P McKearn, S J Korsmeyer, 1990, Deregulated Bcl-2-immunoglobulin transgene expands a resting but responsive immunoglobulin M and D-expressing B-cell population: *Mol.Cell Biol.*, v. 10, p. 1901-1907.
- McGee EA, 2000, The regulation of apoptosis in preantral ovarian follicles: *Biol Signals Recept.*, v. 9, p. 81-86.
- McGee EA, A J Hsueh, 2000, Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles: *Endocr.Rev.*, v. 21, p. 200-214.
- McNatty KP, A Makris, C DeGrazia, R Osathanondh, K J Ryan, 1979, The production of progesterone, androgens, and estrogens by granulosa cells, thecal tissue, and stromal tissue from human ovaries in vitro: *J Clin.Endocrinol.Metab.*, v. 49, p. 687-699.
- McNatty KP., 1980, Regulation of follicle maturation in the human ovary: a role for 5-reduced androgens., in FJMF Cumming IA (ed), *Endocrinology.*: Camberra, Australian Academy of Sciences, p. 1-51.
- McNatty KP, J L Juengel, Wilson T., S M Galloway, Davis G.H., 2002, Genetic mutations influencing ovulation rate in sheep: *Reprod.Fert.Dev.*, v. 13, p. 549-555.
- Meunier J., S B Cajander, V J Roberts, Rivier C., Sawchenko P., 1988, Rapid change in the expression of inhibin α , β_A , and β_B subunits in ovarian cell types during the rat estrous cycle: *Mol.Endocrinol.*, v. 2, p. 1352-1363.
- Meunier J., Rivier C., Evans R., Vale W., 1998, Gonadal and extragonadal expression of inhibin- α , β_A , β_B -subunits in various tissues predicts diverse functions: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 85, p. 247-251.
- Miro F., Smyth C.D., Hillier S.G., 1991, Development-related effects of recombinant activin on steroid synthesis in rat granulosa cells: *Endocrinology*, v. 129, p. 3388-3394.
- Miro F, S G Hillier, 1992, Relative effects of activin and inhibin on steroid hormone synthesis in primate granulosa cells: *Endocrinology and Metabolism*, v. 75, p. 1556-1561.
- Miro F, S G Hillier, 1996, Modulation of granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis and differentiation by activin: *Endocrinology*, v. 137, p. 464-468.
- Miyashita T, J C Reed, 1995, Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene: *Cell*, v. 80, p. 293-299.

Moon YS, B K Tsang, C Simpson, D T Armstrong, 1978, 17 beta-Estradiol biosynthesis in cultured granulosa and thecal cells of human ovarian follicles: stimulation by follicle-stimulating hormone: *J Clin.Endocrinol.Metab*, v. 47, p. 263-267.

Morishige WK, I Rothchild, 1974, Temporal aspects of the regulation of corpus luteum function by luteinizing hormone, prolactin and placental luteotrophin during the first half of pregnancy in the rat: *Endocrinology*, v. 95, p. 260-274.

Nakatani A, S Shimasaki, G F Erickson, N Ling, 1991a, Tissue-specific expression of four insulin-like growth factor-binding proteins (1, 2, 3, and 4) in the rat ovary: *Endocrinology*, v. 129, p. 1521-1529.

Nakatani A, S Shimasaki, L V DePaolo, G F Erickson, N Ling, 1991b, Cyclic changes in follistatin messenger ribonucleic acid and its protein in the rat ovary during the estrous cycle: *Endocrinology*, v. 129, p. 603-611.

Nishimori K, M M Matzuk, 1996, Transgenic mice in the analysis of reproductive development and function: *Rev.Reprod.*, v. 1, p. 203-212.

Nuñez G, D Hockenbery, T J McDonnell, C M Sorensen, S J Korsmeyer, 1991, Bcl-2 maintains B cell memory: *Nature*, v. 353, p. 71-73.

Oltvai ZN, C L Millman, S J Korsmeyer, 1993, Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death: *Cell*, v. 74, p. 609-619.

Palumbo A, J Yeh, 1994, In situ localization of apoptosis in the rat ovary during follicular atresia: *Biol Reprod.*, v. 51, p. 888-895.

Pangas SA, T K Woodruff, 2000, Activin signal transduction pathways: *Trends Endocrinol.Metab*, v. 11, p. 309-314.

Peters H, A G Byskov, S Lintern-Moore, M Faber, M Andersen, 1973, The effect of gonadotrophin on follicle growth initiation in the neonatal mouse ovary: *J Reprod.Fertil.*, v. 35, p. 139-141.

Peters H, McNatty KP, 1980, Ovulation, en Peters H y McNatty KP (eds), *The ovary*: Londres, Granada Publishing, p. 75-79.

Petraglia F., Sawchenko P., Lim A., J Rivier, Vale W., 1987, Localization, secretion, and action of inhibin in human placenta: *Science*, v. 237, p. 187-189.

Pru JK, J L Tilly, 2001, Programmed cell death in the ovary: insights and future prospects using genetic technologies: *Mol.Endocrinol.*, v. 15, p. 845-853.

Rabinovici J, S J Spencer, R B Jaffe, 1990, Recombinant human activin-A promotes proliferation of human luteinized preovulatory granulosa cells in vitro: *J Clin.Endocrinol.Metab*, v. 71, p. 1396-1398.

Rabinovici J, S Spencer, N Doldi, R Jaffe, 1994, Localization and actions of activin in the human ovary adrenal gland, in H Burger, JK Findlay, D Robertson, D de Kretser,

and Petraglia F. (eds), *Frontiers in Endocrinology, Inhibin and Inhibin-related Proteins*: Roma, p. 191-198.

Richards JS, 1980, Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation: *Physiol Rev.*, v. 60, p. 51-89.

Roberts V., Meunier J., J Vaughan, J Rivier, Rivier C., Vale W., 1989, Production and regulation of inhibin subunits in pituitary gonadotropes: *Endocrinology*, v. 124, p. 552-554.

Roberts VJ, S Barth, A el-Roeiy, S S Yen, 2003, Expression of inhibin/activin subunits and follistatin messenger ribonucleic acids and proteins in ovarian follicles and the corpus luteum during the human menstrual cycle: *J Clin Endocrinol Metab*, v. 77, p. 1402-1410.

Roche JF, 1996, Control and regulation of folliculogenesis a symposium in perspective: *Rev.Reprod.*, v. 1, p. 19-27.

Rose MP, R E Gaines Das, 1996, International collaborative study by in vitro bioassays and immunoassays of the First International Standard for Inhibin, Human Recombinant: *Biologicals*, v. 24, p. 1-18.

Rothchild I, G J Pepe, W K Morishige, 1974, Factors affecting the dependency of LH in the regulation of corpus luteum progesterone secretion in the rat: *Endocrinology*, v. 95, p. 280-288.

Rueda BR, K I Tilly, I W Botros, P D Jolly, T R Hansen, P B Hoyer, J L Tilly, 1997, Increased bax and interleukin-1 β -converting enzyme messenger ribonucleic acid levels coincide with apoptosis in the bovine corpus luteum during structural regression: *Biol.Reprod.*, v. 56, p. 186-193.

Schwartz N, Channing C, 1977, Evidence for ovarian "inhibin": suppression of the secondary rise in serum follicle stimulating hormone levels in proestrus rats by injection of porcine follicular fluid: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 74, p. 5721-5724.

Segaloff DL, H Y Wang, J S Richards, 1990, Hormonal regulation of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor mRNA in rat ovarian cells during follicular development and luteinization: *Mol.Endocrinol.*, v. 4, p. 1856-1865.

Shidaifat F., Khamas W., Hailat N., 2001, Activin-A differentially regulates steroidogenesis by sheep granulosa cells: *Res Vet Sci.*, v. 71, p. 23-25.

Shikone T, M Yamoto, K Kokawa, K Yamashita, K Nishimori, R Nakano, 1996, Apoptosis of human corpora lutea during cyclic luteal regression and early pregnancy: *J Clin.Endocrinol.Metab*, v. 81, p. 2376-2380.

Strauss JF, III, L A Schuler, M F Rosenblum, T Tanaka, 1981, Cholesterol metabolism by ovarian tissue: *Adv.Lipid Res.*, v. 18, p. 99-157.

Suda T, T Takahashi, P Golstein, S Nagata, 1993, Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family: *Cell*, v. 75, p. 1169-1178.

Sugino H, T Nakamura, Y Hasegawa, K Miyamoto, Y Abe, M Igarashi, Y Eto, H Shibai, K Titani, 1988, Erythroid differentiation factor can modulate granulosa cell functions: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 153, p. 281-288.

Thornberry NA, Y Lazebnik, 1998, Caspases: enemies within: *Science*, v. 281, p. 1312-1316.

Tilly JL, K I Kowalski, A L Johnson, A J Hsueh, 1991, Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression: *Endocrinology*, v. 129, p. 2799-2801.

Tilly JL, Tilly KI, 1995, Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles: *Endocrinology*, v. 136, p. 242-252.

Tilly JL, K I Tilly, M L Kenton, A L Johnson, 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-xlong messenger ribonucleic acid levels: *Endocrinology*, v. 136, p. 232-241.

Tilly JL, 1996, Apoptosis and ovarian function: *Rev.Reprod.*, v. 1, p. 162-172.

Tsafiri A., Braw R.H., 1984, Experimental approaches to atresia in mammals: *Oxf Rev Reprod Biol*, v. 6, p. 226-265.

Tsafiri A, Adashi EY, 1994, Local nonsteroidal regulators of ovarian function., in Knobil E and Neill J. (ed), *The Physiology of Reproduction*: New York, Raven Press, Ltd., p. 817-843.

Tsonis C.G., Hillier S.G., Baird D.T., 1987, Production of inhibin bioactivity by human granulosa-lutein cells: stimulation by LH and testosterone in vitro: *J Endocrinol*, v. 112, p. R3-R5.

Tsujimoto Y, J Cossman, E Jaffe, C M Croce, 1985, Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma: *Science*, v. 228, p. 1440-1443.

Uilenbroek JT, P J Woutersen, S P van der, 1980, Atresia of preovulatory follicles: gonadotropin binding and steroidogenic activity: *Biol Reprod.*, v. 23, p. 219-229.

Wiesen JF, A R Midgley, Jr., 1994, Expression of connexin 43 gap junction messenger ribonucleic acid and protein during follicular atresia: *Biol Reprod.*, v. 50, p. 336-348.

Woodruff TK, J D'Agostino, N B Schwartz, K E Mayo, 1988, Dynamic changes in inhibin messenger RNAs in rat ovarian follicles during the reproductive cycle: *Science*, v. 239, p. 1296-1299.

Woodruff TK, R J Lyon, S E Hansen, G C Rice, J P Mather, 1990, Inhibin and activin locally regulate rat ovarian folliculogenesis: *Endocrinology*, v. 127, p. 3196-3205.

Woodruff TK y K E Mayo, 1990, Regulation of inhibin synthesis in the rat ovary: *Annu.Rev.Physiol*, v. 52, p. 807-821.

Woodruff T, L Krummen, D Baly, S Garg, D Allison, M Sadick, W Wong, J Mather, M Soules, 1993, Quantitative two-site enzyme-linked immunosorbent assays for inhibin A, activin A and activin B: Hum.Reprod., v. 8 Suppl 2, p. 133-137.

Woodruff T.K., 2003, Regulation of cellular and system function by activin: Biochem.Pharmacol., v. 55, p. 953-963.

Wyllie AH, 1980, Glucocorticoid-induced lymphocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation: Nature, v. 392, p. 555-556.

Wyllie AH, J F Kerr, A R Currie, 1980, The significance of apoptosis: Int Rev Cytol, v. 68, p. 251-306.

Xiao S, J K Findlay, D M Robertson, 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.Endocrinol., v. 69, p. 1-8.

Ying S., A Becker, N Ling, N Uneno, R Guillemin, 1986, Inhibin and beta type transforming growth factor (TGF β) have opposite modulating effects on the follicle stimulating hormone (FSH)-induced aromatase activity of cultured rat granulosa cells: Biochem Biophys Res Commun, v. 136, p. 969-975.

Ying S., 1988, Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone: Endocr.Rev., v. 9, p. 267-293.

Yokota H, K Yamada, X Liu, J Kobayashi, Y Abe, H Mizunuma, Y Ibuki, 1997, Paradoxical action of activin A on folliculogenesis in immature and adult mice: Endocrinology, v. 138, p. 4572-4576.

Zelevnik AJ, L L Ihrig, S G Bassett, 1989, Developmental expression of Ca⁺⁺/Mg⁺⁺-dependent endonuclease activity in rat granulosa and luteal cells: Endocrinology, v. 125, p. 2218-2220.

Zimmerman CM, L S Mathews, 1996, Activin receptors: cellular signalling by receptor serine kinases: Biochemical Society Symposia, v. 62, p. 25-38.

INDICE ALFABETICO

A

Aislamiento celular y cultivo de células granulosa- luteínicas humanas., 80
Aislamiento de células de la granulosa, 81
Aislamiento de folículos y extracción del ADN, 88
Aislamiento y cultivo de folículos ováricos de rata, 87
Análisis estadístico de los datos, 90
Animales, 80
Apoptosis, 46
Aspectos morfológicos de la foliculogénesis, 24

C

Cambios en los niveles de inhibina durante el ciclo menstrual, 69
Caspasas como ejecutoras de la apoptosis, 56
Ciclo ovárico de la rata, 39
Clasificación y recuento de folículos ováricos, 86
Coloración con hematoxilina-eosina, 86
Convergencia de los caminos de señalización extra e intracelular, 57
Cuantificación de la apoptosis por electroforesis en geles de agarosa, 147, 151
Cuantificación de los niveles de las proteínas de la superfamilia del gen bcl-2, 147
Cuantificación inmunocitoquímica de la apoptosis, 86
Cuerpo, 29
Cultivo de células adenohipofisarias, 83
Cultivos de células de la granulosa, 82

D

Determinación de apoptosis en folículos ováricos, 88
Determinación de estradiol, 85
Determinación de progesterona, 85
Distribución de la inhibina en el ovario de la rata, 61

E

Efecto de la activina A sobre la proliferación de células de la granulosa inmaduras de rata en cultivo, 116
Efecto de la inhibina A sobre la proliferación de células de la granulosa inmaduras de rata en cultivo, 112
Efecto de la inhibina A sobre la proliferación de células de la granulosa maduras de rata en cultivo, 120
Efecto de la inhibina A sobre la proliferación de células hipofisarias de rata en cultivo, 121
Efecto de la inhibina A y de la activina A recombinante humana sobre la proliferación de células de granulosa de rata., 83
Efecto de la inhibina A y la activina A sobre la proliferación de células de la granulosa, inmaduras y maduras, de rata en cultivo, 124
Efecto del MC proveniente de células de la granulosa-luteínicas humanas sobre la proliferación de células de granulosa inmaduras de rata, 83
Efecto *in vitro* de la inhibina A sobre la apoptosis en folículos antrales provenientes de ratas tratadas con PMSG, 151
Efecto *in vitro* de la inhibina A sobre la apoptosis en folículos antrales tempranos provenientes de ratas tratadas con DES, 147
Efecto *in vivo* de la inhibina A sobre el desarrollo folicular y la apoptosis en ratas tratadas con DES, 131
Efecto *in vivo* de la inhibina A sobre el desarrollo folicular y la apoptosis en ratas tratadas con PMSG, 144
Efecto *in vivo* de la inhibina A sobre la expresión de proteínas pro y antiapoptóticas en ratas tratadas con DES, 139
El eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, 30
Electroforesis en geles de agarosa y cuantificación de la fragmentación de ADN, 88
Ensayos *in vitro*, 87, 147
Ensayos *in vivo*, 85, 131
Evaluación de los ensayos *in vivo* e *in vitro* realizados en ratas tratadas con DES, 154
Evaluación de los ensayos *in vivo* e *in vitro* realizados en ratas tratadas con PMSG, 160
Extracción de esteroides de folículos, 89

F

Folículo preovulatorio, 26
Folículo primario, 24

Folículo primordial, 24
Folículo secundario, 24
Folículo terciario, 25
Foliculogénesis, 23
Folículos antrales tempranos, 87
Folículos preovulatorios, 87

I

Inhibinas, activinas y folistatinas, 60

L

La apoptosis como mecanismo de atresia folicular, 46
La inhibina como un factor inhibidor del crecimiento folicular, 97, 104
La teoría "dos células, dos gonadotrofinas", 43
Las inhibinas y las activinas como factores de regulación intraováricos, 67
Luteólisis, 30

M

Mecanismos de regulación endocrina, 37
Mecanismos de regulación intraovárica, 37
Mecanismos moleculares de la atresia, 51
Medición de esteroides, 84
Medición de esteroides en cultivos de células de la granulosa inmaduras de rata, 84
Medición de la producción de inhibina en el MC de células de granulosa-luteínicas humanas y en el medio condicionado de células de la granulosa de rata, 82
Medición de los niveles de miembros de la familia de bcl-2 por western blot, 88
Metabolismo de la progesterona, 43
Método MTS, 83
Miembros de la familia de Bcl-2, 51
Morfología ovárica, 85
Morfología y función del ovario, 22
Muerte celular, 46

N

Niveles de inhibina A y B en el fluido folicular de mujeres sometidas a técnicas de reproducción asistida y su correlación con los niveles hormonales y con el embarazo, 93
Niveles de inhibina A y B en el fluido folicular de mujeres sometidas a técnicas de reproducción asistida y su correlación con los niveles hormonales y con el embarazo, 102
Niveles de progesterona y estradiol en tejido folicular, 151

O

Obtención de células de la granulosa-luteínicas humanas. Protocolo de hiperestimulación ovárica, 80
Ovulación, 29

P

Patrones de secreción hormonal durante el ciclo estral. Hormonas esteroideas, 41
Presencia de inhibinas en el MC, 83
Principales características del ovario, 22
Producción de progesterona y estradiol en cultivos de células de la granulosa de ratas, 119
Proliferación celular, 83

R

Ratas tratadas con DES, 81, 85
Ratas tratadas con PMSG, 81, 85
Reactivos, 79
Receptores y transducción de señales, 72
Reclutamiento inicial vs. cíclico, 33
Regulación del desarrollo folicular, 30