

Tesis Doctoral

# Mecanismos moleculares involucrados en la activación de linfocitos T y su relación con procesos de androgenización incrementada

Solano, María Emilia

2010

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

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

Cita tipo APA:

Solano, María Emilia. (2010). Mecanismos moleculares involucrados en la activación de linfocitos T y su relación con procesos de androgenización incrementada. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Solano, María Emilia. "Mecanismos moleculares involucrados en la activación de linfocitos T y su relación con procesos de androgenización incrementada". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**El Autor sólo permite el acceso al Capítulo 1, al Capítulo 2 y al Capítulo 3**

**The author allows access only to Chapter 1, to Chapter 2 and to Chapter 3**



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA  
ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T Y SU RELACIÓN CON  
PROCESOS DE ANDROGENIZACIÓN INCREMENTADA**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires  
en el área: CIENCIAS BIOLÓGICAS

**María Emilia Solano**

Director de tesis: Dra. Alicia B. Motta

Consejero de Estudios: Dr. Enrique Rodriguez

Lugar de trabajo: Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO)-  
Universidad de Buenos Aires (UBA)- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas  
y Técnicas (CONICET).

Buenos Aires, 2010

Los contenidos de esta tesis han sido parcialmente publicados en el siguiente artículo:

Solano ME, Sander V, Wald MR, Motta AB

“Dehydroepiandrosterone and metformin regulate proliferation of murine T lymphocytes.”

*Clinical & Experimental Immunology*, Agosto 2008; 153(2):289-96.

## **“Mecanismos moleculares involucrados en la activación de linfocitos T y su relación con procesos de androgenización incrementada”**

El síndrome del ovario poliquístico (SOP) es un desorden endocrino que afecta a mujeres en edad reproductiva, constituyendo una de las primeras causas de infertilidad por anovulación. Asimismo, los andrógenos promueven la acumulación abdominal de la adiposidad que se relaciona a insulino-resistencia e inflamación crónica sistémica. Tanto a nivel ovárico como sistémico existen evidencias de que el sistema inmune contribuiría a la patogénesis del SOP. Por ello en este trabajo se estudiaron alteraciones inmunes, metabólicas y endocrinas en un modelo murino de SOP por androgenización con dehidroepiandrosterona (DHEA).

A nivel sistémico, se observó mayor peso corporal, insulino-resistencia y parámetros de inflamación crónica incrementados. Los quistes ováricos mostraron una expresión alterada de moléculas de adhesión que coincidió con infiltración leucocitaria, daño tisular, incremento en el estrés oxidativo y disminución de la prostaglandina E<sub>2</sub> ovárica. *In vitro*, DHEA incrementó la expresión de moléculas de adhesión y marcadores de activación en leucocitos pero falló en estimular su proliferación y secreción de citoquinas.

Estos resultados muestran que el sistema inmune colabora en los desórdenes ováricos y sistémicos inducidos en este modelo de SOP. DHEA promueve la activación leucocitaria *in vitro* pero no puede inducir por sí misma una respuesta inflamatoria completa, resaltando la importancia del ambiente endócrino y metabólico en las alteraciones inmunes asociadas a SOP *in vivo*.

**Palabras claves:** SOP, infertilidad, DHEA, hiperandrogenismo, sistema inmune, leucocitos, trastornos metabólicos.

## **“Molecular mechanisms involved in T cell activation. Relation to hyperandrogenization processes”**

Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is an endocrine disease that affects women in their reproductive age. It is one of the main causes of anovulatory sterility and is associated to abdominal fat distribution, which often leads to insulin resistance and chronic inflammation. Increasing evidence points that immune system could contribute to PCOS symptoms both at systemic and ovarian levels. Therefore, the aim of this study was to study the alterations on immune, metabolic and endocrine features induced by dehydroepiandrosterone (DHEA) administration as a murine model of PCOS.

The ovarian cysts showed an altered expression of adhesion molecules, that lead to increased leucocyte infiltration, tissue damage, oxidative stress and reduced levels of prostaglandin E<sub>2</sub> in the ovary. Furthermore, the animals showed increased weight gain, insulin resistance and chronic inflammation markers. *In vitro* assays showed that DHEA *per se* stimulates the adhesion molecules and activation markers expression but fails to induce proliferation and cytokine production.

Therefore, we conclude that immune system is involved both in the ovary and the systemic DHEA-induced alterations. DHEA itself promotes leucocytes activation but fails to elicit a complete inflammatory response, highlighting the role of the endocrine and metabolic environment in PCOS.

**Key Words:** PCOS, sterility, DHEA, hyperandrogenism, immune system, leukocytes, metabolic features.

### **Agradecimientos... muchos, muchos...**

A Ali, por su apoyo y su ayuda, por mostrarme el camino, transmitirme sus experiencias y querer lo mejor para mí.

A Joaquín, Lila y Vale, con quienes comparto el mérito de presentar esta tesis.

A Petra, Khalil, Ana, Miriam Wald y Graciela Cremaschi quienes mediante sus conocimientos, inteligencia y generosidad nutrieron mi trabajo.

A mamá, Jime, Dani, July y papá por TODO!

A Carito, Mari, Vicky, Vale y Nati, mis amigazas, por su apoyo incondicional y sobre todo por su paciencia. A los chicos por su buena onda. A toda mi familia.

A las chicas del 5<sup>to</sup> que nos pasamos al 17, por la compañía en los días largos, el buen humor y la alegría diaria. A Mari, Eve, Moni e Isa, por compartir mis primeros pasos entre los tubos de ensayo y estar siempre presentes.

Al CEFYBO y su gente, por abrirme las puertas. A Daniel y Juan Carlos por tantas veces tanta ayuda.

A mis profesores por transmitirme valores y amor por lo que hago.

*A mi familia y amigos*



## ÍNDICE

Introducción .....	10
Hipótesis .....	36
Objetivos .....	36
Materiales y Métodos .....	39
Resultados .....	58
Discusión .....	109
Conclusiones .....	137
Referencias Bibliográficas .....	142

## **ABREVIATURAS**

- $_4$ A: androstenediona.  
5 $\alpha$ DHT: 5- $\alpha$ -dehidrotestosterona.  
AMH: hormona antimulleriana.  
BMPs: factores de la médula ósea.  
CAMs: moléculas de adhesión celular.  
CD: células dendríticas.  
CG: capa de células de la granulosa.  
ConA: concanavalina A.  
COX: ciclooxigenasa.  
CPAs: células presentadoras de antígenos.  
CRP: proteína C reactiva.  
CSF-1: factor estimulador de colonias-1.  
DHEA: dehidroepiandrosterona.  
DHEAS: DHEA sulfato.  
E<sub>1</sub>: Estrona.  
E<sub>2</sub>: estradiol.  
ERNs: especies reactivas del nitrógeno.  
EROs: especies reactivas del oxígeno.  
FACs: Citometría de Flujo.  
FF: fluido folicular.  
FP: fluido peritoneal.  
FSH: hormona folículo estimulante.  
GDF-9: factor de crecimiento y diferenciación -9.  
GnRH: hormona liberadora de gonadotrofinas.  
GSH: glutatión.  
GSSG: glutatión oxidado.  
HLA-DR: antígeno leucocitario humano- DR  
HOMA-IR: modelo de valoración de la homeostasis de la insulina resistencia.  
ICAM-1: molécula de adhesión intracelular- 1.  
IFN- $\gamma$ : interferón  $-\gamma$ .  
IGFs: factores de crecimiento insulínico.  
IL: interleuquina.  
IL-2R: receptor de interleuquina 2.  
LFA-1: molécula asociada a la función linfocitaria-1.  
LH: hormona luteinizante.  
MDA: malondialdehído.

MEC: matriz extracelular.  
MHCII: complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II.  
NFkB: factor nuclear k B.  
NK: *natural killer*.  
NO: óxido nítrico.  
NOS: óxido nítrico sintasa.  
P: progesterona.  
P1 y P2: protocolo 1 y protocolo 2.  
PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos.  
PGs: prostaglandinas.  
RI: Resistencia a la Insulina.  
SHBG: proteína transportadora de esteroides sexuales.  
SOD: Superóxido dismutasa.  
SOP: Síndrome del Ovario Poliquístico.  
T: testosterona.  
TGF-  $\beta$ : factor de crecimiento tisular  $-\beta$ .  
Th: *T helper*.  
TLR: receptores de tipo Toll.  
TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral  $-\alpha$ .  
VCAM-1: molécula de adhesión al endotelio vascular-1.  
VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular.  
VLA-4: *very late antigen-4*

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1. Síndrome del Ovario Poliquístico**

#### **1.1. Definición e información epidemiológica**

El Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP) afecta entre el 10 y 12% de la población femenina, siendo la patología endócrina más común en mujeres en edad reproductiva y la principal causa de infertilidad por anaovulación (Franks y col., 2008). La gran heterogeneidad de la sintomatología que acompaña al SOP condujo a distintos criterios diagnósticos. El más aceptado en la actualidad fue definido en la reunión de Rotterdam (ESHRE-ASRM Workshop, 2003) como la presencia de 2 de los siguientes desórdenes reproductivos, luego de la exclusión de otras afecciones:

- oligo-anovulación;
- hiperandrogenismo clínico ó bioquímico;
- ovarios poliquísticos.

Esta clasificación da lugar a distintas manifestaciones del SOP que son altamente relevantes para determinar una terapia clínica adecuada. Con tal fin, se han definido 4 fenotipos distintos de SOP (revisados por Motta, 2010) donde el más frecuente (observado en más del 90% de las mujeres SOP) presenta en forma conjunta hiperandrogenismo, anovulación y ovarios poliquísticos. Esta es la forma más severa de SOP y se encuentra habitualmente asociado a obesidad, resistencia a la insulina y riesgo cardiovascular aumentado. En los últimos años este síndrome ha sido considerado como una patología pre-diabética, por lo cual su diagnóstico y tratamiento precoz posee importantes funciones preventivas.

#### **1.2. Hipótesis sobre el Origen de la enfermedad quística**

El hiperandrogenismo ha sido identificado como el carácter central en SOP, no obstante su etiología aún no ha sido dilucidada. Estudios epidemiológicos han demostrado un fuerte componente familiar que podría implicar la asociación de componentes genómicos. Sin embargo su forma de herencia no ha sido esclarecida, la penetrancia es incompleta indicando también efectos ambientales (Xita y col., 2002) y

los esfuerzos por encontrar polimorfismos en genes candidatos han tenido poco éxito, observándose solo cierto grado de asociación en genes relacionados a la biosíntesis de esteroides y al metabolismo de la insulina (Diamanti-Kandarakis y col. (a), 2006).

Asimismo, en los últimos años evidencias provenientes de modelos animales y estudios retrospectivos sugieren que durante la vida prenatal se podrían desencadenar fenómenos epigenéticos que afectarían el desarrollo de los sistemas endócrino y metabólico. Entre los factores desencadenantes se ha sugerido la exposición prenatal a andrógenos, que en modelos experimentales (Abbott y col., 2005) induce (i) inhibición de la retroalimentación negativa de la hormona luteinizante (LH) produciendo su anormal acumulación, (ii) distribución central de la adiposidad que estimula la resistencia a insulina, (iii) hiperandrogenismo y quistes en los ovarios, mimetizando la sintomatología SOP. En humanos, la exposición a andrógenos durante el desarrollo intrauterino provendría de alteraciones a nivel endócrino o génico maternas o fetales (Abbott y col., 2002). Más aún, el bajo peso al nacer junto con los polimorfismos antes mencionados se ha visto asociado a una distribución abdominal de la grasa corporal e insulino resistencia en niñas, desarrollo puberal precoz y presencia de SOP en la vida postpuberal (De Zheger e Ibañez, 2005; Ibañez y col., 2006). Sin embargo, el mecanismo intrauterino que resulta en bajo peso al nacer y SOP no ha sido aún establecido y sus causas son actualmente el eje de numerosas investigaciones que aportarán nuevas claves para entender el origen del SOP.

### **1.3. Modelos de Estudio**

Numerosos trabajos han investigado las alteraciones no solo en la fertilidad sino también en el metabolismo de mujeres SOP dados la estrecha relación entre ambos desórdenes y que el síndrome está asociado con riesgos para la salud a largo plazo (inflamación crónica, diabetes, enfermedad cardiovascular) (Diamanti-Kandarakis y col. (b), 2006). Debido a las limitaciones de los estudios en humanos, se han diseñado una variedad de modelos en diversas especies animales, que logran reproducir distintos aspectos de la compleja sintomatología de este síndrome. Entre los modelos murinos más usados, se encuentran la administración prenatal de andrógenos (revisados por

Abbot y col., 2005) o estrógenos (Deshpande y col., 2000), o postnatal de andrógenos (Knudsen y Mahesh, 1975; Edwards, 1971; Lee y col., 1991; Luchetti y col., 2004).

En el presente trabajo de investigación se ha usado un modelo murino de androgenización con dehidroepiandrosterona (DHEA) durante el período peripuberal. La DHEA es una hormona, considerada por algunos como pro-hormona (Abbott y col., 2002), que en mujeres es sintetizada principalmente por las glándulas adrenales y ovarios. En mujeres, la DHEA sulfato (DHEAS), principal forma plasmática de la DHEA, es el andrógeno más abundante en circulación y en el fluido folicular (Bonzer y col., 2000). De acuerdo a los requerimientos locales diversos tipos celulares, como ser células del tejido adiposo y muscular, de la piel, del sistema inmune e involucradas en el metabolismo de la insulina y glucosa (Casson y col., 1993; Labrie y col., 2005) pueden metabolizarla para formar andrógenos o estrógenos.

Durante la niñez, el incremento de DHEA y otros andrógenos adrenales señala la adrenarca, momento en el que la glándula adrenal completa su maduración. La adrenarca precoz y consecuente exposición temprana a la DHEA (Leung y Robson, 2008) está asociada con la aparición temprana de la pubarca, que a su vez promovería el desarrollo de SOP en la vida post puberal (Ibañez y col., 2000; Abbott y col., 2002; Ibañez y col., 2002; Hanh y col., 2005). Estos resultados le conferirían un rol significativo a la DHEA en inducir el hiperandrogenismo ovárico, la resistencia a la insulina y la formación de quistes ováricos (Ibañez y col., 2002; Shayya y Chang, 2010).

El modelo de androgenización con DHEA tiene su origen en 1962, cuando Mahesh y Greenblatt, lograron aislar DHEA del tejido ovárico de mujeres con poliquistosis ovárica y observaron que al administrarlo a ratas inmaduras se inducía la formación de quistes ováricos y arresto del ciclo reproductivo (Roy y col., 1962). Subsecuentes estudios avalaron este modelo (Lee, 1991; Anderson y col., 1992; Lee, 1998; Henmi y col., 2001; Honnma y col., 2006) y lo señalaron como adecuado para el estudio de la patología quística. En particular, caracterizaron minuciosamente los perfiles hormonales y la morfología ovárica en animales androgenizados, aportando al mismo tiempo evidencias claves para entender la regulación de la esteroidogénesis ovárica (Drummond, 2006). En nuestro laboratorio se adaptó el modelo de

androgenización con DHEA para su uso en ratones (Luchetti y col., 2004), más adecuado para el estudio de componentes inmunes en la patología.

## **2. Ciclo Reproductivo Femenino**

Los ovarios son el principal órgano funcional del sistema reproductivo femenino, con dos roles fundamentales: (i) promover la diferenciación, maduración y liberación de oocitos contenidos en los folículos para su fertilización y (ii) sintetizar y secretar hormonas que son esenciales para el desarrollo folicular y el mantenimiento del tracto reproductivo y sus funciones (Barnett y col., 2006). En la mayoría de los mamíferos placentarios hembras la secreción de hormonas hipofisarias y ováricas, la maduración de oocitos y el desarrollo del endometrio se producen en forma cíclica. Estos ciclos poseen en mujeres una duración mensual, por lo cual se los denomina ciclos menstruales, mientras que en ratones la duración es de entre 96 y 108 horas y, al igual que en otras especies, son llamados ciclo estral.

### **2.1. Desarrollo Folicular**

El desarrollo folicular comienza durante la vida fetal, cuando las células germinales primordiales migran a las gónadas, proliferan y se diferencian para formar un pool finito de oocitos bajo el estímulo de factores liberados por las células somáticas de la gónada (Pesce y col., 2002; Richards y col., 1999). De este modo, durante la etapa perinatal se forman los folículos primordiales constituídos por un oocito, que entra en meiosis y queda arrestado en profase I. Estos folículos (figura 1.A) son recubiertos por un epitelio plano, que eventualmente se convertirá en las células de la granulosa, y una membrana basal (Drummond, 2006; Richards y Pangas, 2010) y se ubican en regiones avasculares de la corteza ovárica, manteniendo un arresto en el crecimiento hasta el momento en que sean reclutados. El desarrollo gonadal continúa, completándose la diferenciación de los ovarios y formando el oviducto y útero en respuesta a vías de señalización específicas (Parma y col., 2006; Tomizuka y col., 2008).

A partir de la etapa puberal, se produce en forma cíclica el reclutamiento de folículos para comenzar la maduración. En un primer paso, una serie de folículos

primordiarles se diferencian a folículos primarios. En este proceso, el oocito desarrolla la zona pelúcida y aumenta su tamaño al mismo tiempo que las células escamosas de la granulosa se transforman a células cuboidales (figura 1.B y C).

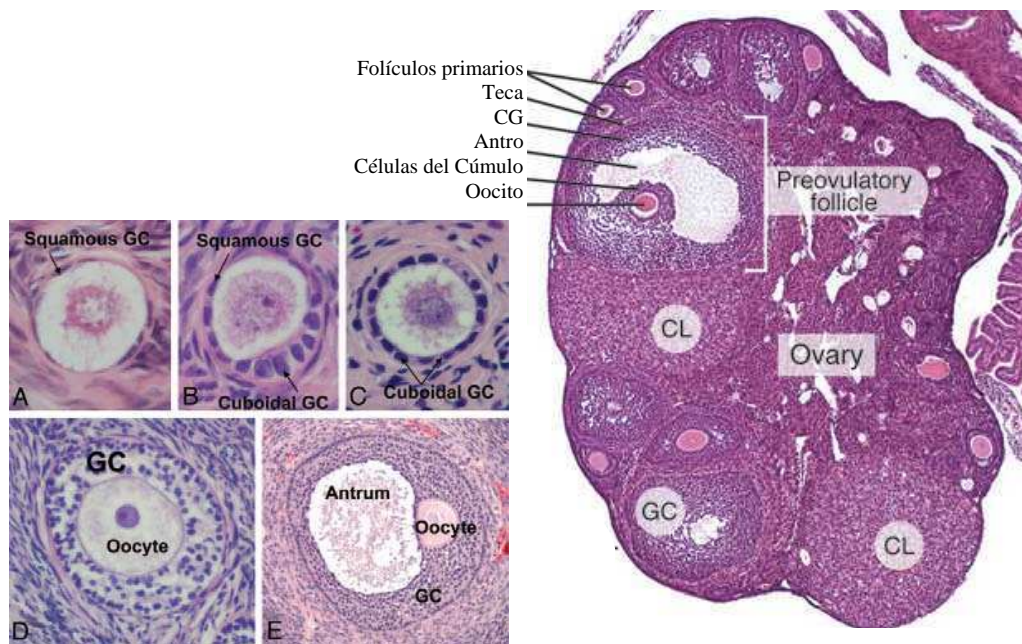
En un segundo paso, se forma el folículo secundario (figura 1.D). Las células de la granulosa proliferan, formando múltiples capas (Hirshfield, 1991) mientras que sintetizan numerosos factores, tales como la activina, los factores de la médula ósea (BMPs), de crecimiento tisular (TGF)- $\beta$  y de crecimiento y diferenciación (GDF)-9. Asimismo, células del estroma ovárico, posiblemente de tipo fibroblástico, son reclutadas para formar una capa rodeando la membrana basal que se diferencian luego a células de la teca (Erickson y col., 1985). Estos primeros estadios de desarrollo son independientes de las hormonas plasmáticas debido a la baja vascularización de los folículos y su escasa expresión de receptores para gonadotrofinas. Durante este estadio las células de la teca proliferan y comienzan a diferenciarse, induciendo la expresión del receptor de hormona luteinizante (LH), de enzimas esteroideogénicas y del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) que promueve la angiogénesis en esta capa de células (Maisonpierre y col., 1997; Taylor y col., 2004).

El folículo terciario (figura 1.D) es caracterizado por la aparición de pequeños espacios que contienen fluido folicular y eventualmente la formación de una única cavidad antral. El fluido folicular está constituido por agua, electrolitos, proteínas séricas y altas concentraciones de hormonas esteroideas y factores secretados por las células foliculares (Hirshfield, 1991; Young y McNeilly, 2010). La capa de la granulosa completa su desarrollo, expresando receptores para la hormona folículo estimulante (FSH), estradiol ( $E_2$ ) y testosterona (T) y la capa de células de la teca presenta una vasculatura altamente diferenciada y expresa receptores de LH.

En esta etapa, la mayoría de los folículos entrarán en atresia, mientras que entre un folículo y una pequeña cohorte de los mismos (dependiendo del número de oocitos a ser ovulados) seleccionados como dominantes sobrevivirán por la influencia de FSH, para formar folículos preovulatorios (Hirshfield, 1991). Estos folículos son los únicos capaces de liberar al oocito por estímulo de LH (McGee y Hsueh, 2000). Durante la ovulación, la membrana basal del folículo se rompe y el oocito es liberado. La remodelación del tejido para permitir la ruptura folicular, así como la posterior



formación del cuerpo lúteo, es característica de una reacción inmunitaria aguda, por lo cual muchos mediadores inflamatorios se encuentran elevados durante este proceso (Bukulmez y Arici, 2000). Finalmente, las células de la teca y granulosa que atraviesan un proceso de luteinización para dar lugar a la formación del cuerpo lúteo (Sander y col., 2008).



**Figura 1: Desarrollo de los folículos ováricos.** Las microfotografías muestran la apariencia histológica y principales estructuras del ovario (F) y folículos en desarrollo (A-E). Los folículos primordiales (A) presentan el oocito rodeado por una capa de células de la granulosa escamosas (squamous GC) que se transforman en células cuboidales (cuboidal GC) en la transición (B) para formar el folículo primario (C). Los folículos secundarios (D) presentan varias capas de células de la granulosa (GC) rodeadas externamente por células de la teca en desarrollo. Los folículos terciarios (E) presentan además el antra (Antrum) que contiene fluido folicular. La foto del ovario (F) muestra un folículo preovulatorio (preovulatory follicle) con sus componentes detallados y varios cuerpos lúteos (A-E adaptado de Maciel y col., 2004; F adaptado de Richards y Pangas, 2010).

Es importante destacar que los procesos de crecimiento y maduración folicular y ovulación dependen altamente del ambiente. Esto es, que los estímulos endócrinos, parácrinos y autócrinos poseen un rol primordial en guiar un desarrollo adecuado. De esta manera, factores plasmáticos como las hormonas hipofisarias y la insulina se combinarán en delicado equilibrio con factores liberados por las células del tejido

ovárico. Entre ellas, el propio oocito, las células de la granulosa, teca, del endotelio y leucocitos asociados a los folículos participan activamente en la síntesis de una compleja red de mediadores tales como hormonas, prostaglandinas (PGs), citoquinas y especies reactivas del oxígeno (EROs) y del nitrógeno (ERNs) (Barnett y col., 2006). Estos factores requieren de una fina sincronización temporo espacial para promover en forma adecuada procesos tales como el reclutamiento, maduración, selección o atresia folicular, ovulación y formación o regresión del cuerpo lúteo (Motta y col., 1999; 2001).

### ***Foliculogénesis en SOP***

Las primeras evidencias de la existencia de un desarrollo folicular alterado en SOP datan de 1982, cuando Hughesdon observó un aumento en el número de folículos primarios, secundarios y terciarios en ovarios poliquísticos comparados a ovarios normales. Estudios subsecuentes (Hovatta y col., 1999; Wright y col., 1999; Maciel y col., 2004) confirmaron estos resultados mostrando que la proporción de folículos que comienzan el crecimiento en SOP es mayor y por lo tanto menor la proporción de folículos que permanecen arrestados como folículos primordiales (Franks y col., 2008), marcando una foliculogénesis alterada desde estadios tempranos de desarrollo.

Para explicar estos desbalances, se propusieron mecanismos tales como efectos sobre la atresia folicular (Webber y col., 2007) y aumento en la proliferación de las células de la granulosa (Stubbs y col., 2007) en los que estarían implicados una baja expresión de AMH (Stubbs y col., 2005), los IGFs y los mismos andrógenos. Más aún, se observó una desregulación en la expresión de genes involucrados en la señalización Wnt y en la formación de la matriz extracelular (Jansen y col., 2004). Estos estudios mostraron además importantes similitudes en la expresión génica de ovarios poliquísticos de mujeres transexuales sometidas a tratamiento androgenizante y en ovarios de mujeres SOP (Jansen y col., 2004). Estos resultados enfatizan la validez de los modelos de androgenización postnatal, como el usado en este trabajo, para estudiar los mecanismos involucrados en la patología ovárica.

Por otro lado, existe evidencia controvertida acerca de si la atresia en folículos en desarrollo se encuentra alterada en SOP (Maciel y col., 2004; Webber y col., 2007). Sin embargo, la misma formación de quistes involucraría cambios en los programas de

desarrollo de folículos que normalmente entrarían en atresia. En humanos la formación de quistes ováricos puede ocurrir fisiológicamente por la falla en la liberación del oocito del folículo preovulatorio, que es reabsorbido luego de algunos ciclos. En el caso de SOP, ambos ovarios presentan numerosos (12 ó más) folículos antrales localizados en la corteza. Estos, así como el aumento del tejido estromal le confieren a los ovarios un tamaño mayor (van Hooff y col., 2000). La estructura de estos folículos se encuentra degenerada, presentado un arresto del crecimiento promediando el desarrollo antral para dar lugar a la formación de quistes (Franks y col., 2008). Dada la falla en el mecanismo de selección de un folículo dominante, estos folículos no llegan a ovular y continúan acumulando fluido folicular que resulta en la expansión del antro. En consecuencia, la capa de células de la granulosa se vuelve progresivamente degenerativa dando lugar a una fina pared (Shayya y Chang, 2010). Pese a su bajo número, las células de la granulosa remanentes tienen un alto potencial esteroidogénico comparado al de células de la granulosa de mujeres normales (Chang y col., 1983, Franks y col., 2008). Eventualmente, el folículo quístico es depletado completamente de células de la granulosa, la pared del folículo se rompe, comenzando la atresia y degenerándose rápidamente (Shayya y Chang, 2010).

Fisiológicamente se considera que una vez que el folículo es activado existen dos destinos posibles: de ser seleccionado como dominante, continuará su desarrollo hasta la ovulación; de no serlo, será programado para su degradación y reabsorción por un proceso llamado atresia. En el contexto de la poliquistosis ovárica, Anderson y col. (1997a) han propuesto un tercer destino posible, en el cual una población de folículos no dominantes podría escapar de la atresia y ser programado para entrar en cistogénesis. Los cambios involucrados en la cistogénesis serían equivalentes a una atresia “atenuada”.

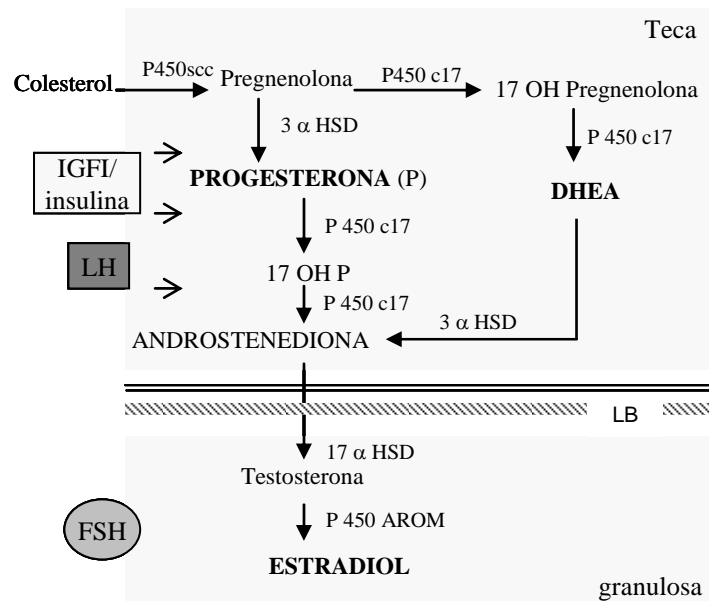
Los animales androgenizados con DHEA mostraron la formación de quistes foliculares en los ovarios con la capa de células de la granulosa disminuída (Lee y col., 1991; Luchetti y col., 2004). Estudios cinéticos de la formación de los quistes indicarían que la reanudación de la meiosis podría ser un punto clave en la determinación del destino del folículo (Anderson y col., 1997a). Como se mencionó previamente, tanto la

ovulación como la oostogénesis implica remodelación de tejido (Bukulmez y Airci, 2000; Jansen y col., 2004). En los folículos ováricos de animales sometidos al modelo de androgenización con DHEA la expresión de las metaloproteinasas MMP2 y MT1-MMP, fisiológicamente involucradas en la ovulación, regresión del cuerpo luteo y apoptosis, se encontraron alteradas (Henmi y col., 2001; Honnma y col., 2006). Asimismo, se observó que la remodelación asociada a la oostogénesis involucra la degeneración de la capa de células de la granulosa por inducción de la apoptosis mediada por la vía FASL/FAS/Caspasa8.

## 2.2. Esteroidogénesis en el Ovario

En el ovario los esteroides sexuales: progestinas, estrógenos y andrógenos, son producidos *de novo* a partir del colesterol por las células foliculares mediante un mecanismo secuencial en el que cada producto es el sustrato del siguiente esteroide en la vía. La inducción de la expresión de las enzimas que catalizan la esteroidogénesis acompaña la maduración de los folículos.

La esteroidogénesis en los folículos antrales y preovulatorios, de mayor actividad biosintética, fue descrita en el modelo “dos células, dos gonadotrofinas” (Armstrong y col., 1979; Hillier y col., 1994). El nombre se refiere a las células de la teca y de la granulosa, que expresan los receptores para LH y FSH, respectivamente, aunque se ha visto luego que no en forma exclusiva, y las enzimas esteroidogénicas en forma incompleta, haciendo imprescindible la cooperación entre ambos tipos celulares para sintetizar estradiol, producto final de la vía (figura 2). Brevemente, la enzima P450c17, fundamental para la síntesis de andrógenos, se encuentra únicamente en las células de la teca y su actividad es estimulada por LH así como por insulina e IGF-I. Los andrógenos formados difunden y en las células de la granulosa son transformados a estrógenos mediante enzimas aromatasas estimuladas por FSH, que no se encuentran en las células de la teca.



**Figura 2. Síntesis de esteroides sexuales en los folículos ováricos antrales explicada de acuerdo al modelo “dos células dos gonadotropinas”.** LH, al igual que insulina e IGF-I, uniéndose a su receptor en las células de la teca estimula la síntesis de andrógenos que difunden a través de la lámina basal (LB) y llegan a las células de la granulosa. FSH estimula la actividad de aromatasas, que convierte los andrógenos en estrógenos (modificado de Armstrong y col., 1979).

### ***Alteraciones de la esteroidogénesis ovárica en SOP***

Las principales alteraciones endócrinas en SOP son elevados niveles de LH y de andrógenos (Franks, 1995; Hahn y col., 2005). En el ciclo reproductivo normal, la secreción hipofisaria de LH y FSH es regulada negativamente por estradiol y progesterona y por la inhibinas, respectivamente, producidas por el ovario. De este modo, en mujeres SOP anaovulatorias la falta de esteroides gonadales producidos en forma cíclica impide de la regulación negativa en la síntesis de LH, colaborando así en sus altos niveles. Sin embargo, no sería el único motivo, dado que mujeres SOP con ciclo ovárico muestran también elevados, aunque menores, niveles de LH (Adams y col., 1986; Franks, 1995). Se han propuesto fallas en el mecanismo de retroalimentación negativa de la progesterona, inducidas por los elevados niveles de andrógenos (Pastor y col., 1998; Eagleson y col., 2000), alteraciones en la inhibición de GnRH (Chhabra y col., 2005), y mecanismos genómicos o epigenéticos (Zhu y col., 2010). Por otro lado, otros estudios atribuyen un rol central en la disregulación hipotálamo-hipofisaria a

factores metabólicos, vinculando por ejemplo la obesidad o resistencia a la insulina con la anaovulación en SOP (Dunaif y col., 1987; Barber y col., 2007).

Los niveles de FSH en mujeres SOP se encuentran normales o ligeramente suprimidos (Franks, 1995), mientras los de inhibina, su regulador negativo, se encuentran aumentados y correlacionan con los niveles de androstenediona (Pigny y col., 1997, 2000). Este incremento de las inhibinas en SOP, podría promover a su vez la producción de andrógenos por las células de la teca en una regulación autócrina/parácrina.

El hiperandrogenismo, resultado de una esteroidogénesis alterada, es la alteración más frecuente en pacientes SOP (Franks, 1995) y se manifiesta clínicamente como hirsutismo, acné y alopecia. La secreción de andrógenos presenta un mayor incremento en mujeres poliquísticas con anaovulación que en aquellas con ciclos regulares (Franks y col., 2008). Este exceso de andrógenos circulantes proviene principalmente del ovario, si bien la glándula adrenal también puede contribuir con la secreción de dichas hormonas (Shayya y Chang, 2010). Las causas del hiperandrogenismo aún no han sido esclarecidas, pero probablemente sean heterogéneas. Estudios retrospectivos y en modelos animales señalan fenómenos epigenéticos (De Zheger e Ibañez, 2005; Abbott y col., 2006) y una fuerte relación con la obesidad e hiperinsulinemia. A nivel ovárico, la insulina, IGFs y LH estimulan la actividad de la P450c17 al mismo tiempo que inducen la proliferación de células de la teca. De este modo contribuyen a la hiperplasia de las células de la teca encontrada en los quistes de mujeres con SOP, que conlleva una mayor liberación de andrógenos (Arlt y col., 2001). Estudios realizados *in vivo* e *in vitro*, muestran que las células de la teca, además de un sobreestímulo a la esteroidogénesis y elevados niveles de enzimas, presentan una alteración intrínseca de su actividad (Gilling-Smith y col., 1994).

Como se resume en la tabla 1, en el modelo de androgenización con DHEA, se observaron niveles incrementados de los andrógenos T, androstenediona ( $4A$ ) y  $5\alpha$ -dehidrotestosterona ( $5\alpha$ DHT) tanto en suero como en fluido folicular, y estos niveles fueron mayores en animales que desarrollaron quistes que en aquellos con ovarios normales (Lee y col., 1991). Los altos niveles de andrógenos serían fundamentales para

mantener la sintomatología quística, dado que de discontinuarse la administración de DHEA los animales recuperan su ciclicidad ovárica (Ward y col., 1978).

Los niveles séricos de DHEA fueron al menos una orden mayor que las restantes hormonas, mostrando que solo una porción de la DHEA administrada es usada como sustrato esteroideogénico. Estudios *in vitro* e *in vivo* mostraron además un aumento en la esteroideogénesis que se relacionó con mayor desarrollo del retículo endoplasmático liso de células de la granulosa (Anderson y col., 1992). Asimismo, es probable que los efectos de la administración de la DHEA resulten de la acción conjunta de esta hormona y sus metabolitos, ya que tratamientos con distintos tipos de andrógenos reproducen en forma similar la morfología quística (Manneras y col., 2007).

A. Hormonas Hipofisarias	LH	FSH	PRL
Suero	++	-	+/-
Fluido Folicular	++	++	++

B. Hormonas Sexuales	Andrógenos				Estrógenos		P
	<sup>4</sup> A	T	5 $\alpha$ -DHT	DHEA	E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	
Suero	++	++	++	+++	+/-	+	+/-
Fluido Folicular	+	+	+		+	+	++

**Tabla 1. Niveles hormonales en animales tratados con DHEA.** Las tablas resumen los niveles séricos de las hormonas LH, FSH, prolactina (PRL), <sup>4</sup>A, T, 5 $\alpha$ -DHT, DHEA, estrona (E<sub>1</sub>), E<sub>2</sub> y progesterona (P). “-“ indica que no hay cambios con respecto a los niveles controles, “+/-“ que son los niveles mayores o menores dependiendo de la estructura ovárica, “+“ un aumento leve a moderado, “++“ un aumento menor a 20 veces los niveles controles y “+++“ un aumento mayor a 20 veces (a partir de resultados reportados por Lee y col. (1991) y Anderson y col. (1997)).

Finalmente, pese a que la DHEA indujo en forma moderada los niveles de E<sub>2</sub>, fue esta la hormona que mejor predijo los procesos fisiológicos de ovulación y cistogénesis, siendo mayor en animales que formaron quistes en ausencia de ovulación.

Estos resultados indican que la hiperandrogenización con DHEA afecta el equilibrio endócrino de manera comparable al SOP (Anderson y col., 1997).

### **3. Alteraciones Metabólicas en SOP**

Como se mencionó previamente, el SOP no constituye solo un problema en la salud reproductiva sino que también está asociado a alteraciones metabólicas como obesidad, resistencia a la insulina y dislipidemia, que resultan en mayor riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular (Magnotti y Futterweit, 2007).

El sobrepeso u obesidad afecta al menos al 30% de las mujeres SOP, alcanzando este porcentaje el 75% en países como Estados Unidos de América, donde la incidencia de SOP acompaña el aumento en la obesidad en esta población durante las últimas décadas (Ehrmann, 2005). El aumento de los niveles circulantes de insulina se encuentra también entre las alteraciones más comunes en mujeres poliquísticas (Hahn y col., 2005) y es el resultado de la resistencia periférica a insulina (RI), que puede verse acompañado por intolerancia a la glucosa (Bergh y col., 1993) aún en mujeres delgadas con SOP (Yilmaz y col., 2005; Gonzalez y col., 2006). De este modo, además de los factores ambientales que regulan los niveles de insulina (adiposidad abdominal, ejercicio físico, etc) se han propuesto que el SOP podría estar asociado a polimorfismos en genes relacionados con la secreción de insulina y con la vía de señalización de la misma (Escobar-Morreale y San Millán, 2007; Abbott y col., 2002).

Dado que solo una proporción de mujeres obesas o IR desarrollan el síndrome (Martinez-Bermejo y col., 2007), estos factores no explican por sí mismos los síntomas del SOP y, como se explicó previamente, un desorden primario en la síntesis de andrógenos sería fundamental (Escobar-Morreale y San Millán, 2007). En rasgos generales, la obesidad y la RI inducirían una manifestación más severa de la sintomatología SOP, promoviendo el hiperandrogenismo, la infertilidad, el riesgo de desarrollar Síndrome Metabólico y enfermedad cardiovascular (Martinez-Bermejo y col., 2007). De este modo, en mujeres SOP obesas la pérdida de peso ha inducido el restablecimiento de la ovulación entre el 30- 50% de las pacientes (Moran y col., 2006) y en aquellas RI (Gambineri y col., 2002; Lord y col., 2003) y en menor medida en pacientes normo-insulínicas (Ibanez y col., 2002; Tan y col., 2007) el tratamiento con



insulino sensibilizantes (acompañado de pérdida de peso en mujeres obesas) lleva también a una importante mejoría de los desórdenes reproductivos.

Estas observaciones estarían relacionadas a que el tejido adiposo, por medio de la secreción de hormonas y adipocinas, puede afectar la función ovárica. Por ejemplo, la leptina afecta la esteroidogénesis y los procesos de dominancia y maduración folicular a nivel del ovario (Duggal y col., 2000; Vrbikova y Hainer, 2009) y facilita la liberación de GnRH y LH a nivel hipotalámico e hipofisario (Yu y col., 1997), entre otros mecanismos.

Más aún la obesidad y acumulación central de la adiposidad es una de las principales causas de RI. La insulina promueve la síntesis de andrógenos por parte de las células de la teca, por lo cual la hiperinsulinemia contribuiría al hiperandrogenismo (Kirschner y col., 1990; Gambineri y col., 2002). Los IGFs y sus proteínas transportadoras que se encuentran involucrados en la esteroidogénesis y folículogénesis están también alterados en SOP colaborando así en la disfuncionalidad de estos procesos (Amato y col., 1999; Spicer, 2004).

Asimismo, se han descritos otros mecanismos por los cuales la obesidad y RI colaboran con el hiperandrogenismo, tales como la reducción de la proteína transportadora de esteroides sexuales (SHBG) (Pasquali y col., 1990; Pasquali, 2006), que conduce a un aumento de la fracción de andrógenos bioactivos.

Finalmente, numerosos trabajos han estudiado los mecanismos que vinculan al SOP con la obesidad y RI. No se han encontrado hasta el momento causas por las cuales el SOP predisponga a la obesidad (Ehrmann, 2005), sin embargo se ha observado que los andrógenos pueden afectar el patrón de distribución de grasas corporales, promoviendo la acumulación del tejido adiposo en la zona abdominal (Bjorntorp, 1996; Elbers y col., 2003; Martínez-Bermejo, 2007). Como se explicó previamente, la adiposidad abdominal, probablemente debido a la secreción más activa de hormonas y adipocinas, promueve el desarrollo de la resistencia a la insulina (Gambineri y col., 2002; Pasquali, 2006). En particular, la secreción de TNF- $\alpha$  por el tejido graso visceral (Hotamisligil y col., 1993) afecta la sensibilidad a insulina en tejidos diana y la funcionalidad de las células B del páncreas (Bloomgarden, 2003), promoviendo la resistencia a la insulina.

Estas evidencias indican que no solo el tejido graso y la hiperinsulinemia contribuirían al hiperandrogenismo, sino que también los elevados niveles de andrógenos propiciarían la adiposidad central y RI, retroalimentándose de este modo las disfunciones endócrino-reproductivas y metabólicas en forma mutua.

#### **4. Rol del Sistema Inmune en SOP**

##### **4.1. Mecanismos Inmunes en el Mantenimiento de la Homeostasis Tisular**

Numerosos trabajos han evidenciado que la participación de leucocitos en respuestas inmunes a patógenos es solo una de sus muchas funciones ya que también participan en numerosos procesos fisiológicos con el fin de mantener la homeostasis (Fidler y col., 1980; Bukovsky y Caudle, 2008). Durante las últimas décadas, la contribución del sistema inmune a la regulación de la proliferación, diferenciación y senescencia de tejidos epiteliales, parenquimales y musculares ha ganado relevancia (Barrett y col., 1992; Bukovsky y col., 2000). De este modo se ha observado que la inflamación no es solamente la respuesta aguda a una lesión o infección, sino que también es una respuesta a la remoción de células. En este caso las respuestas inflamatorias no son desencadenadas solo por estímulos exógenos, sino también por estímulos endógenos como los productos de deshecho de la apoptosis o necrosis.

Los desórdenes metabólicos y reproductivos en SOP se han visto estrechamente ligados a alteraciones del sistema inmune a nivel sistémico, en forma de inflamación crónica (Diamanti-Kandarakis y col. (b), 2006), y a nivel del ovario, presentando alteraciones en las células infiltrantes y expresión de moléculas de adhesión (Gallineli y col., 2003).

La respuesta inmune se desencadena por el reconocimiento de un antígeno, sea endógeno o exógeno, por lo cual los mecanismos involucrados en el mantenimiento de la homeostasis tisular son equivalentes a los de la respuesta a patógenos (Bukovsky y Caudle, 2008). Este reconocimiento se produce con diversa especificidad por receptores en células inmunes. Las células del sistema innato, tales como series las granulocíticas, macrófagos, monocitos, células dendríticas (CD) y *natural killer* (NK) poseen receptores, como los de tipo Toll (TLR), que permiten reconocer en forma poco

específica patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS) (Abbas y col., 2008). En respuesta se inducen mecanismos que, dependiendo de las características de la célula activada y de la activación, involucran secreción de citoquinas, de gránulos citolíticos, cambios en la expresión de moléculas de adhesión e inducción de la fagocitosis, entre otros. En las CD y otras células presentadoras de antígenos (CPA) se induce la maduración, que promoverá la presentación del antígeno, unido al complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHCII), y una adecuada coestimulación a los linfocitos B y T (West y col., 2004).

Las características de la presentación antigénica a células CD4<sup>+</sup> en cuanto al ambiente de citoquinas y moléculas expresadas por la CPA, serán claves para definir el destino de la respuesta inflamatoria (Mukherjee y col., 2005). De esta manera, células CD4<sup>+</sup> activadas en un perfil tipo Th1, conducirán a la activación de células CD8<sup>+</sup> y a una respuesta adaptativa de tipo celular, mientras que un perfil tipo Th2 llevará a la activación de Linfocitos B y a una respuesta de tipo humoral por secreción de anticuerpos (Abbas y col., 2008).

En linfocitos T, la activación inducida por la presentación antigénica desencadena la secreción de IL-2 y la presentación en membrana de su receptor de alta afinidad, induciendo la proliferación linfocitaria en forma autócrina/parácrina para formar clones de linfocitos T efectores (Mukherjee y col., 2005). Los linfocitos CD4<sup>+</sup> son denominados *T helper* porque colaboran con CPA para activar linfocitos B y CD8<sup>+</sup>.

La presentación antigénica se produce principalmente en los órganos linfáticos secundarios, desde los cuales los linfocitos efectores migran hacia el sitio de la lesión guiados por la expresión de moléculas de adhesión (CAMs) en el endotelio, tales como la Molécula de Adhesión Celular Vascular (VCAM)-1 y la Molécula de Adhesión Intercelular (ICAM)-1 (Muller, 2009). La unión de los leucocitos a las mismas por sus propias CAMs permitirá su extravasación al tiempo que activaran vías de transducción de señales intercelulares (deNucci y col., 2006).

Si el proceso inmune lleva a la eliminación del antígeno, la inflamación se resuelve por una serie de mecanismos que implica secreción de citoquinas supresoras y apoptosis de células efectoras (Abbas y col., 2008). Si, por el contrario, pese a los mecanismos supresores se mantiene el estímulo antigénico, la inflamación continúa

indeterminadamente llevando a un estado de inflamación crónica (Ferrero-Miliani y col., 2006).

#### **4.2. Inflamación Crónica Sistémica**

La inflamación crónica sistémica puede ser definida como un incremento entre 2 y 4 veces de los niveles circulantes de citoquinas proinflamatorias y anti-inflamatorias, de antagonistas naturales de las citoquinas, de las proteínas de fase aguda así como incrementos menores en la abundancia de neutrófilos y células NK (Brüünsgaard y Pedersen, 2003; Huang y Glass, 2010). Entre las complicaciones asociadas a la inflamación crónica se observa que la actividad sostenida del sistema inmune lleva al daño al tejido, mediado en muchos casos por la acumulación de especies reactivas del oxígeno (Ferrero-Miliani y col., 2006).

Asimismo, la inflamación crónica puede ser localizada, cuando se produce en el sitio de la lesión, o sistémica cuando el incremento de mediadores inflamatorios y células inmunes se observa también a nivel plasmático, frecuentemente involucrando al endotelio vascular.

#### ***Inflamación Crónica en SOP***

La asociación de la inflamación crónica sistémica con obesidad y resistencia a la insulina ha sido observada en diversas patologías (Brüünsgaard y Pedersen, 2003; Festa y col., 2006; Huang y Glass, 2010). Tradicionalmente es identificada como un desorden de la inmunidad innata, sin embargo, nueva evidencia muestra también un rol significativo de la respuesta adaptativa, determinado probablemente por la alta interrelación entre ambos tipos de respuesta inmune (Wu R. y col., 2007; Orio y col., 2005).

Se han descrito distintos mecanismos que relacionan a los productos de secreción del tejido graso y a la insulina con el desencadenamiento de la respuesta inmune. Entre ellos, el tejido graso visceral produce adipocinas, algunas de ellas citoquinas con importantes funciones inmunomoduladoras como el TNF- $\alpha$  (Hotamisligil y col., 1993). Más aún, en obesidad se observa un incremento en la activación y

diferenciación a “M1” en los macrófagos residentes en tejidos metabólicos, tales como el adiposo y el hígado (Fuentes y col., 2010). Los macrófagos M1 son responsables de la secreción de mediadores inflamatorios que promueven la inflamación crónica de bajo grado en obesidad, diabetes y otros desórdenes metabólicos (Odegaard y Chawla, 2008).

Asimismo, la obesidad incrementa los ácidos grasos libres, que actúan como ligandos primarios de los receptores de tipo Toll (TLR) (Schaeffler y col., 2009). La activación de los TLR desencadena la respuesta inmune innata, afectando también la inmunidad adaptativa, y constituyendo así un nexo directo entre los sistemas que modulan la obesidad y la inflamación.

Finalmente, los mecanismos de señalización intracelular que gobiernan la homeostasis de la glucosa y la inflamación presentan un gran entrecruzamiento y comparten múltiples mediadores (Bloomgarden, 2003; Sathyalapan y Atkin, 2010). A partir de estos y otros resultados, algunos autores han propuesto que la RI posee una relación causal con la inflamación (Bloomgarden, 2003).

En los últimos años, la alta incidencia de alteraciones metabólicas en pacientes SOP llevó a estudiar la presencia de inflamación crónica, encontrándose altos niveles plasmáticos de marcadores de inflamación, como ser proteína C reactiva (CRP), formas solubles (s) de CAMs, las citoquinas IL-6 y TNF- $\alpha$  y leucocitos (Diamanti-Kandarakis y col., 2006 (b); revisados por Sathyapalan y Atkin, 2010).

Existe evidencia controvertida acerca de la conexión entre la inflamación crónica sistémica y la disfunción neuroendócrina en SOP, siendo la primera atribuida frecuentemente a las alteraciones metabólicas asociadas a este síndrome: resistencia a la insulina, metabolismo lipídico y distribución de la grasa corporal (Gonzalez y col., 1999; Kelly y col., 2001; Amato y col., 2003). En un esfuerzo por discernir los factores involucrados en la inflamación crónica sistémica en SOP, numerosos estudios se focalizaron en correlacionar marcadores de inflamación con el peso, resistencia a la insulina y hormonas que se encontraran alteradas en SOP. En la tabla a continuación se han resumido los resultados de los reportes más salientes.

Marcador	Peso	RI	HN	SOP	Autor (y col.)
CRP	xxx	x		xx	Kelly, 2001; Puder, 2005; Mohlig, 2004; Escobar-Morreale, 2003; Benson, 2007; Gonzalez, 1999
Leucocitos	xx	x		x	Puder, 2005; Escobar-Morreale, 2003; Orio, 2005; Benson, 2007
Linfocitos		x			Orio, 2005
Macrófagos		x			Orio, 2005
TNF- $\alpha$	xx	x		xx	Puder, 2005; Escobar-Morreale, 2003; Amato, 2003; Gonzalez, 1999
IL-6	xxx			x	Mohlig, 2004; Escobar-Morreale, 2003; Amato, 2003; Benson, 2007
ICAM-1s	x				Escobar-Morreale, 2003;

**Tabla 2. Marcadores de inflamación alterados en SOP.** Cada x marca la correlación encontrada entre los marcadores de inflamación con factores metabólicos y endócrinos alterados en SOP: obesidad (Peso), RI y diversas hormonas (HN). Si luego de controlar la variación por los factores mencionados se mantuvieron las diferencias entre mujeres SOP y controles, se indicó que la inflamación depende de SOP.

Como se puede observar los resultados obtenidos por los trabajos fueron contradictorios. En la mayoría de los reportes la inflamación se correlacionó con la obesidad y, en menor medida, con la RI o fue atribuido al SOP. Aún en mujeres SOP delgadas, se observaron tanto marcadores de inflamación y niveles de TNF- $\alpha$  como indicadores de resistencia a la insulina aumentados sin hallar necesariamente una relación causal entre ambos (Gonzalez y col, 1999). Esto podría indicar una disfunción subyacente en el tejido adiposo en SOP (Carmina y col., 2005) que mediante la producción alterada de adipocinas y adiponectina entre otros afectaría la homeostasis inmune y metabólica, en presencia o ausencia de obesidad. Más aún, Sathyalapan y Atkin (2010) han propuesto que en mujeres SOP delgadas se produciría también una redistribución de la grasa corporal, llevando a una acumulación central, insuficiente para alterar el peso pero capaz de afectar el metabolismo.

Asimismo, se observaría nuevamente un proceso de retroalimentación debido a que las citoquinas y otros mediadores inflamatorios actúan sobre numerosos órganos y tejidos y afectan el metabolismo, por ejemplo disminuyendo la sensibilidad a la insulina y alterando el metabolismo de las lipoproteínas.

Por último, es interesante destacar que en ningún caso se encontraron correlaciones de estos marcadores con los niveles hormonales (Tabla 2), pese a que, como se mencionó previamente, los andrógenos están relacionados a una alteración de la función y distribución del tejido graso. Esto es además interesante porque una

variedad de células inmunes expresan receptores para andrógenos y otras hormonas alteradas en SOP, que podrían afectar el balance inmune (Du y col., 2001).

En los modelos experimentales de androgenización postnatal se observaron algunos desórdenes metabólicos e inflamatorios comparables a los observados en SOP. En particular, en el modelo de androgenización por DHEA se observaron previamente niveles incrementados de glucosa sérica, altos niveles séricos de TNF- $\alpha$ , y alteraciones en los niveles de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en ganglio (Luchetti y col., 2004; Sander y col., 2006) sugiriendo que el presente sería un modelo adecuado para estudiar la relación entre alteraciones metabólicas e inmunes.

### **4.3. Regulación Inmune de los Procesos Ováricos**

En el ovario, las células y moléculas relacionadas al sistema inmune cumplen una importante función acompañando el desarrollo folicular, la formación y reabsorción del cuerpo lúteo e incluso la formación de gametas (Bukovsky y Caudle, 2008). Las características anatómicas y vasculares del ovario permiten un importante tráfico linfocitario (Bukulmez y Arici, 2000), que se refleja en la presencia de un alto número y variedad de células en el tejido ovárico y variaciones en el flujo linfático en respuesta a procesos fisiológicos (Minegishi y col, 2002). Los leucocitos tienen la capacidad de actuar en forma parácrina sobre distintos procesos ováricos mediante la secreción citoquinas (Lawler y col., 1999; Chen y col., 2009) y otros mediadores inmunes (Nathan, 1987; Sprugel y col., 1987; Sunderkotter y col., 1994; Wu y col., 2004), así como, a su vez, el tejido puede regular la función leucocitaria mediante su propia liberación de citoquinas, hormonas, PGs, EROs (Baraño y col., 1995; Minegishi y col., 2002) y otros mensajeros a los que las células inmunes sean sensibles. Más aún, las variaciones cíclicas en la localización de las células inmunes en respuesta a procesos como la maduración folicular, ovulación y formación del cuerpo lúteo así como la expresión de CAMs y quimioquinas (Bonello y col., 2004; Wong y col., 2002) por parte del tejido sugerirían que sus funciones implican efectos parácrinos e interacciones célula-célula. La importancia del conjunto de estas interacciones queda revelado en numerosos trabajos en los que la desregulación, bloqueo o depleción de factores o células inmunes,

lleva a la pérdida de ciclicidad, disfunción folicular y/o esteroidogénica (Jasper y col., 2000; Van der Hoek y col., 2000).

La evidencia acumulada a lo largo de las últimas décadas, permitió sugerir una dinámica de la modulación del sistema inmune en las distintas fases del desarrollo folicular (Bukulmez y Arici, 2000; Wu y col., 2004).

Durante el período preovulatorio se observa abundancia de macrófagos y neutrófilos principalmente localizados en la capa de células de la teca y en la médula del ovario (Brannstrom y col., 1993; Van der Hoek y col., 2000; Jasper y col., 2000). Un pequeño número de folículos en crecimiento y folículos en estadios atrésicos avanzados (Brannstrom y col., 1993; Oksjoki y col., 2001) presentan también macrófagos infiltrantes. En menor proporción y formando pequeños grupos en las capas de la teca se observaron linfocitos T, más frecuentemente CD8<sup>+</sup> que CD4<sup>+</sup> (Petrovska y col., 1996).

La inducción de la ovulación ha sido frecuentemente descrita como un proceso inflamatorio por sus características en cuanto a cambios vasculares e influjo de leucocitos en el tejido (Bukovsky y Presley, 1979). Luego del pico de LH, justo antes de la ovulación ratas y humanos, aumenta la migración de leucocitos en las capas de la teca y hacia la granulosa (Brannstrom y col., 1993; 1994). Esto iría acompañado de la liberación de prostaglandinas y sustancias vasoactivas que inducirían vasodilatación y aumento de la permeabilidad sanguínea llevando a la formación de edema (Tanaka y col., 1989; Abisogun y col., 1988). Al mismo tiempo la secreción de citoquinas por parte de los leucocitos presentes así como por parte de otros componentes tisulares (Baraño y col., 1995) aumentarían el reclutamiento y activación de más leucocitos circulantes. Estos, *in situ*, colaborarían liberando enzimas proteolíticas (Oksjoki y col., 2001; Curry y Osteen, 2001) para permitir la lisis de la membrana basal y desmembramiento de componentes del tejido conectivo en la pared del folículo, migración de células inmunes hacia la granulosa y liberación del oocito.

El proceso se continúa con la formación y más tardíamente con la regresión del cuerpo lúteo, que es involucran a su vez complejos procesos inmunes (Petrovska y col., 1992).



**Homeostasis Inmune en Ovarios Poliquísticos**

Varios de los tratamientos que restauran la ovulación en SOP, como ser la administración de ligandos de PPAR- $\gamma$  o de dexametasona, o la laparoscopia, tienen efectos inmunomoduladores (Wu y col., 2004). Estos resultados sumados a la capacidad reguladora del sistema inmune sobre diversos procesos ováricos, le conferirían un rol clave en la disfunción reproductiva en SOP. En las últimas décadas, varios estudios han dado cuenta de un ambiente inmune alterado en ovarios de mujeres poliquísticas. Dada la complejidad y variabilidad de las alteraciones observadas, se las expresa resumidas en la tabla a continuación.

Muestra	Factor	Alteración	Autor (y col.)
FF	IL-6, IL-13, TNF- $\alpha$	+	Gallinelli, 2003
	IL-12	-	
	T CD8	+	
Tejido	T CD4, T HLA-DR	-	Wu R., 2007
	CD45, CD45RA, CD14, CD15, CD3, CD4, CD57, MHCII CD45RO	SC - en Teca	
FF	TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-6, CSF-1, IL-8	SC	Jasper y Norman, 1995
FF	TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$	SC	
Tejido	TCR $\beta$ , MHCII	-	Jansen, 2004
FF/Hnas	TNF- $\alpha$ , IL-6	+	Amato, 2003
	IL-6	SC	Zolti, 1992
FF	CSF-1	+	
FF/Hnas	TNF- $\alpha$	-	Onalan, 2005
	Fa, FasL	SC	
FF/Hnas	LIF	-	Ledee-Bataille, 2001
	TNF- $\alpha$ , IL-1, IFN- $\gamma$	SC	
FP	IL-6	-	Omu, 2003
	TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-8	SC	

**Tabla 3: Niveles de citoquinas y leucocitos en ovarios.** Los distintos tipos de muestras: FF (fluido folicular), FP (fluido peritoneal) y biopsias de tejido, tomadas en pacientes sin tratamiento o bajo tratamiento hormonal (Hnas). + muestra un aumento y - una disminución con respecto a los valores controles, mientras que SC indica sin cambios. Los factores representan productos de secreción leucocitarios así como receptores de membrana usados para la caracterización de las poblaciones celulares.

Como se puede observar, el estudio del contenido o expresión de células inmunes y sus productos de secreción en el fluido folicular y tejido ovárico de mujeres SOP arrojaron resultados variables y en muchos casos contrapuestos. No se observaron

diferencias concluyentes en los niveles de citoquinas proinflamatorias, y la única tendencia que podría destacarse es mayores niveles de IL-6 en FF.

Cabe destacar que los protocolos de obtención de los tejidos son poco comparables entre reportes y que la baja accesibilidad a un tejido como es el ovárico, determinó que en general se trabajara con bajo número de pacientes. Estas limitaciones, propias de estudios en humanos, destaca la importancia de los estudios realizados sobre alteraciones inmunes en ovarios en modelos animales SOP (Lu y col., 2002; Deshpande y col; 2000). En el modelo de SOP por androgenización con DHEA se observó previamente infiltración celular en folículos que degeneran a quistes (Anderson y col, 1997), y aumento de la relación entre células CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> (Luchetti y col., 2004).

Finalmente, las observaciones realizadas en mujeres SOP y modelos animales podrían sugerir que un desarrollo folicular adecuado depende de niveles altamente regulados de citoquinas y factores de crecimiento, y que pequeñas alteraciones en sus concentraciones ó falta de sincronización en la secreción podrían alterar el delicado equilibrio que requieren los procesos de reclutamiento y maduración folicular y ovulación afectándolos en forma radical.

## **5. Factores Regulatorios en Procesos Ováricos e Inmunes**

Como se explicó previamente, la progresión adecuada del desarrollo folicular en el ovario dependen en gran medida del estricto balance de una compleja red de estímulos, entre los que ya se mencionaron los factores inmunes. Las PGs, EROs y ERNs constituyen mediadores con funciones regulatorias sobre la función ovárica y el sistema inmune, presentando a su vez múltiples interacciones.

### **5.1. Prostaglandinas**

Los “eicosanoides” comprenden a las familias de prostaglandinas, leucotrienos y compuestos similares que derivan de ácidos grasos esenciales de veinte carbonos. Las prostaglandinas F<sub>2</sub> α (PGF<sub>2α</sub>) y E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) son prostanoides producidos por numerosos tipos celulares ováricos, entre ellos las células de la granulosa, de la teca y del cuerpo lúteo en sus distintos estadios (Gelety y Chaudhuri, 1992). La PGE<sub>2</sub>, al igual que las otras PGs, es producida a partir de ácido araquidónico (AA) por la enzima

ciclooxigenasa (COX). Su síntesis es determinada por los niveles de AA libre y de COX-1 y COX-2, la primera constitutiva y la segunda inducible por factores tales como citoquinas inflamatorias (Ando y col., 1998). Pese a que los mecanismos de regulación no son completamente entendidos, se ha observado que el pico de gonadotrofinas previo a la ovulación induce rápidamente la síntesis de PGE<sub>2</sub> en las células de la granulosa y la mantiene por varias horas (Clarck y col., 1978), lo que se relaciona con un aumento en los niveles de COX-2 (Duffy y Stouffer, 2001). Su síntesis es también modulada por factores tales como el de crecimiento epidérmico (EGF) y fibroblástico (FGFs) e IGF-1 (McArdle y Holtorf, 1989) y esteroides sexuales (Hellberg y col., 1996).

De este modo, PGF<sub>2α</sub> y PGE<sub>2</sub> se encuentran involucradas en la regulación parácrina de varias funciones ováricas, tales como la ruptura de la pared folicular asociada a la ovulación (Husein y Kridli, 2003; Medan y col., 2003) y la luteólisis (Motta y col., 1999, 2001), cumpliendo frecuentemente funciones antagónicas. Por otro lado, tienen importantes funciones inmunomodulatorias y la PGE<sub>2</sub>, considerada frecuentemente como inmunosupresora (Wojtowicz-Praga, 1997; Kuroda y Yamashita, 2003), regula los niveles de linfocitos T durante el ejercicio físico excesivo (Lakier, 2003), y suprime la diferenciación de células dendríticas asociadas a tumores (Yang, 2003).

## **5.2. Especies Reactivas del Oxígeno y del Nitrógeno**

En las células de metabolismo aeróbico se producen EROs y ERNs como intermediarios o subproductos de reacciones vitales. Normalmente, estas pasarían rápidamente a un producto más estable, pero el desacople o disfunción de estos procesos o la disminución de especies capaces de neutralizarlas puede llevar a su producción exacerbada y acumulación. En ese caso, estas especies reaccionan con otras biomoléculas, modificando su estructura e induciendo frecuentemente su disfunción. A lo largo del tiempo, el daño oxidativo se acumula y deteriora el metabolismo celular disminuyendo su eficiencia y pudiendo incluso llevar a la apoptosis (Caia y col., 1998). Asimismo, grandes cantidades de EROs y ERNs son producidas por el sistema inmune durante la inflamación para mediar importantes funciones citolíticas y quimiotácticas (Minegishi y col., 2002; Wu y col., 2004; Izumo y col., 2009). La pérdida de la

homeostasis de óxido-reducción celular, definida como estrés oxidativo, ha sido relacionado con diversas patologías y alteraciones metabólicas como la diabetes, inflamación crónica y enfermedad cardiovascular (Bloomgarden y col., 2003). En el caso de la poliquistosis ovárica, se ha observado un aumento en el estado oxidante e insuficiencia en el estado antioxidante sistémico en pacientes, que correlaciona con los niveles de insulina circulantes y la resistencia a la insulina (Maser y col., 2002; González y col., 2005).

Por otro lado, las EROs y las ERNs en sí mismas juegan un rol importante como segundos mensajeros en vías de señalización celular. Pueden actuar inter e intracelularmente como segundos mensajeros que regulan la función de tirosina fosfatasas (PTPs), tirosina kinasas, factores de transcripción, kinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y canales iónicos, entre otros (Lee y Esselman., 2002; Ruiz-Ramos y col., 2009). En el caso de los linfocitos T y otros leucocitos, la proliferación y activación puede ser regulada por el balance oxidante-antioxidante celular (Tripathi y Hildeman, 2004). De igual manera, una fina regulación en la producción de EROs y ERNs es necesario para mantener un adecuado desarrollo folicular y luteal, permitir la ovulación y promover la atresia (Sugino y col., 1996; Minegishi y col., 2002, Motta y col., 2001; Turton y Luderer, 2006).

Las EROs y las ERNs pueden reaccionar con ADN, proteínas y lípidos, siendo especialmente susceptibles los nucleótidos en todos sus componentes, los carbonos cuaternarios de las proteínas y cadenas laterales, y los ácidos grasos poliinsaturados.

Los ácidos grasos poliinsaturados que componen las membranas biológicas se encuentran inmersas en un fluido con alto contenido de oxígeno y metales, por lo cual están muy expuestas al ataque oxidativo. El daño en las células se puede producir por una vía que depende esencialmente del deterioro de las membranas biológicas, mediante la unión covalente de los radicales libres a enzimas o receptores de membrana, a ácidos grasos poliinsaturados y la peroxidación lipídica de ácidos grasos poliinsaturados, entre otros. A su vez, los aldehídos derivados o el malondialdehído (MDA), subproducto de las reacciones de lipoperoxidación, pueden reaccionar con los grupos sulfhidrilos de proteínas con distintas funciones, causando cross linking intra e intermolecular. Este deterioro se refleja en la modificación de la reactividad, excitabilidad, estructura,

funcionamiento, carácter antigénico y perjuicio de los mecanismos de transporte en las membranas (Halliwell y Gutteridge, 1984).

Para evitar los daños producidos por la acumulación de EROs, en la célula existen numerosos mecanismos protectores que actúan como antioxidantes endógenos reaccionando con radicales libres y otras especies reactivas para impedir la oxidación de moléculas estructurales.

Los antioxidantes enzimáticos, como las Catalasas, que reaccionan con el peróxido de hidrógeno, las glutatión peroxidasa, reductasa y transferasa, que intervienen en la regeneración del glutatión (GSH:  $\gamma$ -glutamil cisteinil glycina), catalizan la transformación de un compuesto radicalario o inestable a uno de naturaleza estable y no reactivo, cortando así las reacciones en cadena.

Las moléculas antioxidantes orgánicas, como el GSH y algunas vitaminas y pigmentos, reaccionan con EROs y ERNs oxidándose (Aten y col., 1992). El glutatión, tiol tripeptídico, es la molécula pequeña de mayor abundancia en células animales. Existe evidencia de inconvenientes en el metabolismo de GSH que están directamente relacionados a la apoptosis o activación de células T (Aukrust y col., 2003; Franco y Cidlowski, 2006) y que la proliferación de linfocitos T es regulada por una vía sensible a los tioles que involucra IL-2 (Hadzic y col., 2005). Por estas razones, el GSH se ha propuesto como agente terapéutico en enfermedades con componentes inmunes (Aukrust y col., 2003). Es fundamental en el desarrollo folicular, y su depleción lleva a la apoptosis y atresia (Turton y Luderer, 2006). Al disminuir la concentración de GSH por la neutralización de EROs y ERNs, el glutatión oxidado (GSSG) es rápidamente reciclado a GSH en forma enzimática, mientras que se desinhibe su síntesis *de novo* y aumenta su producción.

## **Hipótesis**

El hiperandrogenismo no solo induce la disfuncionalidad ovárica y la formación de quistes foliculares sino también afecta el sistema metabólico. Estas alteraciones tienen como denominador común una desregulación del sistema inmune que se evidencia a nivel sistémico como inflamación crónica y a nivel ovárico como desbalances en componentes inmunoregulatorios, tales como células inmunes, moléculas de adhesión, prostaglandinas y especies reactivas del oxígeno, que colaboran en la cystogénesis y pérdida de la funcionalidad.

Nuestra hipótesis de trabajo es que el hiperandrogenismo afecta el equilibrio endócrino, metabólico e inmune a nivel sistémico y ovárico. Estos efectos adversos están parcialmente mediados por la acción directa de la dehidroepiandrosterona sobre células inmunes.

## **Objetivos Generales**

- Estudiar las alteraciones endócrinas, metabólicas y ováricas inducidas por DHEA en un modelo de SOP en ratón.
  
- Evaluar los efectos sobre componentes del sistema inmune en el ovario y parámetros de inflamación crónica a nivel sistémico del hiperandrogenismo inducido por DHEA.
  
- Determinar cuales de estos efectos están relacionados a la acción directa de la DHEA sobre células inmunes.

A partir de estos objetivos generales, se determinaron los siguientes **objetivos específicos**:

1. Primera parte: estudios in vivo

1.1. Determinar en dos diseños experimentales de androgenización propuestos:

1.1.1. El ciclo estral durante el tratamiento

1.1.2. La morfología de los ovarios, frecuencia y características morfométricas de quistes en comparación a folículos antrales.

1.1.3. Seleccionar a partir de los resultados obtenidos el modelo más adecuado para los estudios subsiguientes.

1.2. Evaluar los efectos inducidos por la androgenización con DHEA sobre parámetros metabólicos e indicadores de la inflamación crónica sistémica.

1.2.1. Estudiar la ganancia de peso durante el tratamiento

1.2.2. Evaluar la Resistencia a la insulina de acuerdo a los niveles de glucosa e insulina circulantes y el cálculo del HOMA-IR.

1.2.2. Cuantificar los niveles séricos de estradiol

1.2.3. Determinar los niveles plasmáticos de células NK, NK CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>.

1.2.4. Determinar la producción de citoquinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, MCP-1 y IL-12p70 por parte de células peritoneales.

1.3. Estudiar los efectos del hiperandrogenismo inducido con DHEA sobre el sistema inmune ovárico y factores regulatorios.

1.3.1. Evaluar la expresión de las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 en ovario y presencia de Células dendríticas, macrófagos y linfocitos CD4<sup>+</sup>.

1.3.2. Determinar los niveles de GSH, la actividad de la catalasa y la peroxidación lipídica en ovarios.

1.3.3. Cuantificar la producción de Prostaglandina E por parte del tejido ovárico.

## 2. Segunda Parte: Estudios *in Vitro*

Evaluar en cultivos leucocitarios tratados con distintas concentraciones de DHEA indicadores de la activación y función linfocitaria.

2.1. Estudiar la expresión de marcadores de activación y moléculas de adhesión en poblaciones celulares claves para la respuesta inmune

2.1.1. Determinar la fracción de células T ( $CD3^+$ ), diferenciando en Th ( $CD4^+CD3^+$ ) y T supresoras/citotóxicas ( $CD8^+CD3^+$ ) y su expresión de IL-2R $\alpha$  y de las moléculas de adhesión VLA-4 y LFA-1.

2.1.2. Determinar la fracción de células de la inmunidad innata, diferenciar los macrófagos ( $F4/80^+$ ) y estudiar su expresión de VLA-4. Cuantificar la fracción de células dendríticas ( $CD11c^+$ ), monocitos y granulocitos ( $CD11b^+ F4/80^-$ ) y su expresión de VLA-4 y LFA-1.

2.2. Evaluar la proliferación celular en presencia y ausencia de mitógenos.

2.3. Cuantificar las citoquinas IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-4 en medio de cultivo.

2.4. Determinación de la viabilidad celular luego de los tratamientos.

2.5. Determinación de los niveles de GSH, Parámetros Relacionados a las EROs, ERNs y Estrés Oxidativo.



## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Animales**

En el presente trabajo se utilizaron hembras de ratón de la cepa Balb/c de 23 a 30 días de edad. Los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura (22° C) e iluminación (14 horas luz, 10 horas oscuridad) con agua y comida (Purina Rat chow) *ad libitum*. Los estudios llevados a cabo fueron aprobados por el Comité Independiente de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires.

### **2. Estudios *in vivo***

#### **2.1. Modelo de Estudio**

Para la inducción de la sintomatología SOP se utilizó el modelo de hiperandrogenización con dehidroepiandrosterona (DHEA), propuesto por Lee y col. (1998) y modificado por Luchetti y col. (2004) para su aplicación en ratones. Este modelo consiste en la administración diaria de DHEA durante 20 días. La hormona, diluída en 0.1 ml de aceite vegetal, fue inyectada a los animales del **grupo DHEA** en forma subcutánea en una dosis de 60 mg/kg peso corporal por día. Los animales del **grupo control**, comparables a los androgenizados en peso y edad al comienzo del experimento, fueron inyectados s.c. con 0.1 ml de aceite vegetal por día por el mismo período de tiempo.

Dado que el SOP está asociado con producción excesiva de andrógenos durante la pubertad temprana (Apter, 1998), se comenzó con la administración de los tratamientos durante el período peripuberal. Se estableció como edad óptima para el comienzo de tratamiento aquella que fuera más efectiva en reproducir la sintomatología ovárica. Para ello se ensayaron los siguientes protocolos:

Protocolo 1: el tratamiento comenzó en el día  $24 \pm 1$  de edad y se continuó hasta el día  $44 \pm 1$ .

Protocolo 2: el tratamiento comenzó en el día  $30 \pm 1$  de edad y se continuó hasta el día  $50 \pm 1$ .

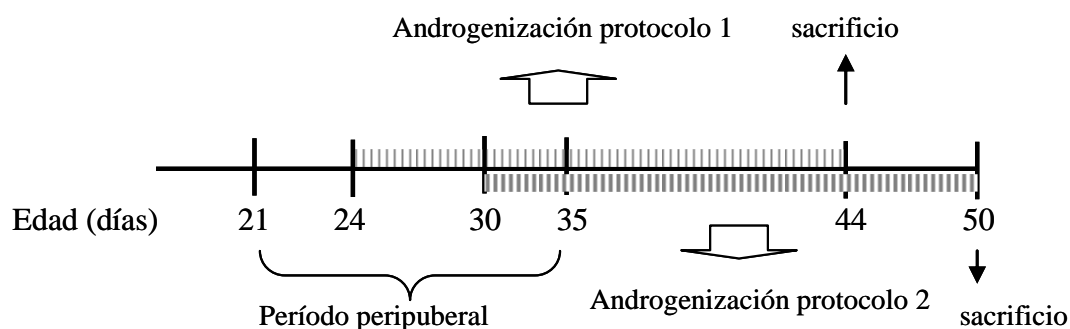


Figura 1: Esquema de los protocolos usados para la administración de DHEA ó vehículo por 20 días. Los animales fueron tratados desde el día 24 (protocolo 1) ó 30 de edad (protocolo 2). Los animales controles de cada protocolo fueron tratados con aceite en forma simultánea. El gráfico representa en una línea de tiempo los procedimientos llevados a cabo a partir del comienzo del período puberal (d21, destete) y hasta el momento de sacrificio.

## **2.2. Procedimientos y Obtención de las Muestras**

Durante el tratamiento se determinó el peso de los animales cada tres días y se realizaron extendidos vaginales diariamente. Estos últimos fueron fijados por inmersión en acetona ( $-20^{\circ}$  C) para ser luego teñidos con hematoxiina-eosina y determinar el estadio del ciclo estral por sus características citológicas.

En el día 20 de tratamiento los animales fueron inyectados i.p. con una solución de xilacina 100 mg/kg y ketamina 20 mg/kg en PBS. Una vez inducida la anestesia se obtuvieron muestras de sangre y células peritoneales y, luego de eutanizar los animales por dislocación cervical, se extrajeron los ovarios.

### *Determinación de los Niveles de Glucosa e Insulina en Ayunas*

En el día 20 de tratamiento, 6 animales adicionales de cada grupo fueron privados de alimento por 6 horas (8 A.m.- 2 P.m.; Andrikopoulos y col., 2008). Luego de este

período, se tomaron muestras de sangre de la vena de la cola. La glucosa en sangre fue determinada en el momento en una gota de sangre mediante tiras *precision extra glucose strips*, en el monitor *Accu-check Advantage II Blood Glucose Monitor* (Roche Diagnostics). El volumen de sangre restante fue centrifugado inmediatamente y el suero mantenido a -70° C hasta la determinación de insulina.

### **2.3. Procesamiento de las muestras**

*Sangre*: fue obtenida por punción retro-orbital y usada para obtener:

i. suero: la sangre fue centrifugada durante 20 minutos a 900 g, 4° C. El suero fue guardado a - 70° C para su posterior utilización en la determinación de hormonas séricas por ELISA.

ii. leucocitos plasmáticos: la sangre fue colectada en tubos heparinizados y mantenida a temperatura ambiente. Los eritrocitos fueron hidrolizados por incubación de las muestras con Buffer de Lisis de Glóbulos Rojos (eBioscience) por 5 minutos y lavados por agregado de PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4), centrifugación y resuspensión en Buffer FACs (0,5 % BSA en PBS). Los leucocitos remanentes fueron contados en hemocitómetro y se determinó su viabilidad por el método de exclusión de azul de tripano (>90%) (Fluka). Finalmente, fueron llevados a la concentración deseada y mantenidos a 0° C para su tinción inmediata con anticuerpos para citometría de flujo.

*Células Peritoneales*: se realizaron lavados en la cavidad peritoneal por inyección y recolección de 5 ml de PBS en esterilidad. Las células fueron resuspendidas en medio de cultivo Aim V, contadas en hemocitómetro y se determinó su viabilidad por el método de exclusión de azul de tripano (>90%). Finalmente, las células mantenidas a 0° C para su uso inmediato en el ensayo de estimulación para síntesis de citoquinas.

*Ovarios*: fueron procesados de acuerdo a los requerimientos de cada experimento:

i. los ovarios fueron fijados en formaldehído 4% por 24 horas, para su posterior inclusión en parafina con el fin de realizar secciones histológicas y estudiar la morfología.

- ii. los ovarios fueron incluidos en Tissue-Tek OCT (Quiagen), congelados en el momento por inmersión en hexano enfriado con hielo seco, mantenidos en N<sub>2</sub> líquido y guardados a -70° C hasta ser cortados para generar secciones histológicas en las cuales inmunolocalizar proteínas de interés .
- iii. los ovarios fueron pesados e incubados individualmente en buffer Krebs-Ringer- Bicarbonato (NaCl 118 mM; KCl 4.7 mM; MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM; glucosa 11.7 mM; NaHCO<sub>3</sub> 25 mM; CaCl<sub>2</sub> 1.2 mM; pH = 7.4) por 1 hora en atmósfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub> en 95% de O<sub>2</sub> a 37°C. Al finalizar el período de incubación el tejido fue retirado y la solución acidificada a pH 3 con HCl. Se extrajeron los esteroides mediante el agregado de acetato de etilo. La fase orgánica fue secada en una atmosfera de N<sub>2</sub> y almacenados a -20°C hasta el momento de realizar el radioinmunoanálisis.
- iv. Los ovarios fueron guardados a -70°C. Posteriormente, el tejido fue homogeneizado mecánicamente en buffer de homogeneización para estrés oxidativo: EDTA 1 mM, KCl 150 mM, β-mercaptoetanol 1 mM, Tris Base 20 mM, Sacarosa 500 mM a 0° C. El homogenato fue centrifugado a 10.000 g, 4° C por 10 minutos. El sobrenadante fue fraccionado para los ensayos de peroxidación lipídica, glutation, catalasa y determinación de proteínas.

#### **2.4. Detección de Estradiol Sérico por ELISA**

Como indicador de la función ovárica se determinó la concentración de estradiol en suero. Para ello se utilizó el kit *DRG Estradiol ELISA* (DRG Instruments GMBH, Alemania). Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo a las indicaciones del proveedor.

Previamente los esteroides presentes en 0.23 ml de suero fueron extraídos mediante el agregado de dietil éter, recolección de la fase orgánica y concentración de la misma a un volumen final de 20 µl por evaporación a temperatura ambiente. Las muestras fueron reconstituídas en 35 µl de Suero Humano Libre de Esteroides (Standard 0), centrifugadas y usadas en el protocolo a continuación.

En los distintos pocillos de una placa de 96 pocillos recubiertos con el anticuerpo policlonal anti-estradiol se dispensaron 25 µl de cada Standard ó muestra en los distintos pocillos e incubaron junto con 200 µl de *Enzyme Conjugate* por 2 horas a temperatura ambiente. Luego de lavar y secar cuidadosamente se agregaron 100 µl de *Substrate Solution* a cada pocillo y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 15 minutos. La reacción fue detenida mediante el agregado de 50 µl/pocillo de *Stop Solution* y se midió la densidad óptica a 450 nm en un lector de microplacas. La sensibilidad del test es de 9.714 pg/ml y los resultados fueron expresados como pg estradiol / ml suero.

### **2.5. Detección de Insulina Sérica por ELISA**

Se determinó la concentración de insulina en muestras de suero de animales controles y androgenizados sometidos a 6 horas de ayuno. Se utilizó el kit *Ultra Sensitive Mouse Insulin ELISA Kit* (Crystal Chem Inc., Downers Grove, IL) de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el proveedor.

Brevemente, placas de 96 pocillos pre-fijadas con anticuerpo contra insulina fueron incubadas con 5 µl de muestra o estándar y 95 µl de diluyente para las muestras por 2 horas a 4° C. Luego de 5 lavados con *wash buffer*, se agregaron 100 µl de *anti-insulin enzyme conjugate* a cada pocillo y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se realizaron 7 lavados luego de los cuales se adicionaron 100 µl de *enzyme substrate solution* por pocillo y se incubó la placa por 40 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. La reacción fue detenida mediante el agregado de 100 µl / pocillo de *enzyme reaction stop solution* y se midió la densidad óptica a 450 nm. La sensibilidad del test es de 0.1 ng/ml y los resultados fueron expresados como ng insulina/ml suero.

### **2.6. Inmunomarcación de Células CD4<sup>+</sup> y NK Plasmáticas y Cuantificación por FACs**

0,5 x 10<sup>6</sup> leucocitos aislados de sangre (como se detalla en la sección correspondiente) fueron transferidos a una placa de 96 pocillos de fondo redondo y se

realizó la tinción con anticuerpos específicos siguiendo protocolos publicados (Karimi y col., 2009). Brevemente, las células fueron lavadas por adición de Buffer FACs y centrifugación (1000 rpm, 10 minutos, 4° C) e incubadas con Buffer de Bloqueo (2 % de suero normal de ratón en Buffer FACs) durante 15 minutos sobre hielo para bloquear la unión inespecífica de anticuerpos por receptores de Fc. Luego de lavar se realizó una segunda incubación por 30 minutos a 4° C en oscuridad con anticuerpos específicos contra los antígenos de superficie mencionados a continuación (BD Bioscience) en una dilución 1:200 en Buffer FACs o los controles de isotipo correspondientes.

Antígeno de Superficie	Fluorocromo
CD4	FITC
CD49b	PE
CD25	APC

Las células fueron lavadas dos veces y la adquisición de datos se realizó usando un citómetro FACS Calibur (Becton Dickinson). La compensación del instrumento se realizó con muestras teñidas con un anticuerpo por vez para adaptar la medición a las características de las células a medir. En cada muestra se analizaron un total de 20.000 linfocitos.

Los resultados fueron analizados usando el programa CellQuest (Becton Dickinson). Se seleccionó la población de interés de acuerdo a sus características de granulosidad (SSC) y tamaño (FSC). La determinación de la expresión de los marcadores de interés fue realizada estudiando al distribución de la fluorescencia estándar 1 (FL1: FITC- Ac anti CD4<sup>+</sup> de ratón) y fluorescencia estándar 2 (FL2: PE- Ac anti CD49b<sup>+</sup> de ratón), fluorescencia estándar 3 (FL3: APC- Ac anti CD25).

Tanto el cuadrante como la ventana de análisis se conservaron a lo largo de toda la cuantificación. El análisis se realizó mediante histogramas y el umbral se determinó

de acuerdo a la fluorescencia observada en los controles de isotipo. Los resultados se expresaron como % de la población parental, es decir, de la población a partir de la cual se estudió la expresión del marcador de interés.

### **2.7. Determinación de la Producción de Citoquinas por Células Peritoneales Estimuladas *ex vivo***

0.25 x 10<sup>6</sup> células peritoneales / ml fueron dispuestas en una placa de 96 pocillos de fondo redondo e incubadas en medio Aim V suplementado con 10% de SFB en presencia de PMA/ionomicina a 37° C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> (Pincus-Knackstedt y col., 2006). Luego de 24 horas los sobrenadantes fueron colectados y mantenidos a -70° C hasta la realización del ensayo de *cytometric bead arrays* (CBA), mediante el cual se determinó el contenido de las citoquinas MCP-I, IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF- $\alpha$  e IFN-gama. Para ello, se utilizó un *CBA Inflammation Kit* (BD Pharmingen) de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

Brevemente, 50  $\mu$ l de cada muestra o de las soluciones estándar fueron incubados por 2 horas a temperatura ambiente y oscuridad junto con 50  $\mu$ l de la mezcla de microesferas de captura y con 50  $\mu$ l de *mouse inflammation PE detection reagent* que consiste en anticuerpos contra citoquinas de ratón conjugados a PE. Luego la solución fue lavada y resuspendida en 300  $\mu$ l de buffer de lavado. La toma de datos se realizó con un citómetro FACSCalibur (BD Biosciences) y los resultados analizados con programas específicos para este ensayo provistos por la compañía (BD Biosciences).

### **2.8. Tinción por Hematoxilina y Eosina de Secciones de Tejido Ovárico y Extendidos Citológicos Vaginales y criterios de análisis**

*Los extendidos vaginales* fueron secados a temperatura ambiente por 20 minutos y lavados en PBS. Se utilizó un protocolo estándar para la tinción de muestras de extendidos vaginales con hematoxilina y eosina y se observaron los preparados al microscopio electrónico para determinar la composición citológica. El ciclo estral en el ratón dura entre 98 y 106 horas y está dividido en 4 estadios: proestro, estro, metaestro

y diestro. De acuerdo a los criterios establecidos por Champlin y col. (1973), se caracterizaron los diferentes estadios a partir de la constitución celular:

Proestro: mayormente células epiteliales pequeñas y nucleadas. Escasa o nula presencia de leucocitos.

Estro: presencia de “escamas” (células cornificadas de gran tamaño, con núcleo degenerado).

Metaestro: numerosos leucocitos y algunas escamas.

Diestro: presencia de numerosos leucocitos y de pocas células epiteliales nucleadas.

Los extendidos vaginales evidenciaron falta de ciclicidad ovárica, observándose alta frecuencia de animales en estadio estro y metaestro. Para los estudios de inmunohistoquímica se seleccionaron animales en el estadio metaestro.

*Ovarios* de animales hiperandrogenizados y controles previamente incluidos en parafina fueron cortados con micrótopo en forma seriada para obtener secciones de 8  $\mu\text{m}$  de grosor. Las mismas fueron montadas en portaobjetos y fijadas a continuación por incubación a 37° C durante la noche. En el momento de uso las secciones fueron desparafinadas en xilol, re-hidratados por inmersión en concentraciones decrecientes de etanol y lavadas en PBS para ser entonces teñidas con hematoxilina y eosina de acuerdo a protocolos estándar. Los folículos quísticos fueron caracterizados como folículos de gran tamaño y forma irregular con una capa de células de la granulosa atenuada y compacta. Se determinó la frecuencia y características histológicas de los folículos quísticos en cuanto a tamaño, grosor de la capa de células de la teca y de la granulosa, y se los comparó con el folículo de mayor tamaño observado en ovarios de animales controles.



## **2.9. Inmunolocalización de MHCII, CD4, CD11c, VCAM-1 e ICAM-1 en Secciones de Tejido Ovárico**

Se realizaron cortes en crióstato de los ovarios congelados en medio de montaje OCT con el fin de obtener secciones histológicas de 10 µm de profundidad. Las mismas fueron montadas en portaobjetos cubiertos con gelatina (Biobond; British Biocell International, Cardiff), fijadas por inmersión en acetona (-20° C) y mantenidas a -80° C hasta su uso.

La inmunomarcación de las proteínas CD11c, MHCII, CD4, VCAM-1 e ICAM-1 se realizó adaptando protocolos ya establecidos (Cordo-Russo y col., 2008). Brevemente, secciones histológicas de ovarios de los grupos experimentales junto con secciones de bazo usadas como control positivo fueron hidratadas en TBS (0.05 M Tris Base, 0.9 % NaCl, pH 7.4) e incubadas con las soluciones de bloqueo para avidina, biotina y proteínas (Vector). Luego fueron incubadas con el anticuerpo primario (BD Bioscience), específico para los antígenos detallados en el cuadro, en TBS 1% SFB. Previamente, los anticuerpos habían sido titulados para encontrar la concentración adecuada para este ensayo, que se especifica en la tabla a continuación.

Antígeno Murino	Origen Ac 1°	Dilución Ac 1°	Origen Ac 2°
MHCII	Rata	1:100	Cabra
CD4	Rata	1:100	Cabra
VCAM-1	Rata	1:100	Cabra
ICAM-1	hamster biotinilado	1:200	-
CD11c	Hamster	1:200	Ratón

Las secciones fueron incubadas durante la noche a 4° C en cámara húmeda y luego lavadas. Dado que el anticuerpo primario usado contra ICAM-1 es biotinilado se

realizaron a continuación con los pasos de amplificación y revelado detallados más adelante. Las restantes secciones fueron incubadas con el anticuerpo secundario biotilado en una dilución 1:200 en TBS 4% MNS (suero normal de ratón) 2% suero de la especie en que se generó el 2º anticuerpo (MHCII, CD4 y VCAM-1: suero normal de cabra; CD11c: SFB) por 30 minutos.

La señal fue amplificada por la formación del complejo biotina-avidina desencadenada por el agregado del reactivo ABC-AP (VECTASTAIN®, Vector). Este complejo fue detectado con Neo-Fucsina, sustrato revelador de AP. Se realizó una contratinción con hematoxilina de Mayer 0,1% y las secciones fueron cubiertas con medio de montaje adecuado y cubreobjetos.

El análisis se realizó por observación de las muestras en microscopio electrónico (Zeiss Axioscope) y la fotodocumentación fue realizada usando un sistema de análisis de imágenes digitales Zeiss KS400.

### **2.10. Producción de prostaglandina E (PGE) por Ovarios**

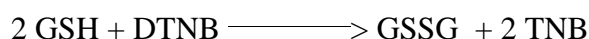
La producción de PGE, prostanoides de conocidos efectos sobre el sistema inmune, fue determinada por radioinmunoensayo en el extracto del medio de incubación de ovarios (sección 2.3.) como indicador de la producción de PGE por el tejido ovárico.

La técnica se basa en aquella descrita por Cordo-Russo. Brevemente, los reactivos y las muestras fueron reconstituidos en el buffer de RIA Prostaglandinas ( $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  7.30 mM,  $K_2HPO_4$  2.70 mM, NaCl 154 mM, albúmina bovina 7.14 mM, azida sódica 15.38 mM, PH 7,4). Las muestras y los estándares (100 µl) fueron incubados por 30 minutos con 500 µl del anticuerpo anti- PGE (Sigma Chemical Co, USA) a 4° C. Luego se agregaron 100 µl de PGE radioactiva ([5,6,8,9,11,12,14,15 (n)-<sup>3</sup>H]-PGE, 160Ci/ml; Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) y se incubó por 1 hora a 4° C. Una vez transcurrida la hora, se agregaron 200 µl de carbón activado-dextrán (Carbón 1% / Dextrán 0,1%) en suspensión en buffer radioinmunoensayo (RIA) Prostaglandinas, se dejó en reposo por 10 minutos a 0° C y centrifugó a 2.000 g por 15 minutos a 4° C (Sorvall RC-5B). El sobrenadante de centrifugación fue colectado en

viales conteniendo líquido de centelleo y su radioactividad determinada en un contador de centelleo. Los resultados (pg PGE por tubo) se calculan a partir de una curva patrón de Prostaglandina (15-4.000 pg). La sensibilidad de la técnica es de 5 pg y los resultados fueron expresados en ng PGE / mg proteína.

### **2.11. Determinación de la Concentración de glutatión total (GSH) en Ovario**

El GSH, metabolito antioxidante, fue determinado en los homogenatos de ovario (2.3). El método empleado (Tietze, 1969) se basa en la reacción de reducción del ácido 5,5,-ditiobis-2 nitro benzoico (DTNB), llevada a cabo por el Glutation reducido (GSH), en medio reductor. Al reducirse, el DTNB forma compuestos coloreados, que es posible cuantificar espectrofotométricamente a 412 nm. La reacción es la siguiente:



Para medir el Glutation total, se agrega glutatión reductasa al medio, enzima que cataliza el pasaje de glutatión oxidado (GSSG) a su forma reducida.

Luego, 100 µl de muestra de homogenatos de ovarios de animales controles o hiperandrogenizados fueron combinados con 900 µl de buffer de homogeneización para estrés oxidativo, 50 µl de NADPH, 20 µl del reactivo de Ellman (DTNB) y, en último lugar, 20 µl de la enzima Glutation Reductasa. Se registró la absorbancia cada minuto durante los primeros 6 minutos, período en el cual la cinética de reacción fue lineal. Se determinó la pendiente de reacción que fue comparada con la de una reacción equivalente llevada a cabo con una concentración de GSH conocida. De esta manera, se estableció la concentración del metabolito, expresado como µmoles de GSH/ g tejido.

### **2.12. Determinación de la Peroxidación Lipídica en Ovarios**

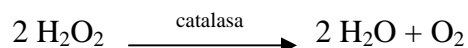
El aumento de las especies oxidantes y nitrosativas de la célula o disminución las especies antioxidantes puede llevar a desequilibrios en la homeostasis de óxido reducción celular. Esto desencadena reacciones de peroxidación de componentes celulares, entre ellos lípidos. En este proceso se generan subproductos, tales como el

malondialdehído (MDA), capaces de reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (TBA) para dar un producto de color que puede ser cuantificado a 535 nm en espectrofotómetro. Estas propiedades son el fundamento de la técnica de cuantificación de sustancias reactantes con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Buege y Aust, 1979).

Brevemente, se incubaron 0.35 ml de los homogenatos de ovarios (2.3) con 0.65 ml TBA 0,67 % (TCA 15% p/v, TBA 0.375 % p/v, HCl 0.25 N) por 20 minutos a 100° C. La reacción se detuvo por inmersión en hielo, leyéndose la absorbancia a 535 nm dentro de los siguientes 5 minutos. Se realizó una curva patrón con concentraciones conocidas de MDA y los resultados se expresaron como nmoles MDA / g tejido.

### **2.13. Determinación de Catalasa en Ovarios**

La catalasa es una enzima antioxidante capaz de catalizar la descomposición de peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno, por medio de la siguiente reacción:



La técnica tiene su fundamento en que el agua oxigenada absorbe luz a 240 nm, por lo cual su desaparición puede ser determinada por espectrofotometría a esa longitud de onda.

Se diluyeron 0.1 ml de muestra en 3 ml de buffer fosfato 50 mM pH = 7,2 y se adicionaron 0.1 ml de peróxido de hidrogeno 3 M y se midió la DO a 240 nm durante 1 minuto, cada 10 segundos.

Para obtener la cantidad de catalasa en la muestra, se realizaron una serie de cálculos descriptos y fundamentados por Chance (1954):

$$k' \times \text{dilución} / k \times \text{mg de proteína} = [\text{catalasa}] = \text{nmoles} / \text{mg de proteína}$$

Brevemente, a partir de la gráfica del log [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] en función del tiempo se calculó la pendiente del gráfico (k'). k es una constante, cuyo valor en el presente modelo es 4.6 x 10<sup>-7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>.

### **3. Estudios *in vitro***

#### **3.1. Cultivos Celulares e Incubaciones**

Se prepararon suspensiones de leucocitos de ganglio linfático de acuerdo a protocolos establecidos (Klecha y col., 2006). Para ello, se aislaron los ganglios retroperitoneales, axilares e intestinales de animales de entre 23 y 27 días de edad y se disgregaron mecánicamente por presión sobre una malla metálica con poro de 1 mm de diámetro. Para completar la disociación entre las células, se hizo circular la suspensión a través de una jeringa con aguja 23 G. Se realizaron 3 lavados mediante centrifugación (1000 rpm, 10 minutos, 4° C) y resuspensión en medio completo RPMI-1640 (Sigma), luego de los cuales se cuantificó su número en un hemocitómetro y su viabilidad según el método de exclusión del Azul de Tripano (Fluka). Las células fueron resuspendidas en medio completo RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor, 2 % de L-glutamina y 1 % de penicilina/ estreptomycin (Sigma) para alcanzar una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml.

Se preparó una solución madre de DHEA (0,4 M en Etanol, Sigma) a partir de la cual se realizaron diluciones en el medio de cultivo para alcanzar las concentraciones usadas: 0,1, 1 y 10  $\mu$ M. Los cultivos controles fueron incubados con vehículo. Luego de una serie de experimentos se seleccionó a la concentración de DHEA 1  $\mu$ M para su uso en los experimentos posteriores.

Se realizaron incubaciones de 4, 21 y 48 horas de duración en una estufa de cultivo a 37° C en atmósfera humidificada de 95 % O<sub>2</sub> : 5 % CO<sub>2</sub>.

Finalizada la incubación se procesaron las muestras de acuerdo a los requerimientos de los distintos experimentos a realizar. En el momento se continuó con los protocolos de citometría de flujo para marcadores celulares de superficie y de apoptosis, de proliferación celular y de cuantificación de la actividad de la NOS, mientras que las muestras a utilizar en las determinaciones de citoquinas, glutatión y TBARS fueron recolectadas y conservadas a -70° C hasta su utilización.

### 3.2. Inmunomarcación y Detección por Citometría de Flujo

Luego de la incubación,  $0,5 \times 10^6$  células de cada muestra fueron transferidas a una placa de 96 pocillos de fondo redondo y se realizó la tinción de acuerdo al protocolo descrito en el punto (2.6.). Se realizaron 2 paneles distintos de anticuerpos (BD Bioscience) que se detallan en la tabla a continuación. La combinación de anticuerpos en la solución madre 1 fue elegida para estudiar células linfocíticas, mientras que la de la solución madre 2, para el sistema inmune innato. Se realizó un control negativo en el que las células fueron incubadas con vehículo

Solución Madre	Antígeno de Superficie	Fluorocromo
1	CD8	FITC
	VLA-4	PE
	CD3	PerCP-Cy5
	LFA-1	PE-Cy7
	CD4	APC
	CD25	APC-Cy7
2	F4/80	FITC
	VLA-4	PE
	CD11b	PerCP-Cy5
	LFA-1	PE-Cy7
	CD11c	APC-Cy7

Las células fueron lavadas dos veces y analizadas inmediatamente usando FACs Canto (Becton Dickinson). La compensación del citómetro de flujo se realizó previamente usando muestras de células y de microesferas unidas a un único anticuerpo por vez. Se cuantificaron 100.000 eventos por muestra y los resultados fueron

analizados con el programa FlowJo 7.5 (TreeStar, Ashland, OR). El análisis fue llevado a cabo de manera convencional (2.6) seleccionando la población de interés de acuerdo a su granulosis y tamaño y luego estudiando la distribución de las 6 fluorescencias determinadas.

Tanto el cuadrante como la ventana de análisis se conservaron a lo largo de toda la cuantificación. El análisis se realizó mediante gráficos de puntos (dot-plots) y el umbral se determinó de acuerdo a la fluorescencia observada en los controles negativos. Los resultados se expresaron como % de la población parental.

### **3.3. Ensayo de Proliferación**

Para estudiar los efectos de la androgenización con DHEA sobre la proliferación celular se determinó la incorporación de timidina tritiada por parte de suspensiones celulares en ausencia y presencia de mitógenos (Klecha y col., 2006). Esta técnica tiene su fundamento en que la timidina es incorporada por células en división donde es usada para la síntesis de ADN, por lo cual la radiactividad intracelular es proporcional a los niveles de proliferación celular. Como mitógeno se utilizó Concanavalina A (ConA), lectina que, por su capacidad de unir glicoproteínas de superficie, interactúa con el TCR, activando así la proliferación de linfocitos T (Mukherjee y col., 2005)

En una concentración de  $3 \times 10^5$  las células fueron incubadas con diferentes concentraciones de DHEA en una placa de 96 pocillos (Nunc Multi-dish; San Diego, CA, USA) en las condiciones previamente especificadas. A las 4 horas de incubación se agregó vehículo (control) ó ConA (1 ug/ml, estimuladas) al medio de cultivo y 24 horas más tarde 1  $\mu$ Ci/pocillo de [ $^3$ H]timidina ([ $^3$ H]-TdT, NEN, AE 20 Ci/ mmol) a la totalidad de las muestras. A partir de entonces se continuó el cultivo por 72 horas, luego de las cuales se colectaron las muestras con un Harvester 96 (Tomtec, Orange, CT, USA). La radiactividad producto de la incorporación de timidina fue determinada por un contador de centelleo (Wallac, Ramsay, MN, USA), se asignó el valor de 1 unidad arbitraria (UA) a la radiactividad incorporada en promedio por el grupo control en

ausencia de ConA (control basal, cpm) y se expresaron los restantes valores como UA resultantes del radio: radiactividad de la muestra / control basal.

### **3.4. Determinación de Viabilidad, Apoptosis y Necrosis**

Para determinar el porcentaje de células viables, en apoptosis temprana y en apoptosis tardía ó necrosis se utilizó un kit comercial de Anexina V- Yoduro de Propidio (Calbiochem, Gibbstown, NJ, USA). La técnica se basa en que la fosfatidilserina, normalmente localizada en la cara citosólica de la membrana y expuesta en la superficie celular cuando se induce apoptosis, une anexina V con alta afinidad en presencia de calcio. En este ensayo se utiliza anexina V conjugada con FITC para permitir su cuantificación por citometría de flujo. Por otro lado, para identificar células en apoptosis tardía o necrosis se utiliza el yoduro de propidio, agente intercalante del ADN que es impermeable a la membrana plasmática de células viables pero permeable a la de células necróticas o en apoptosis tardía y fluoresce al ser excitado a una longitud de onda de 480 nm.

Los procedimientos fueron llevados a cabo de acuerdo al protocolo suministrado por el proveedor. Brevemente, luego de finalizar las incubaciones por 4 o 21 horas,  $10^6$  células fueron lavadas (centrifugación 100 g por 5 minutos a temperatura ambiente), resuspendidas en *Binding Reagent* e incubadas con anexina V-FITC por 5 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Luego de lavar nuevamente, se resuspendió el *pellet* en *Binding Buffer* y se le adicionó 10  $\mu$ l de YP por tubo. Las muestras fueron mantenidas en hielo y analizadas inmediatamente con FACScan (BD Biosciences). Se cuantificaron 50.000 eventos por muestra, los resultados fueron analizados con el programa WinMDI 2.8 y el número de células viables (anexina V<sup>-</sup> IP<sup>-</sup>), en apoptosis temprana (anexina V<sup>+</sup> YP<sup>-</sup>) y en apoptosis tardía o necrosis (anexina V<sup>+</sup> IP<sup>+</sup>) fue expresado como porcentaje del total.

Como controles positivos de apoptosis y necrosis se incubaron células con dexametasona y con peróxido de hidrógeno respectivamente por 1 hora, mientras que como control negativo se usaron células sin incubar con anexina V e IP.



### **3.5. Determinación de las Interleuquinas 2 y 4 y el Interferón-gama en Medio de Cultivo**

Se incubaron leucocitos por 21 horas en las condiciones explicitadas con excepción del suero fetal bovino (SFB), que no fue usado en este ensayo para evitar su interferencia en la cuantificación de citoquinas y los medios de cultivo condicionados fueron conservados a -70° C hasta el ensayo para determinar la concentración de citoquinas. La misma se realizó usando el kit de *ELISA Ready-Set Go* (eBioscience, USA) para Th2/Th1 de ratón de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Brevemente, placas pre-fijadas con anticuerpo contra conejo desarrollado en cabra fueron incubadas toda la noche con 100 µl de muestra o standard a 4° C. Luego, se agregaron 100 µl/pocillo de diluyente e incubados a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de aspirar y lavar 5 veces con diluyente, fue agregado el anticuerpo biotinilado contra la citoquina correspondiente de ratón e incubado por 1 hora a temperatura ambiente.

Después de lavar 2 veces, las placas fueron incubadas con 100 µl/pocillo de avidina-peroxidasa diluida 1:250 durante 30 min. La reacción fue detenida mediante el agregado de 100 µl/pocillo de *Stop Reaction* y se midió la densidad óptica a 450 nm. La sensibilidad del test es de 0,78 pg/ml para cada citoquina. Los resultados fueron expresados como pg citoquina/ml suero.

### **3.6. Medición del Contenido de Glutation Total**

Con el fin de determinar el contenido de GSH en lisados de leucocitos, se adaptó el método descrito anteriormente (2.11.). Las muestras de células controles o incubadas con DHEA por 4 horas fueron lisadas mediante la técnica de congelado-descongelado. Luego se agregó TCA 5 % hasta alcanzar una concentración de TCA 0,5 % y se centrifugó a 2500 rpm 10 minutos a 4° C. El *pellet* fue descartado mientras que 0.1 ml del sobrenadante fueron llevados a 1 ml con buffer fosfato 50 mM y usados en el momento para medir la concentración de glutatión total. De igual manera que en el protocolo original se agregó a esta solución 50 µl de NADPH, 20 µl del reactivo de

Ellman (DTNB) y 20  $\mu$ l de Glutation Reductasa, se observó la cinética por 6 minutos y se analizaron los resultados en relación a una curva patrón. Los resultados se expresaron como mmoles de GSH/ g de proteína.

### **3.7. Actividad de la NOS**

Se determinó la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa, que cataliza la reacción:



El NO se cuantificó como la síntesis de citrulina marcada (L-<sup>14</sup>C Citrulina), obtenida a partir de arginina marcada radiactivamente (L-<sup>14</sup>C Arginina) (Knowles y col., 1990), dado que ambos son sintetizados en cantidades equimolares.

Brevemente, luego de 3 horas de incubación con DHEA ó vehículo, 10<sup>7</sup> células fueron resuspendidas en Krebs-Ringer buffer fosfato con glucosa (11 mM) como sustrato externo y manteniendo la misma concentración de la hormona. Se incubaron a 37° C con 10  $\mu$ mol/l de L-<sup>14</sup>C Arginina (0,3  $\mu$ Ci) por 1 hora. Luego las muestras fueron sonicadas en buffer conteniendo EGTA 10 mM, citrulina 0,1 mM, ditiotreitól 0,1 mM y HEPES 20 mM, pH 7,5 y centrifugadas por 10 minutos a 1.000 g. Los sobrenadantes fueron pasaron a través de una columna DOWEX AG50WX-8 (forma Na<sup>+</sup>). Se eluyó la L-<sup>14</sup>C Citrulina con 3 ml de agua destilada, y, por último, se contó la radiactividad en un contador  $\beta$  de centelleo líquido.

### **3.8. Análisis de Peroxidación Lipídica en Células Leucocitarias**

Se usó la técnica de TBARS, descrita previamente para su aplicación en tejido (2.3), para calcular el índice de peroxidación lipídica en leucocitos. En forma previa, se puso a punto el número de células necesario para obtener resultados compatibles con la sensibilidad de la técnica realizando el ensayo con 0.1, 1, 10 y 20 x 10<sup>6</sup> células. Se

seleccionaron  $20 \times 10^6$  células por muestra, lo cual se hizo necesario agrupar cultivos de distintos animales. Se produjo la lisis de las células por el agregado de TCA 5%, para luego ser centrifugadas 10 minutos a 5.000 rpm, 4° C. 350  $\mu$ l del sobrenadante fueron reservados para continuar ensayo de acuerdo al protocolo original mediante la adición de TBA 0,67 % e incubación a 100° C por 20 minutos. Los resultados fueron expresados como  $\mu$ mol MDA/ $10^7$  células.

#### **4.1. Medición de la Concentración de proteínas**

La cuantificación de proteínas en los homogenatos de ovario y en los lisados celulares se realizó por el Método de Bradford.

#### **4.2. Análisis Estadístico**

El análisis estadístico fue realizado con el programa estadístico SPSS 17.0 (IBM, Chicago, IL). Las diferencias entre grupos los grupos experimentales y el control fueron evaluadas mediante la prueba no paramétrica de Mann Whitney U. El nivel de significancia fue establecido en  $p \leq 0.05$ .

### 3. RESULTADOS

#### 1. Estudios *in vivo*

##### 1.1. Establecimiento del Modelo para el Estudio de la Disfunción Ovárica

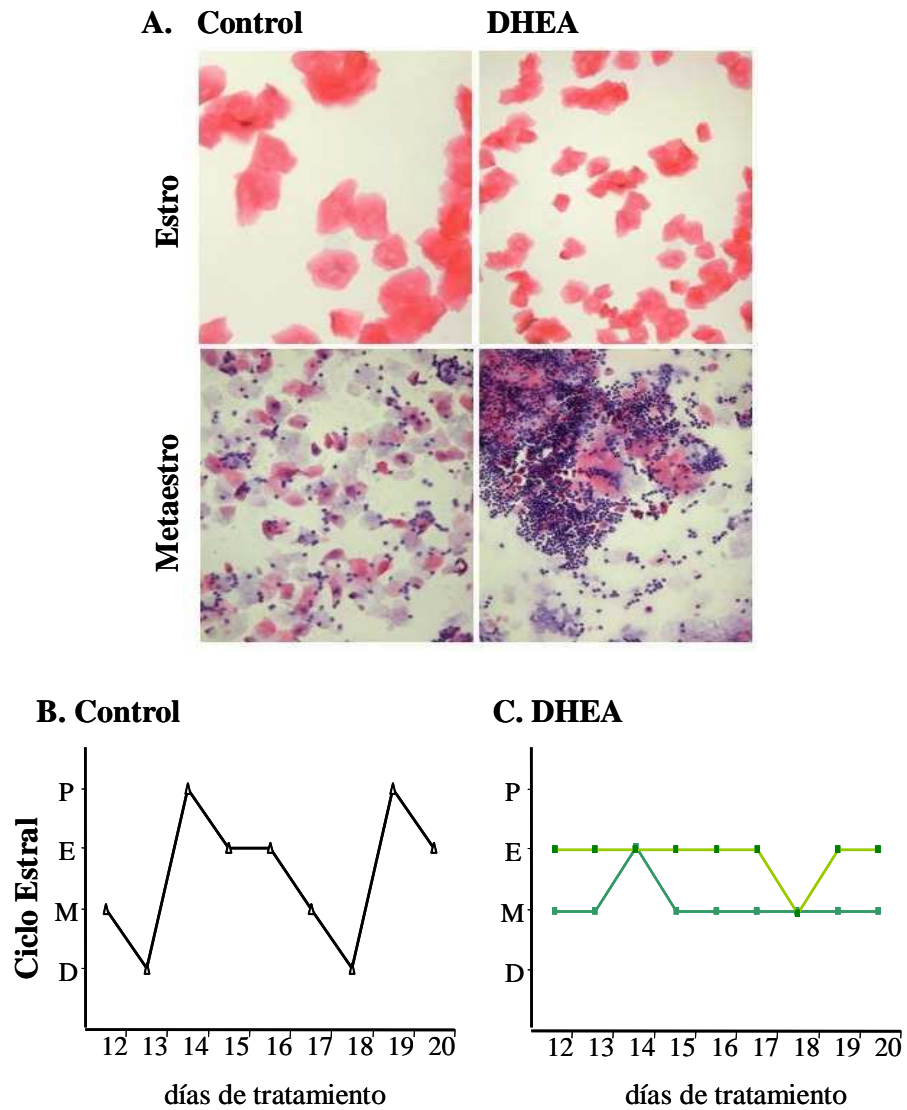
En esta sección se estudiaron dos modelos de androgenización con DHEA que, como se explicó en materiales y métodos, difirieron en la edad de comienzo del tratamiento. En el protocolo 1 se comenzó el tratamiento a los 24 días de edad mientras en el protocolo 2 a los 30 días. A partir de la evaluación de la ciclicidad ovárica y de las características de la histología ovárica en ambos modelos se determinó la edad más adecuada para comenzar el tratamiento con DHEA.

##### 1.1.1. Evaluación del Ciclo Estral Durante el Tratamiento

La oligo- anovulación es una de las principales afecciones reproductivas observadas en SOP, constituyendo además un síntoma clave en su diagnóstico. En este modelo, las características citológicas de extendidos vaginales permitieron diferenciar los estadios del ciclo estral y, mediante su seguimiento, obtener información sobre la ciclicidad ovárica.

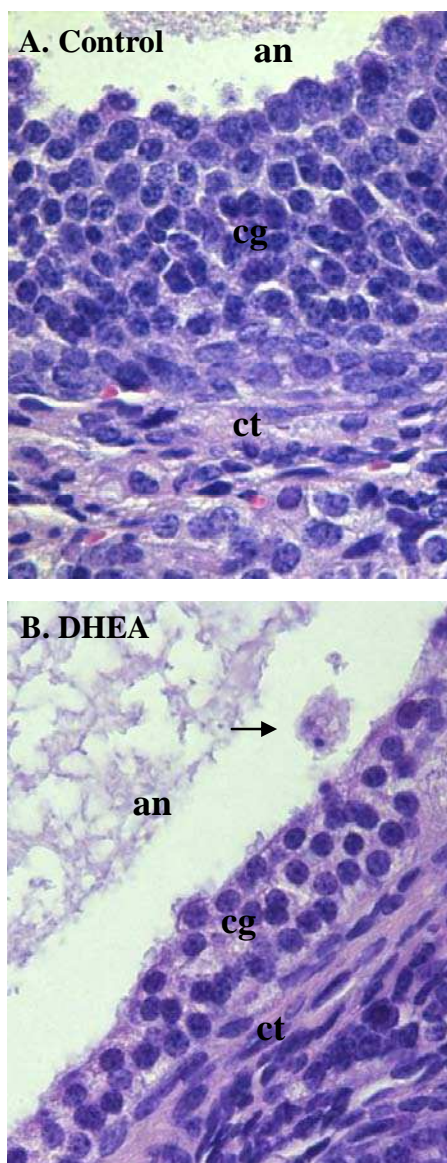
Debido a la juventud de los animales durante la etapa estudiada, el ciclo estral no se observó aún completamente establecido: los animales controles presentaron los distintos estadios del ciclo, mostrando en algunos casos ciclos completos (figura 1.B). Por el contrario, los animales androgenizados presentaron en forma variable los estadios de estro y metaestro (figura 1. A y C) con ausencia total de ciclos estrales completos a lo largo del tratamiento.

**Efectos del tratamiento con DHEA sobre el ciclo estral**



**Figura 1: El tratamiento con DHEA indujo arresto del ciclo estral en las fases de estró y metaestro.** El estadio del ciclo reproductivo se determinó por observación de las características citológicas del extendido vaginal. (A) Fotomicrografías representativas de los mismos para cada tratamiento muestran el aspecto al microscopio de los estadios estró (izq.), con abundancia de escamas, y metaestro (der.) con presencia de linfocitos, escamas y algunas células redondas. Esquemas mostrando ejemplos representativos de la ciclicidad en animales de los grupos control (B) y androgenizados (C). P= proestro; E= estró; M= metaestro y D= diestro. n = 15 por grupo.

### Características y definición de los quistes ováricos



**Figura 2. El tratamiento con DHEA indujo la formación de quistes de origen folicular**, visibles macro y microscópicamente. Las fotos de cortes histológicos de ovarios teñidos con H y E muestran el detalle de la pared de un folículo terciario del grupo control (A) y de un quiste folicular del grupo androgenizado (B). Los quistes se caracterizaron por presentar el aspecto de folículos de gran tamaño con la capa de células de la granulosa (cg) compacta y adelgazada y así como reducida capa de células de la Teca (ct) e infiltración celular (flecha) en el antro (an). Amplificación 200 X.

### 1.1.2. Morfología de los Ovarios

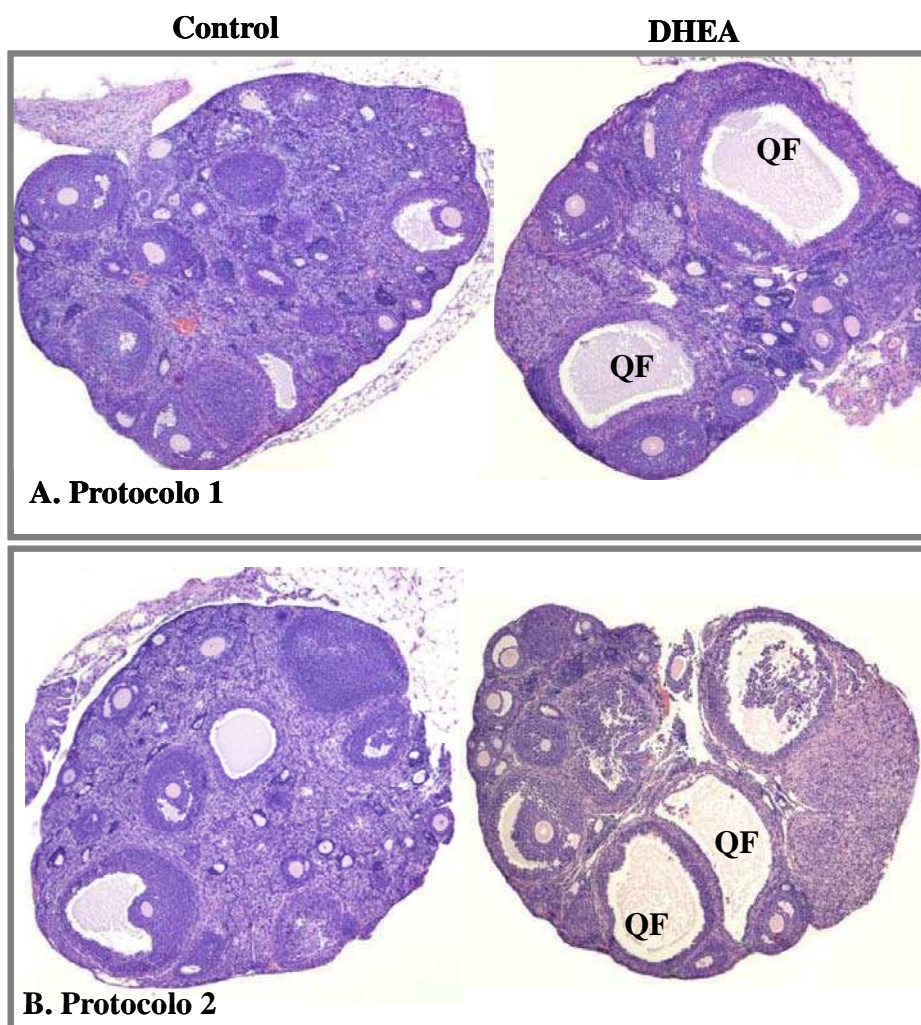
El tratamiento con DHEA indujo la formación de quistes visibles en forma macro y microscópica. La morfología se estudió en forma detallada por observación al microscopio óptico de secciones histológicas de tejido ovárico teñidos con H&E. Se determinaron la profundidad de las capas de células de la granulosa y de la teca y el diámetro mayor de los quistes.

**Características de los ovarios quísticos:** La androgenización indujo la formación de quistes de origen folicular, dado que mantuvieron los mismos componentes estructurales que los folículos ováricos aunque alterados (figuras 2 y 3). Los quistes desarrollaron tamaños mayores que los folículos antrales pertenecientes a ovarios controles, debido fundamentalmente al incremento en las dimensiones del antro (figura 4.B, tabla 1). En su contorno presentaron la capa de células de la granulosa de profundidad dispar y reducida comparada al control, con frecuencia presentando células desprendiéndose hacia el interior del antro (figura 3, tabla 1). Ambas características de las células de la granulosa son observadas en folículos atrésicos (Cheng y col., 2002; Hu y col., 2004). El grosor de la capa de células de la teca también se encontró disminuido en los folículos quísticos (tabla 1).

Como se puede observar en la figura 3, los quistes presentaron forma irregular en comparación a la simetría esférica u oval característica de los folículos viables. Ocuparon gran proporción del ovario, extendiéndose desde la corteza hasta la médula. Asimismo, los ovarios quísticos presentaron una médula poco compacta, de tejido laxo y quebradizo al realizar los cortes histológicos. Los vasos sanguíneos observados en este área de gran irrigación presentaron una luz amplia (figura 3).

Por otro lado, la distribución de los folículos se mantuvo cortical. Tanto en ovarios controles como en quísticos se observaron folículos en los distintos estadios de desarrollo (figura 3. A y B), de acuerdo a su clasificación según criterios publicados (Cheng y col., 2002; Hu y col., 2004): folículos primarios, oocito rodeado de una única capa de células de la granulosa; folículos preantrales, oocito rodeado por 2 o más capas de células de la granulosa, carentes de antro; y antrales, presentan un antro entre las distintas capas de células de la granulosa que rodean al oocito.

**Puesta a punto del modelo para el estudio de los quistes ováricos**



**Figura 3. La androgenización con DHEA produce mayor incidencia de quistes cuando los animales son tratados desde edades más tempranas.** Las microfotografías muestran cortes histológicos de ovarios de animales controles (izquierda) y androgenizados (derecha), tratados con vehículo o DHEA por 20 días comenzando a los 23 días de edad (A): Protocolo 1, o a los 30 días de edad (B): Protocolo 2. En todos los casos, el análisis del tejido reveló la presencia de folículos en todos los estadios de desarrollo, folículos atréticos y cuerpos lúteos. En ovarios de animales tratados con DHEA se observó la formación de quistes (QF) de características similares entre protocolos. Aumento 25 X.

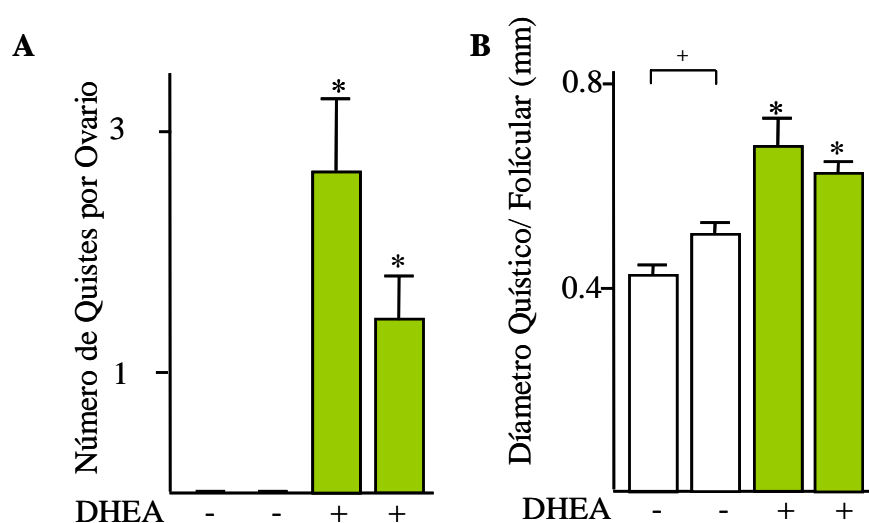


**Comparación de los protocolos de androgenización:** La DHEA indujo una mayor incidencia de quistes cuando fue administrada desde una edad más temprana (figura 4. A, tabla 1). Esto se reflejó en que la totalidad de los animales tratados de acuerdo al protocolo 1 desarrollaron quistes mientras sólo el 71 % (5/7) de los tratados según el protocolo 2 lo hicieron. Mas aún, los animales que comenzaron el tratamiento más jóvenes presentaron mayor número de quistes por ovario (2.67 vs. 1.43 quistes/ovario en el protocolo 2; figura 4. A, tabla 1).

Los quistes inducidos por ambos protocolos de androgenización fueron de similares características: tamaño incrementado y disminuido grosor de las capas de células de la teca y de la granulosa al compararlos con folículos antrales controles. Sin embargo, la morfología quística fue más severa en animales más jóvenes (protocolo 1) mostrando mayor tamaño de los quistes (figura 4.B) y disminución en las capas de la granulosa y teca (tabla 1), lo cual indicaría que serían más sensibles a la androgenización.

De acuerdo a la frecuencia y características de los quistes observados en los distintos grupos, se seleccionó para realizar los restantes experimentos *in vivo* en esta tesis el protocolo 1, tratamientos con DHEA por 20 días a partir del día 24 de edad.

## Efecto de la DHEA sobre la frecuencia de los quistes y su desarrollo



	<i>Protocolo 1</i>		<i>Protocolo 2</i>	
	Control (Media ± ESM) n = 6	DHEA (Media ± ESM) n = 7	Control (Media ± ESM) n = 7	DHEA (Media ± ESM) n = 6
1. Edad al comienzo del tratamiento (días)	24	24	30	30
2. Días de tratamiento	20	20	20	20
3. Ratonés que desarrollaron quistes	0	7 (100%)	0	5 (71%)
4. Número de Quistes por Ovario	0.00 ± 0.00	2.67 ± 0.61**	0.00 ± 0.00	1.43 ± 0.37*
5. Diámetro del mayor folículo o quiste ovárico (mm)	0.43 ± 0.02	0.68 ± 0.06**	0.51 ± 0.02	0.63 ± 0.02**
6. Grosor de la capa de la teca en (5) (µm)	18.2 ± 1.1	10.9 ± 0.9**	24.4 ± 10.4	20.7 ± 2.2 *
7. Grosor de la capa de la granulosa en (5) (µm)	44.9 ± 5.2	33.2 ± 3.0	53.1 ± 4.9	33.3 ± 3.0*

**Figura 4. La androgenización con DHEA produce mayor incidencia de quistes cuando los animales son tratados a edades más jóvenes.** Gráficos de barras mostrando las diferencias más salientes entre los protocolos: (A) número de quistes por ovario y (B) el tamaño promedio de los quistes o del mayor folículo en los controles. Tabla 1. Resumen de los resultados del análisis morfométrico de las secciones histológicas. Las barras y valores representan la media ± ESM. n = 7. \* p < 0.05; \*\* p < 0.01. Mann Whitney U Test.

## ***1.2. Efectos Sistémicos Inducidos por la Androgenización con DHEA:***

### ***Inflamación Crónica***

La inflamación crónica consiste en un estado de activación crónica del sistema inmune que se manifiesta en un aumento de los niveles séricos de citoquinas inflamatorias y alteraciones en la función y frecuencia de los leucocitos de sangre periférica (Sathyapalan y col., 2010).

Existe evidencia controvertida acerca de la conexión entre la inflamación crónica y la disfunción neuroendócrina en SOP, siendo la primera atribuida frecuentemente a las alteraciones metabólicas asociadas a este síndrome: resistencia a la insulina, metabolismo lipídico y distribución de la grasa corporal.

En esta sección se estudiaron en el modelo de androgenización con DHEA parámetros metabólicos, endócrinos e inmunes claves para reproducir el estado de inflamación crónica presente en SOP.

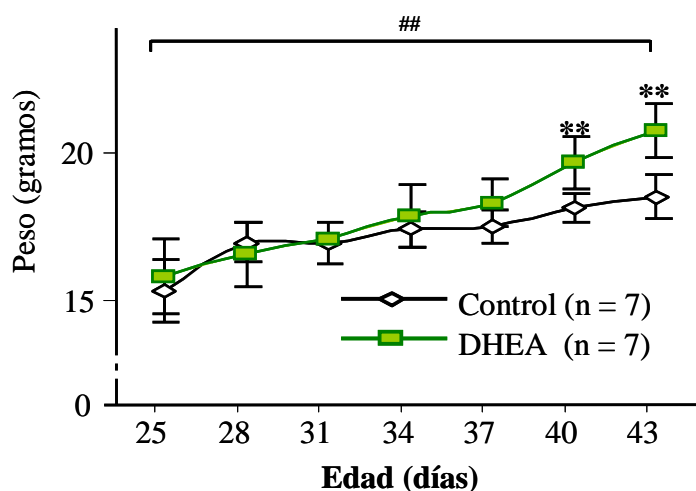
#### **1.2.1. Parámetros Metabólicos: Ganancia de Peso, Niveles de Glucosa e Insulina**

La poliquistosis ovárica se ha visto asociada a un amplio rango de alteraciones metabólicas (Hanh y col., 2005). Las observadas más frecuentemente son la obesidad, resistencia a la insulina y dislipidemia, con aproximadamente un 30% de incidencia de síndrome metabólico (Perfumo, 2003). Por estos motivos se estudió la ganancia de peso durante el tratamiento de androgenización y el metabolismo de la glucosa e insulina luego de 20 días de administración de DHEA.

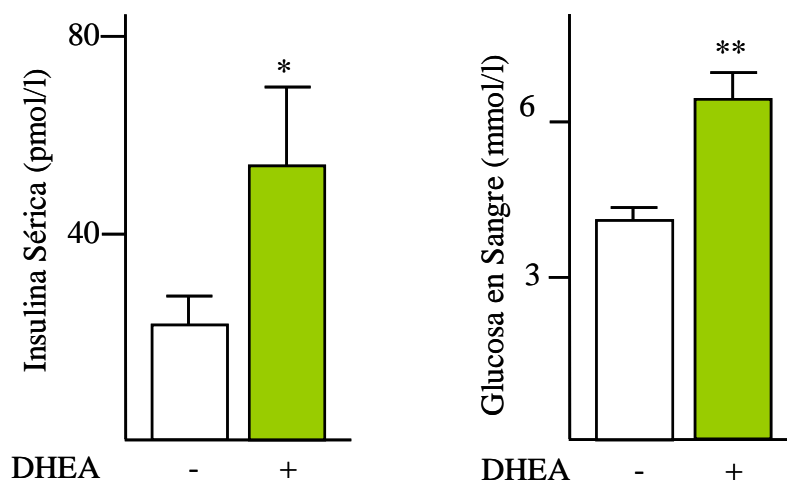
Dado que el período estudiado corresponde a la maduración desde la etapa peripuberal a la etapa adulta, va acompañado de un crecimiento en el tamaño corporal que se reflejó en ganancia de peso para ambos grupos. Sin embargo, el incremento de peso fue significativamente mayor en animales androgenizados que en animales controles (figura 5.A, tabla 2).

Asimismo, luego de 6 horas de ayuno se determinaron los niveles de glucosa en sangre, por tiras reactivas asociadas a un monitor, y de insulina en suero, por ELISA. Ambos compuestos se encontraron significativamente incrementados en animales androgenizados con respecto a los controles (figura 5. B y C), indicando una alteración de la glucemia en ayunas. A partir de los valores de glucosa e insulina obtenidos se determinaron los parámetros del modelo de homeostasis HOMA-IR. El aumento significativo de los valores de HOMA-IR en animales androgenizados con respecto a los controles (tabla 2) indicó una mayor resistencia a la insulina inducida por el tratamiento con DHEA.

### Efectos metabólicos de la androgenización con DHEA



**Figura 5.A: El tratamiento con DHEA incrementó la ganancia de peso y los niveles circulantes de insulina y glucosa en ayunas.** (A) El gráfico de líneas muestra la ganancia en peso a lo largo del tratamiento. Los puntos representan la media  $\pm$  ESM.  $n = 7$ . \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.005$ , control vs. DHEA; ##  $p < 0.005$  peso 25 días vs. 43 días de edad. Mann Whitney U Test.



**Figura 5.B-C: El tratamiento con DHEA incrementó la ganancia de peso y los niveles circulantes de insulina y glucosa en ayunas.** Los gráficos de barras muestran la concentración insulina en suero (B-izq) y glucosa en sangre (C-der) de animales controles y androgenizados. Las barras representan la media  $\pm$  ESM. n = 7. \* p < 0.05, \*\* p  $\leq$  0.005, control vs. DHEA; ## p < 0.005 peso 25 días vs. 43 días de edad. Mann Whitney U Test.

	Control	DHEA
Edad (días)	44.00 $\pm$ 0.03	44.00 $\pm$ 0.02
Peso (g)	17.61 $\pm$ 0.32	18.74 $\pm$ 0.45*
Glucosa en ayunas (mmol/l)	4.13 $\pm$ 0.26	7.32 $\pm$ 0.83**
Insulina en ayunas (pm/l)	22.5 $\pm$ 5.3	52.8 $\pm$ 15.1*
HOMA-IR	0.21 $\pm$ 0.05	0.96 $\pm$ 0.33**

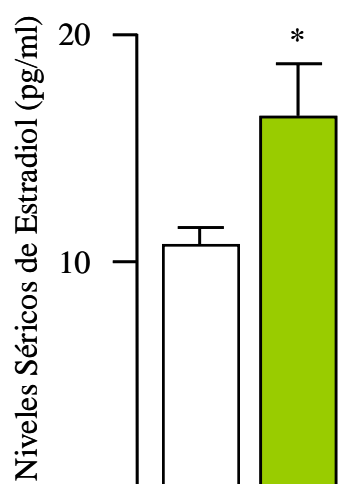
**Tabla 2: Resumen de los efectos de la DHEA sobre los parámetros metabólicos estudiados.** Los valores representan la media  $\pm$  ESM. n = 7, 2 réplicas. \* p < 0.05, \*\* p  $\leq$  0.005. Mann Whitney U Test.

### 1.2.2. Parámetros Endócrinos: Niveles Séricos de Estradiol

El SOP es un desorden endócrino caracterizado por altos niveles de andrógenos. El modelo de androgenización con DHEA reproduce el hiperandrogenismo (Henmi y col. 2001; Muniyappa y col., 2008) y presenta además altos niveles de estrógenos. Los mismos correlacionan en forma más adecuada con la incidencia de quistes y, por poseer además acciones inmunoregulatoras (Deshpande y col., 2000), resultan de gran relevancia en el presente estudio.

Los niveles séricos de estradiol sérico, determinados por ELISA, fueron significativamente mayores en los animales androgenizados comparados a los controles (figura 6).

#### Niveles de Estradiol como indicador de la formación de quistes ováricos



**Figura 6. Los niveles de estradiol sérico fueron incrementados por el tratamiento con DHEA.** Gráfico de barras mostrando la concentración de estradiol en suero de animales controles y androgenizados. Las barras representan la media  $\pm$  ESM. n = 7. \* p< 0.05. Mann Whitney U Test.

### 1.2.3. Niveles Plasmáticos de Células Inmunes

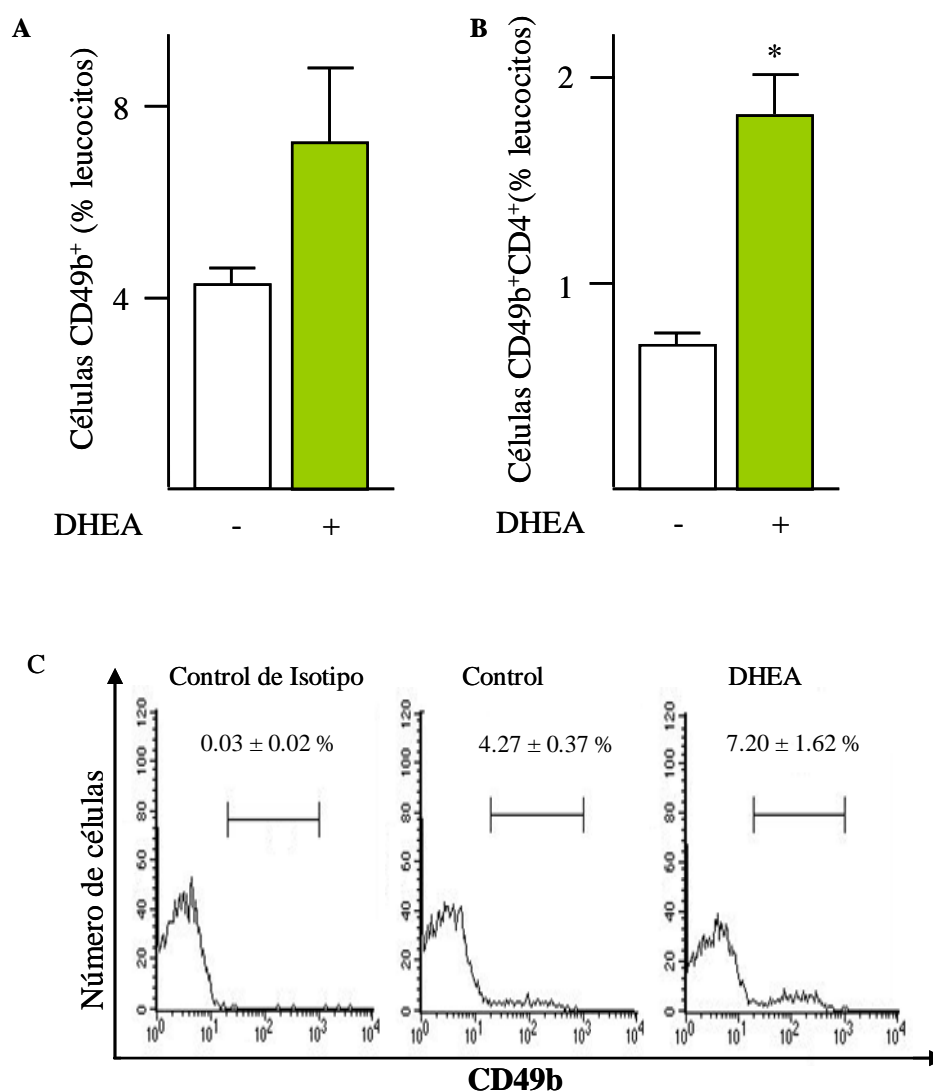
Entre los indicadores de inflamación crónica encontrados en SOP se observaron niveles elevados de leucocitos plasmáticos (Orio y col., 2005; Benson y col., 2007). Para estudiar el efecto de la hiperandrogenización sobre las poblaciones leucocitarias, se determinó por citometría de flujo la frecuencia de células NK (CD49b<sup>+</sup>) y su subpoblación, NKT CD4<sup>+</sup> como componentes del sistema inmune innato, así como la fracción de células CD4<sup>+</sup>, primer eslabón en la respuesta inmune adaptativa, en las cuales se observó además la expresión de CD25 como marcador de activación.

Los animales hiperandrogenizados presentaron niveles moderadamente mayores pero no significativos de células NK (CD49b<sup>+</sup>) en plasma (figura 7.A) conjuntamente con un incremento significativo de la subpoblación de NK CD4<sup>+</sup> (NKT), en relación a las frecuencias observadas en animales controles (figura 7.B).

Asimismo, los animales tratados con DHEA mostraron un aumento en la fracción de células CD4<sup>+</sup> (figura 8) las cuales expresaron CD25 en mayor proporción (figura 9), indicando un mayor número de células Thelper activadas.

Ambos resultados indicarían una activación a nivel sistémico de la respuesta inmune innata y adaptativa. Para complementar estos resultados se estudió la producción de citoquinas por parte de célula peritoneales.

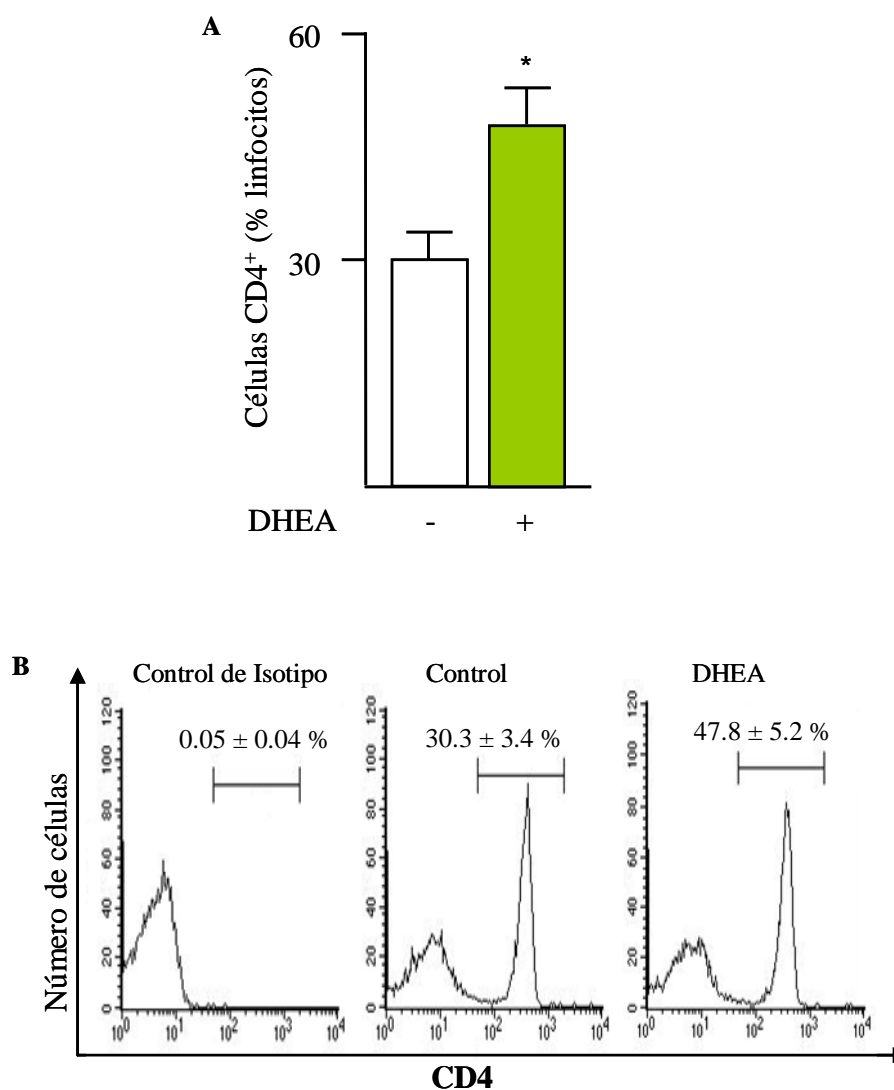
## Niveles de células NK y NKT plasmáticas



**Figura 7: Los animales hiperandrogenizados mostraron niveles incrementados de células NK y NKT.** Los gráficos de barras muestran los niveles de células (A) CD49b<sup>+</sup> (NK) y (B) CD49b<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (NKT) plasmáticos de animales controles y androgenizados. (C) Histogramas de frecuencia representativos de los resultados obtenidos en la cuantificación del marcador de NK: CD49b por citometría de flujo para los controles de isotipo, muestras de animales controles e hiperandrogénicos. Los valores y barras representan la media ± ESM. n = 6. \* p < 0.05. Mann Whitney U Test.



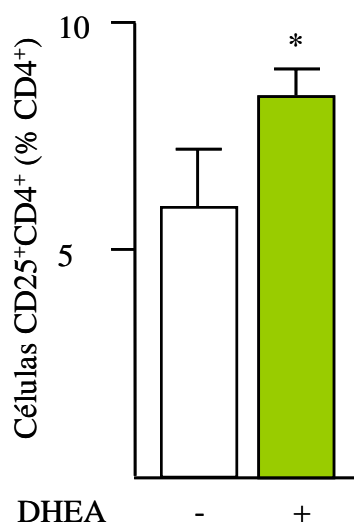
**Efecto de la hiperandrogenización sobre los niveles plasmáticos de CD4<sup>+</sup>**



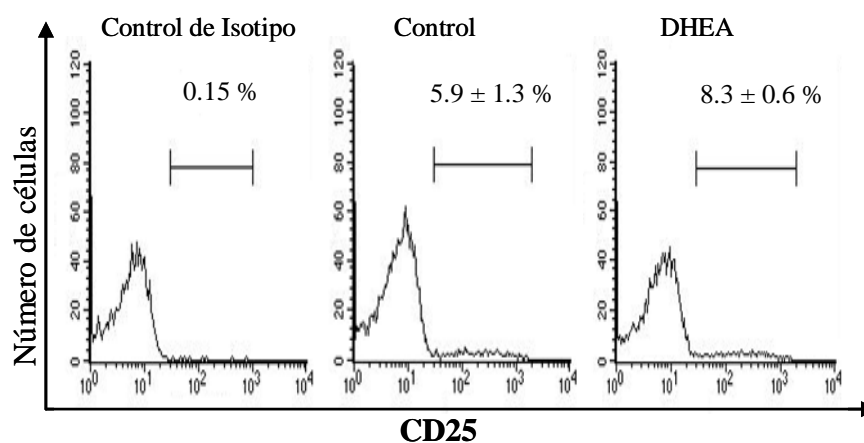
**Figura 8: Los animales hiperandrogénicos mostraron niveles elevados de células CD4<sup>+</sup> plasmáticas.** El gráfico de barras (A) muestra los niveles de células CD4<sup>+</sup> plasmáticas en animales controles y androgenizados. (B) Histogramas de frecuencia representativos de los resultados obtenidos en la citometría de flujo para el control de isotipo, muestras de animales controles e hiperandrogénicos. Los valores y barras representan la media ± ESM. n = 6. \* p < 0.05. Mann Whitney U Test.

Expresión de la subunidad de alta afinidad de IL-2R en células CD4<sup>+</sup>

A



B



**Figura 9: La androgenización indujo la expresión de CD25 en células CD4<sup>+</sup> plasmáticas.** El gráfico de barras (A) muestra la expresión de CD25 en células CD4<sup>+</sup> plasmáticos de animales controles y androgenizados. (B) Histogramas de frecuencia representativos de los resultados obtenidos en la citometría de flujo para el control de isotipo, muestras de animales controles e hiperandrogénicos. Los valores y barras representan la media ± ESM. n = 6. \* p < 0.05. Mann Whitney U Test.

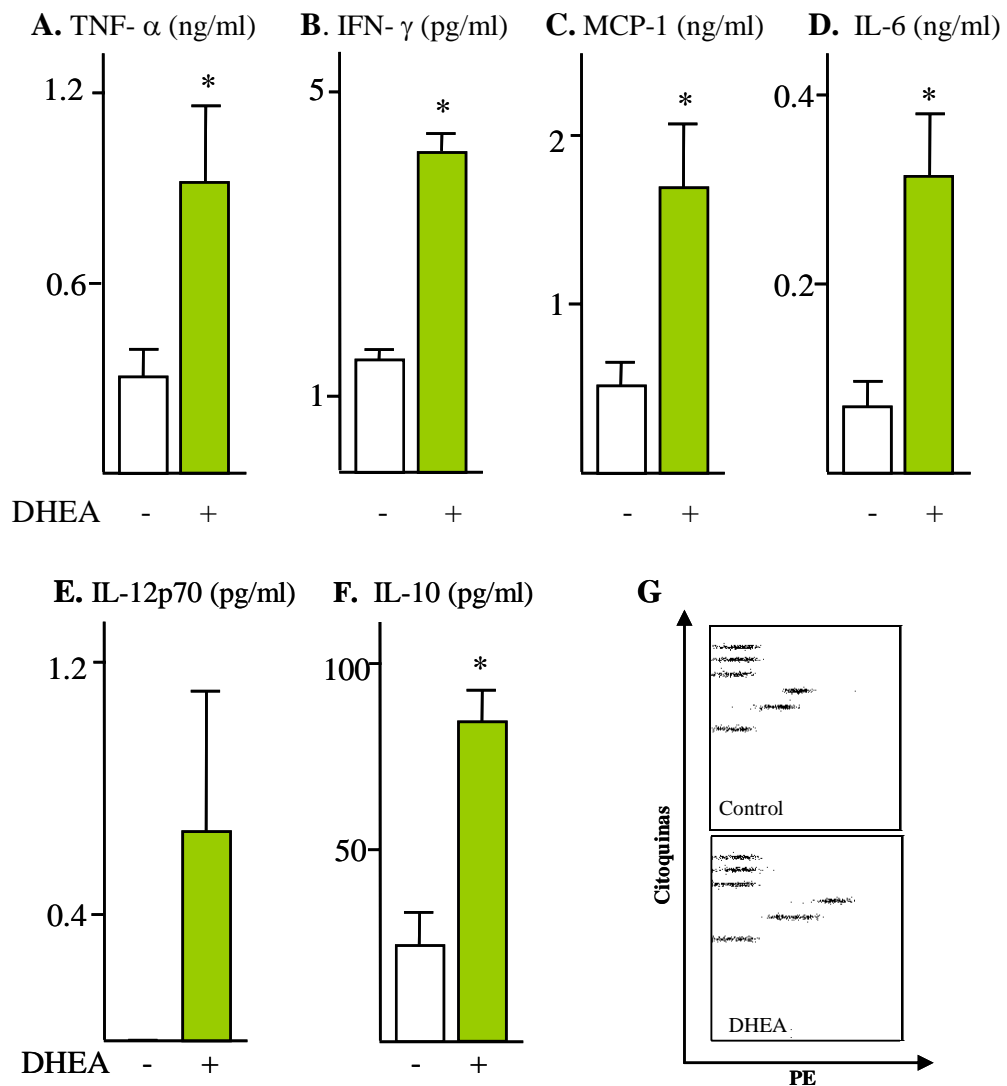
#### **1.2.4. Producción *ex vivo* de Citoquinas por Parte de Células Peritoneales**

La cavidad peritoneal comprende un microambiente específico, con gran cantidad de macrófagos y de sus productos de secreción. El fluido peritoneal se origina como un exudado del ovario y mantiene un amplio área de intercambio con el plasma a través del peritoneo que es permeable a moléculas pequeñas (Koninckx y col., 1998). Por estos motivos, las citoquinas producidas por células peritoneales integrarían en un único ambiente la respuesta inmune alterada por la disfunción ovárica a nivel local y por la inflamación crónica sistémica.

Las células peritoneales fueron estimuladas *ex vivo* con PMA por 24 horas y la concentración de citoquinas inflamatorias en el medio de cultivo determinadas por la técnica de CBA. Se estudió un amplio rango de citoquinas de origen, principalmente, innato. Entre las mismas, el TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  son clasificadas como citoquinas de tipo 1 y las citoquinas IL-6 e IL-10 de tipo 2, mientras que MCP-1 y IL-12p70 son secretadas por macrófagos y células dendríticas.

En el grupo androgenizado se observó una mayor secreción de la totalidad de las citoquinas estudiadas comparado al grupo control. El incremento en la síntesis de todos los tipos de citoquinas indica una activación generalizada de la respuesta inmune, que se corresponde con las características de la inflamación crónica sistémica e induciría un ambiente pro-inflamatorio para los ovarios.

**Producción de citoquinas por parte de células peritoneales**



**Figura 10: La androgenización con DHEA estimuló la secreción de citoquinas por parte de células peritoneales.** (A-F) Los gráficos de barras muestran la concentración de la citoquina indicada en el medio de cultivo de células provenientes de animales controles y androgenizados estimuladas con PMA/ionomicina. Las barras representan la media  $\pm$  ESM. n = 6. \* p < 0.05. Mann Whitney U Test. (G) Gráficos de puntos representativos de los resultados de CBA para animales control y androgenizados con DHEA. De arriba hacia abajo, las nubes corresponden a las citoquinas: IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y IL-12p70.

### ***1.3. Efectos Locales de la Hiperandrogenización con DHEA:***

#### ***Regulación Inmune de la Función Ovárica***

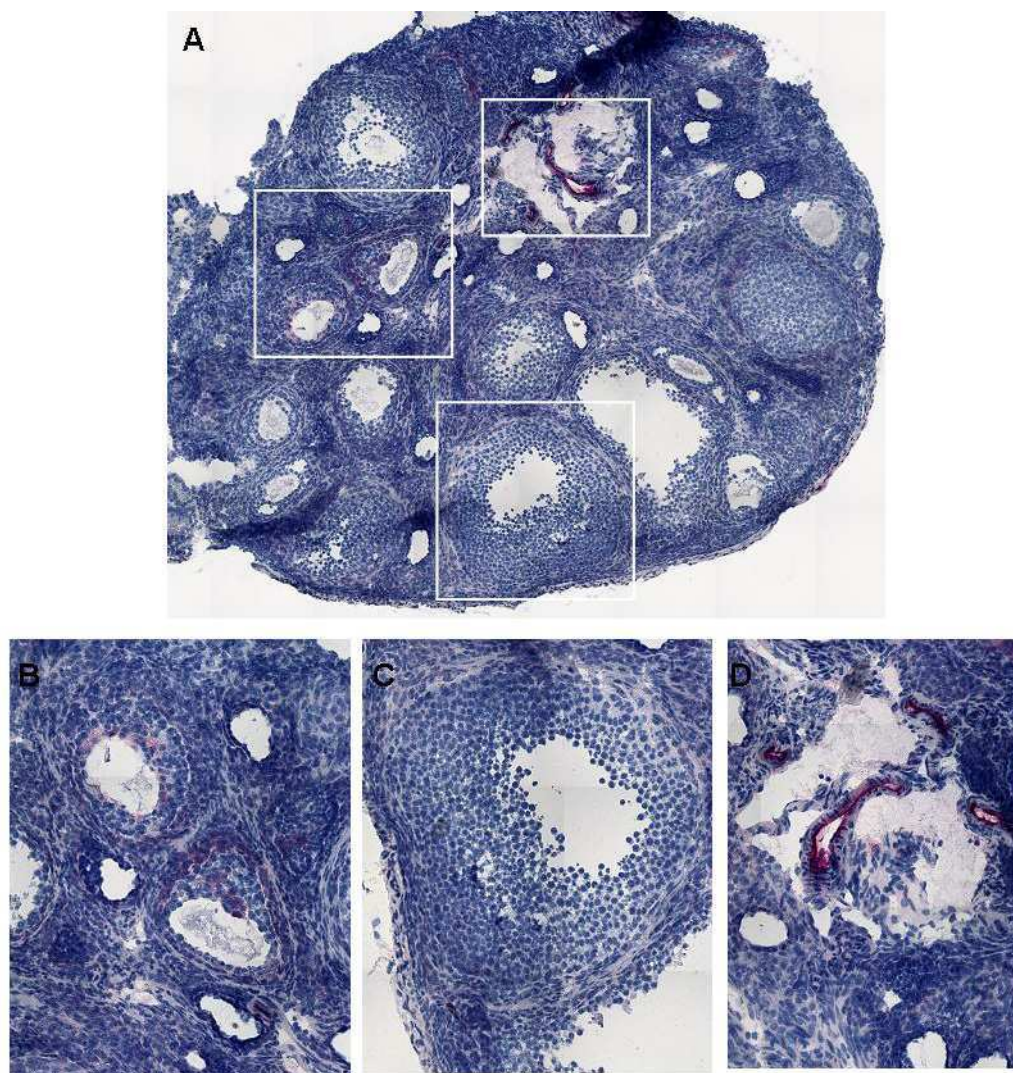
El sistema inmune cumple una importante función regulatoria a nivel del ovario, encontrándose implicado en procesos tales como maduración folicular, atresia y ovulación (Brannstrom y Norman 1993; Brannstrom y col. 1994; Bukulmez y Arici 2000). Asimismo, numerosa evidencia ha mostrado la presencia de un ambiente inmune alterado en los ovarios de mujeres poliquísticas (Gallinelli y col., 2003).

En la presente sección se analizaron la expresión de moléculas de adhesión y los tipos celulares presentes y su localización en ovario. Además se estudió la producción de EROs y PGE como mediadores de la respuesta inmune.

#### **1.3.1. Expresión de Moléculas de Adhesión y Presencia de Células Inmunes en el Ovario**

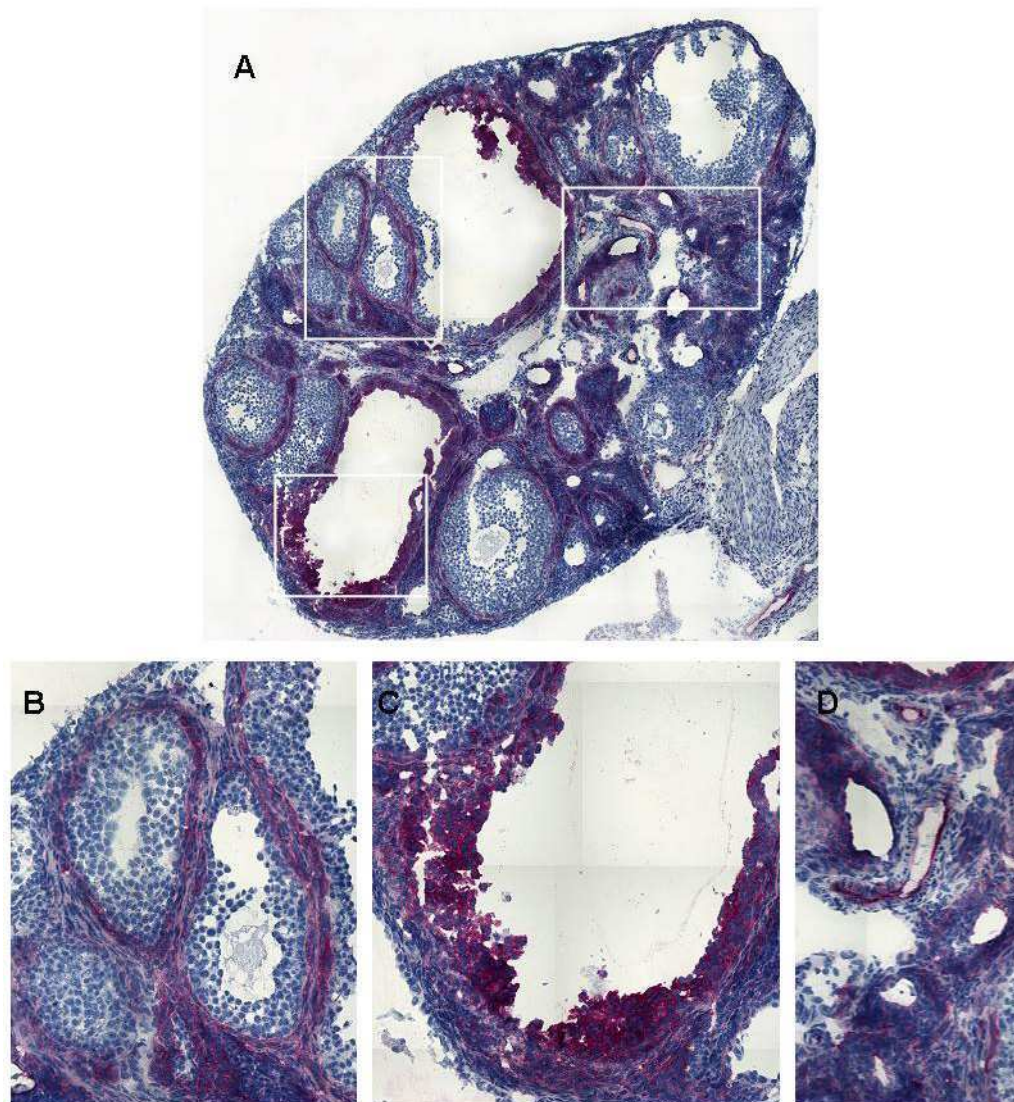
Dado el rol regulatorio del sistema inmune sobre el ovario se estudió la expresión de VCAM-1 e ICAM-1 como moléculas de adhesión implicadas en la quimiotaxis y extravasación leucocitaria y en los mecanismos de señalización intracelulares. Asimismo, se determinaron la presencia y la localización de células dendríticas, macrófagos y células CD4<sup>+</sup> en ovario, como componentes claves en la sincronización de la respuesta inmune local.

**Expresión Fisiológica de la Molécula de Adhesión Vascular (VCAM)-1**



**Figura 11: Localización de VCAM-1 en ovarios controles.** La foto (A) muestra una sección de tejido ovárico representativa del grupo control teñida inmunohistoquímicamente para VCAM-1 (rosa). Las ampliaciones muestran detalles de (B) folículos en distintas etapas de desarrollo, (C) un folículo antral y (D) la vasculatura medular. La tinción se observó en el endotelio de vasos sanguíneos y en células de la granulosa de folículos pequeños. Amplificación 25 X en (A) y 200 X en (B), (C) y (D), contratinción hematoxilina. n = 6; réplicas = 2.

### Expresión de VCAM-1 en Ovarios Poliquísticos



**Figura 12: Localización de VCAM-1 en ovarios de animales androgenizados.** La foto (A) muestra una sección de tejido ovárico representativa del grupo DHEA teñida inmunohistoquímicamente para VCAM-1 (rosa). Las ampliaciones muestran detalles de (B) folículos en distintas etapas de desarrollo, (C) un folículo quístico y (D) la vasculatura medular. La tinción se observó en la capa de células de la Teca de todos los folículos en desarrollo, en la capa de las células granulosa de los quistes y en el endotelio de vasos sanguíneos. Amplificación 25 X en (A) y 200 X en (B), (C) y (D), contratinción hematoxilina. n = 6; réplicas = 2.

**Expresión de VCAM-1 en ovarios:** En los ovarios de animales controles, no se observó expresión de la Molécula de Adhesión Celular Vascular (VCAM)-1 en las capas de células de la teca y de la granulosa en ninguno de los estadios del desarrollo folicular observados (figura 11. A-C), con excepción de células de la granulosa de un limitado número de folículos pre-antrales de pequeño tamaño (menores a 300  $\mu\text{m}$ ).

En los animales androgenizados, el análisis del tejido reveló la expresión de VCAM-1 en las células de la teca de todos los folículos y quistes ováricos. Conjuntamente, se observó una intensa expresión en la capa de las células de la granulosa de los quistes (figura 12. A-C).

En el caso de existir cuerpos lúteos en el tejido, la expresión de VCAM-1 observada en las células luteales fue baja. Tanto en ovarios de animales androgenizados como controles el endotelio de la vasculatura medular mostró una intensa expresión de VCAM-1 (figuras 11. y 12. D).

La alta expresión de VCAM-1 tanto en folículos normales como quísticos de animales androgenizados sugiere un rol protagónico para esta molécula en la patogénesis de SOP.

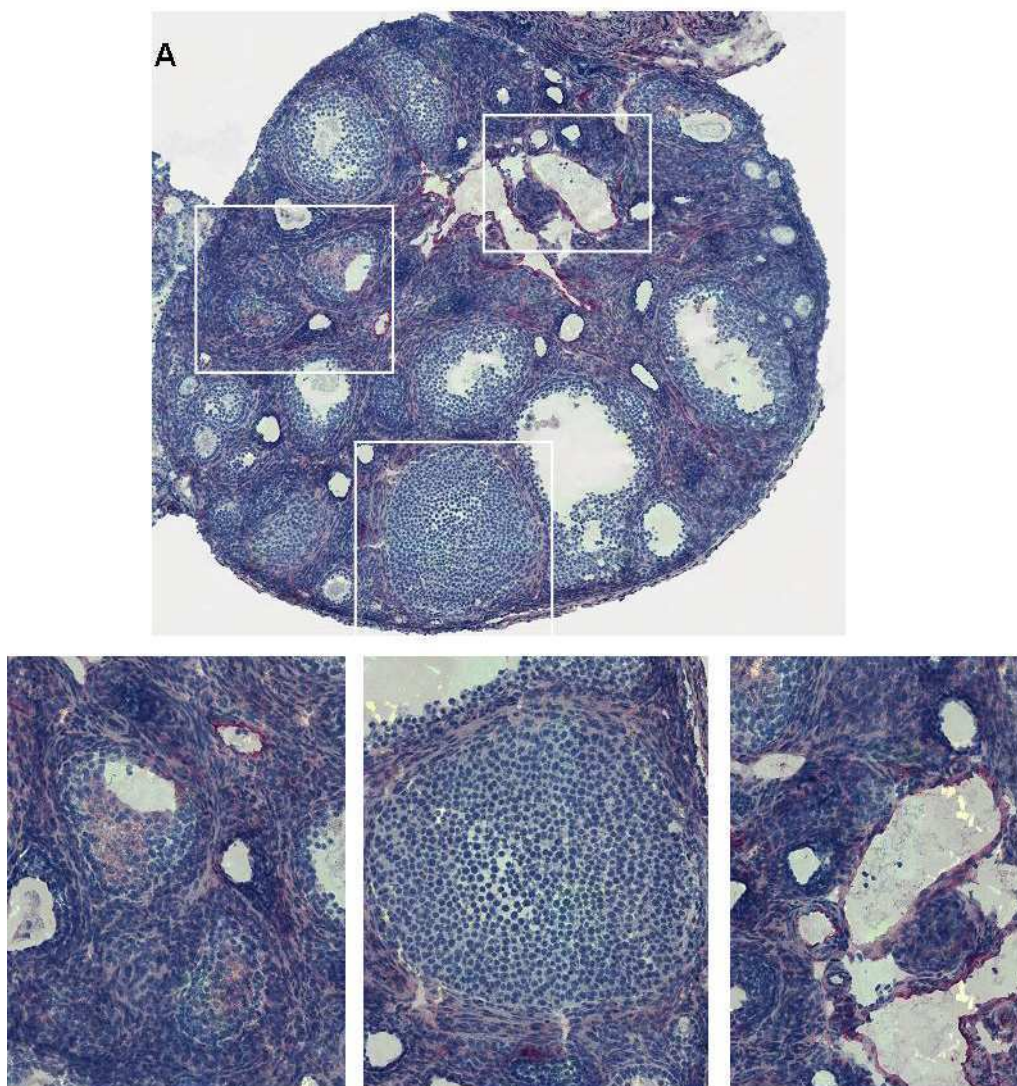
**Expresión de ICAM-1 en ovarios:** los tejidos de animales controles y androgenizados revelaron una moderada expresión de ICAM-1 en la capa de las células de la teca de folículos en los distintos estadios de desarrollo (figuras 13 y 14. A y B).

En el reducido grupo de folículos antrales pequeños que expresaron VCAM-1 en células de la granulosa, se observó también expresión de ICAM-1 (figura 13. A-C). En los cuerpos lúteos, se observó tinción para ICAM-1 en células luteales y de mayor intensidad que para VCAM-1. Por último, la expresión de ICAM-1 en el endotelio vascular medular de ambos grupos fue alta (figura 13 y 14. D).

Finalmente, se observó una alta expresión de ICAM-1 en células de la capa de la granulosa del quiste y en células infiltrantes a la misma (figura 14. A y C).

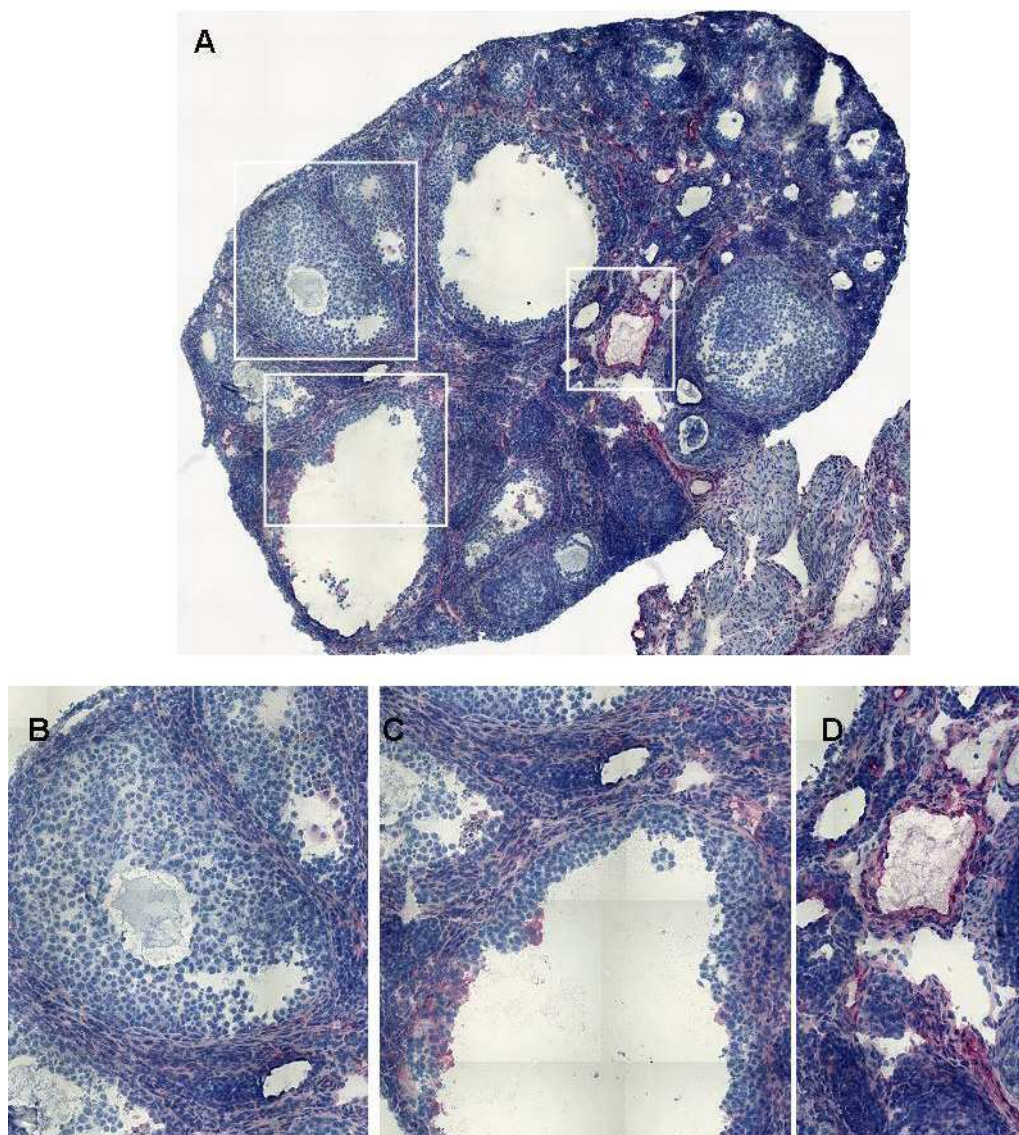


**Expresión Fisiológica de Molécula de Adhesión Intracelular (ICAM)-1**



**Figura 13: Localización de ICAM-1 en ovarios de animales controles.** La foto (A) muestra una sección de tejido ovárico representativo del grupo control, teñido inmunohistoquímicamente para ICAM-1 (rosa). Las ampliaciones muestran detalles de (B) folículos en distintas etapas de desarrollo, (C) un folículo antral y (D) la vasculatura medular. La tinción se observó en bajos niveles en la capa de células de la Teca, en el estroma ovárico y células de la granulosa que expresaran VCAM-1, y, en con mayor intensidad en el endotelio de vasos sanguíneos. Amplificación 25 X en (A) y 200 X en (B), (C) y (D), contratinción hematoxilina. n = 6; réplicas = 2.

### Expresión de ICAM-1 en Ovarios Poliquísticos



**Figura 14: Localización de ICAM-1 en ovarios de animales tratados con DHEA.** La foto (A) muestra una sección de tejido ovárico representativa del grupo androgenizado donde ICAM-1 (rosa) fue detectado por inmunohistoquímica. Las ampliaciones muestran detalles de (B) folículos en distintas etapas de desarrollo, (C) un quiste folicular y (D) la vasculatura medular. La expresión de ICAM-1 se observó principalmente en la capa de células de la Teca, en el estroma ovárico y en mayor intensidad en células de la granulosa de los quistes y en el endotelio de vasos sanguíneos. Amplificación 25 X en (A) y 200 X en (B), (C) y (D), contratinción hematoxilina. n = 6; réplicas = 2.

**Presencia y localización de células dendríticas en ovarios:** las células dendríticas fueron caracterizadas por la expresión del receptor CD11c. Se observó un número muy reducido de células CD11c<sup>+</sup> tanto en ovarios controles como en aquellos provenientes de animales androgenizados. En ambos casos, las células dendríticas se encontraron en el tejido conectivo del ovario, en la médula y en la corteza (figura 15. A-D).

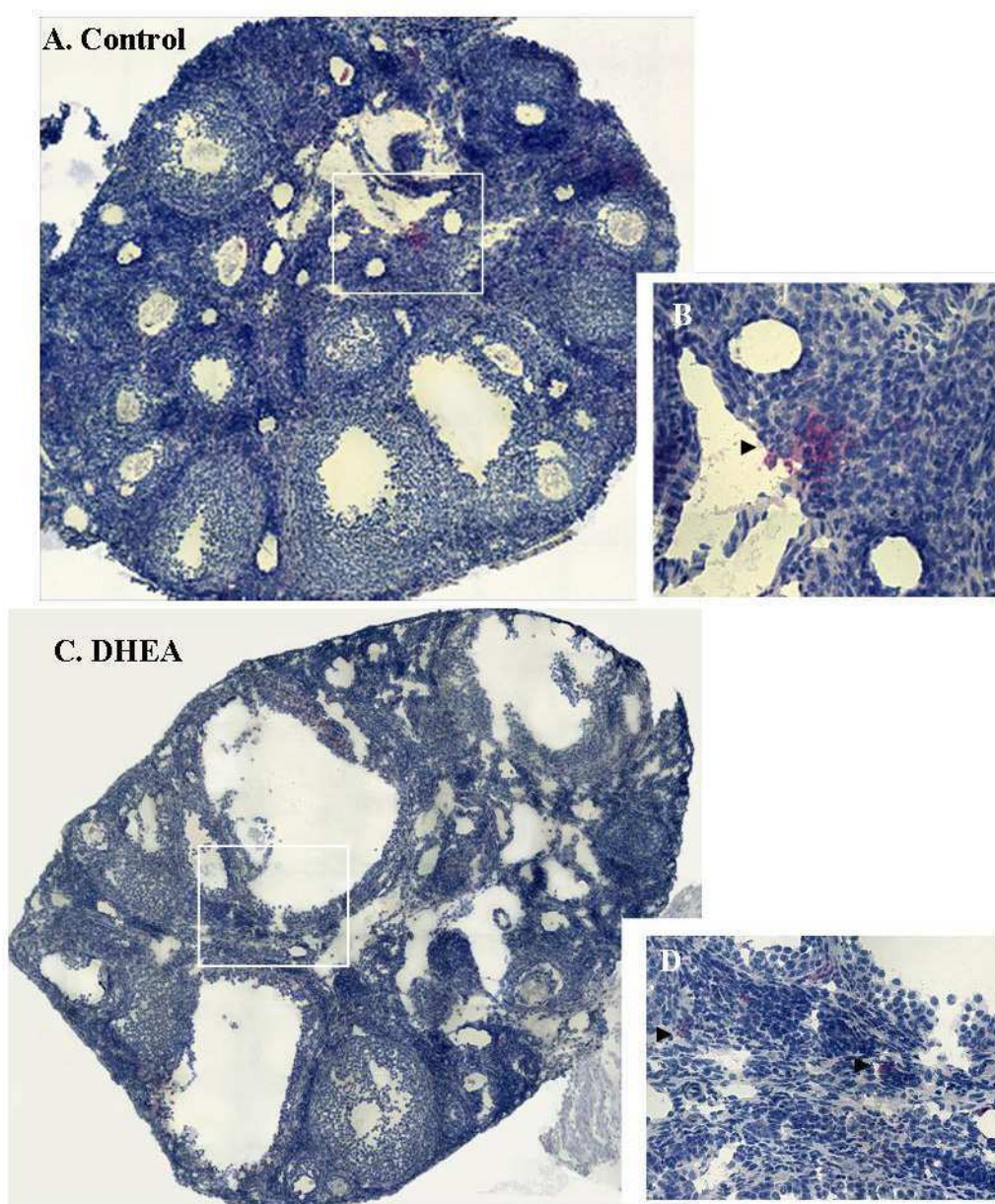
**Presencia y localización de células MHCII<sup>+</sup> en ovarios:** Las células que expresan MHCII son las conocidas como células presentadoras de antígenos, tradicionalmente células dendríticas, células B y macrófagos. En la sección anterior se observó que el número de células dendríticas en ovario es muy bajo y de distribución extra-folicular (intersticial). Por otro lado la presencia de linfocitos B en ovarios murinos ha sido reportada como escasa mientras que la de macrófagos considerablemente cuantiosa (Bukulmez y Arici, 2000). Por estos motivos, se utilizó el receptor MHCII como marcador de macrófagos en ovario.

El análisis de las secciones de ovarios reveló una alta frecuencia de células MHCII<sup>+</sup> en ovarios controles y androgenizados. En ambos grupos se los observó localizados principalmente en la capa de células de la teca de los folículos en distintos estadios de desarrollo, infiltrando hacia la granulosa solo en los folículos pequeños antes mencionados que expresaran ICAM-1 (figura 16. y 17. A y B) y, en el caso de encontrarse cuerpos lúteos, entre las células luteales.

Asimismo, en ovarios de animales androgenizados se observó una cuantiosa infiltración de células MHCII<sup>+</sup> en las capas de la teca y de la granulosa y en el antro de los quistes (figura 17.B).

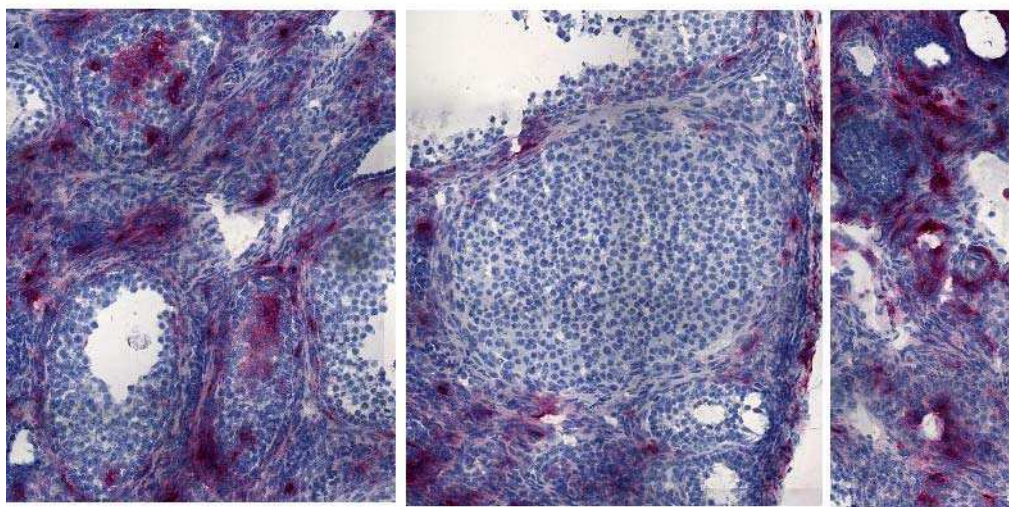
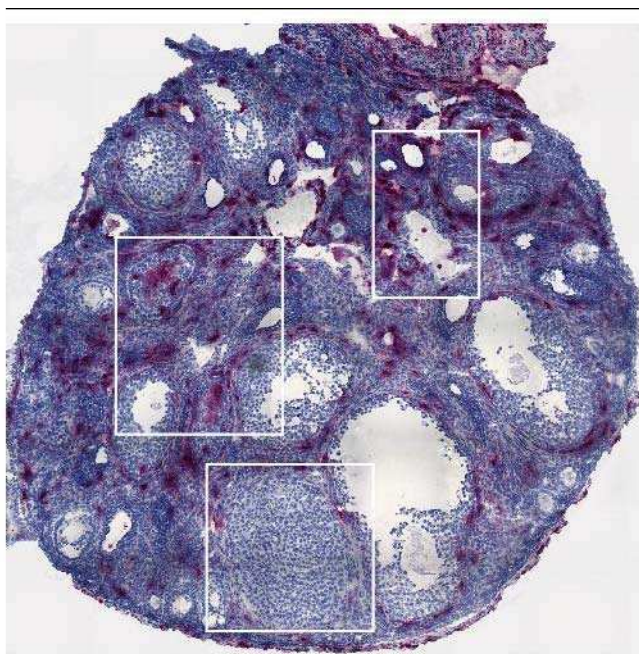
Por último, tanto en ovarios de animales tratados con vehículo como con DHEA, se observó distribución de células MHCII<sup>+</sup> en la porción intersticial y en la periferia de los vasos sanguíneos (figura 16. y 17. D).

**Presencia de células dendríticas CD11c+ en ovario**



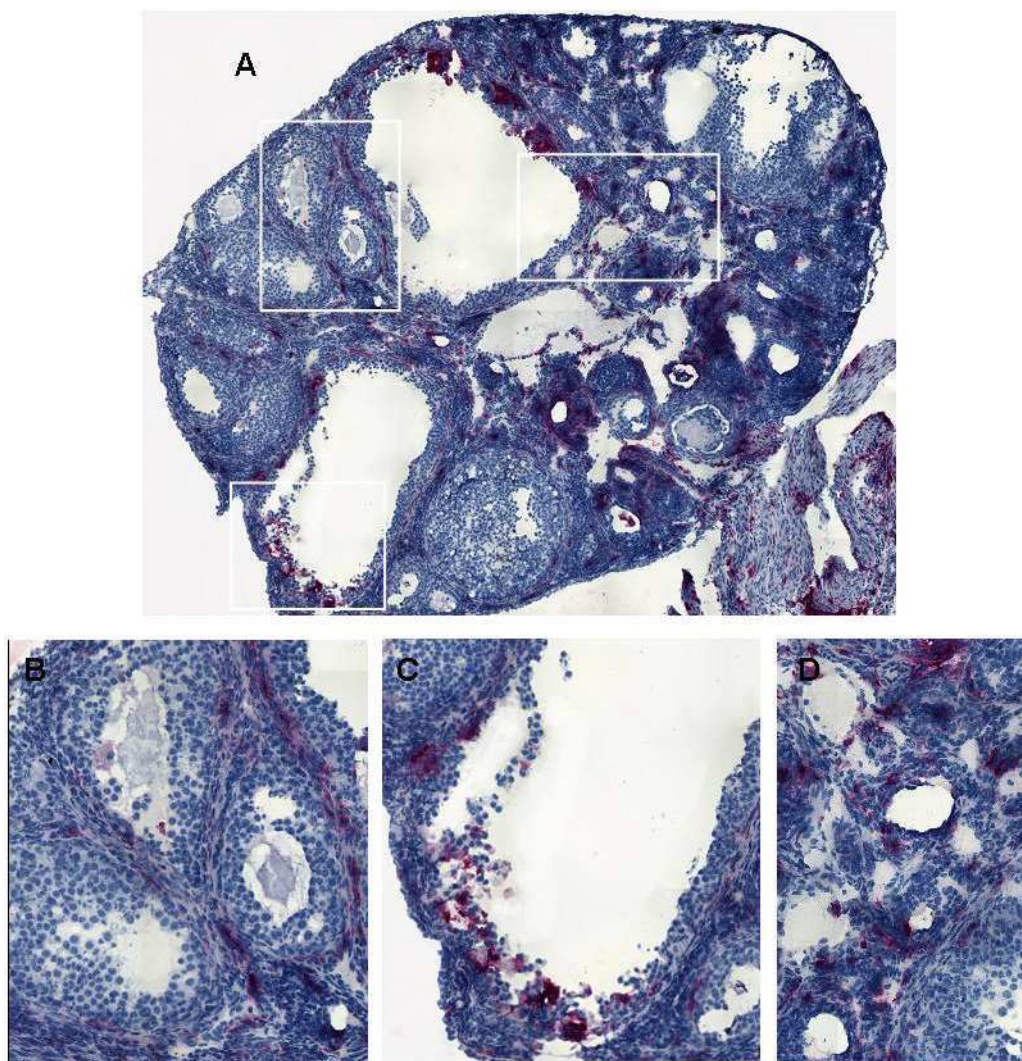
**Figura 15: Las células dendríticas ováricas no modificaron su número y localización por efecto de la androgenización.** Las fotos muestran secciones de ovarios representativas para los animales tratados con (A) vehículo ó (C) DHEA, en las cuales se detectó la presencia de células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>, rosa) por la técnica de inmunohistoquímica. Las ampliaciones (B y D) muestran células dendríticas (punta de flecha) agrupadas o individuales ubicadas en el tejido conectivo. La tinción se observó en muy baja frecuencia. Amplificación 25 X (A) y (C), 100 X (B) y (D). Contratinción hematoxilina. n = 6; réplicas = 2.

### Localización Fisiológica de Células MHCII+ en Ovarios



**Figura 16: Localización de células MHCII<sup>+</sup> en ovarios.** La foto (A) muestra una sección de tejido ovárico representativo del grupo control, en los que se realizó la inmunomarcación de MHCII (rosa). Las ampliaciones muestran detalles de (B) folículos en distintas etapas de desarrollo, (C) un folículo antral y (D) la vasculatura medular. Se observó alto número de células MHCII<sup>+</sup> en el ovario. Las mismas se localizaron en la capa de células de la Teca de folículos en distintos estadíos, infiltrando en la granulosa de algunos folículos pre-antrales, en el estroma ovárico y endotelio de vasos sanguíneos. Amplificación 25 X en (A) y 200 X en (B), (C) y (D), contratinción hematoxilina. n = 6; réplicas = 2.

**Localización de Células MHCII+ en Ovarios Poliquisticos**

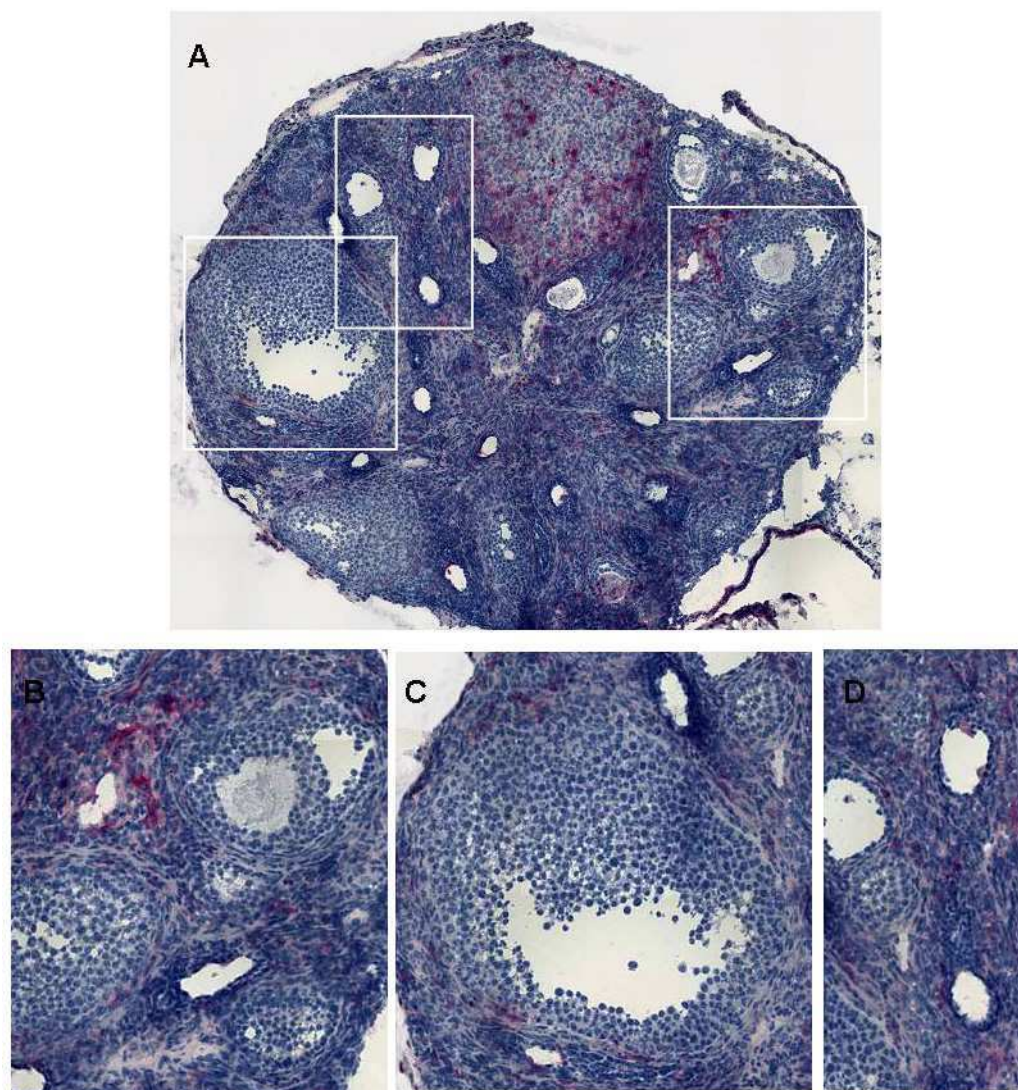


**Figura 17: Localización de células MHCII+ en ovarios quísticos.** La foto (A) muestra una sección de tejido ovárico representativo del grupo de animales androgenizados, en los que se realizó la inmunomarcación de MHCII (rosa). Las ampliaciones muestran detalles de (B) folículos en distintas etapas de desarrollo, (C) un quiste folicular y (D) la vasculatura medular. Se observó una alta infiltración de células MHCII+ en la granulosa y antro de los quistes y, al igual que en controles, localizadas en la capa de células de la Teca de folículos en distintos estadios, en el estroma ovárico y endotelio de vasos sanguíneos. Amplificación 25 X en (A) y 200 X en (B), (C) y (D), contratinción hematoxilina. n = 6; réplicas = 2.

***Presencia y localización de células CD4<sup>+</sup> en ovarios:*** Tanto en ovarios de animales controles como androgenizados, los linfocitos CD4<sup>+</sup> se encontraron en menor número que los macrófagos. Se localizaron principalmente en el intersticio en la periferia de los vasos sanguíneos, en el caso de que hubiera cuerpo lúteo entre las células luteales y, en menor medida, infiltrando las capas de células de la teca. Al igual que las células MHCII<sup>+</sup>, en los casos excepcionales en que se expresara VCAM-1 e ICAM-1 en células de la granulosa de folículos pequeños se encontraron también células CD4<sup>+</sup> infiltrando hacia las capas de células de la granulosa.

Por su parte, en los quistes, se observó una cuantiosa infiltración de estos linfocitos tanto hacia el antro como entre las células de la granulosa (figura 19.C).

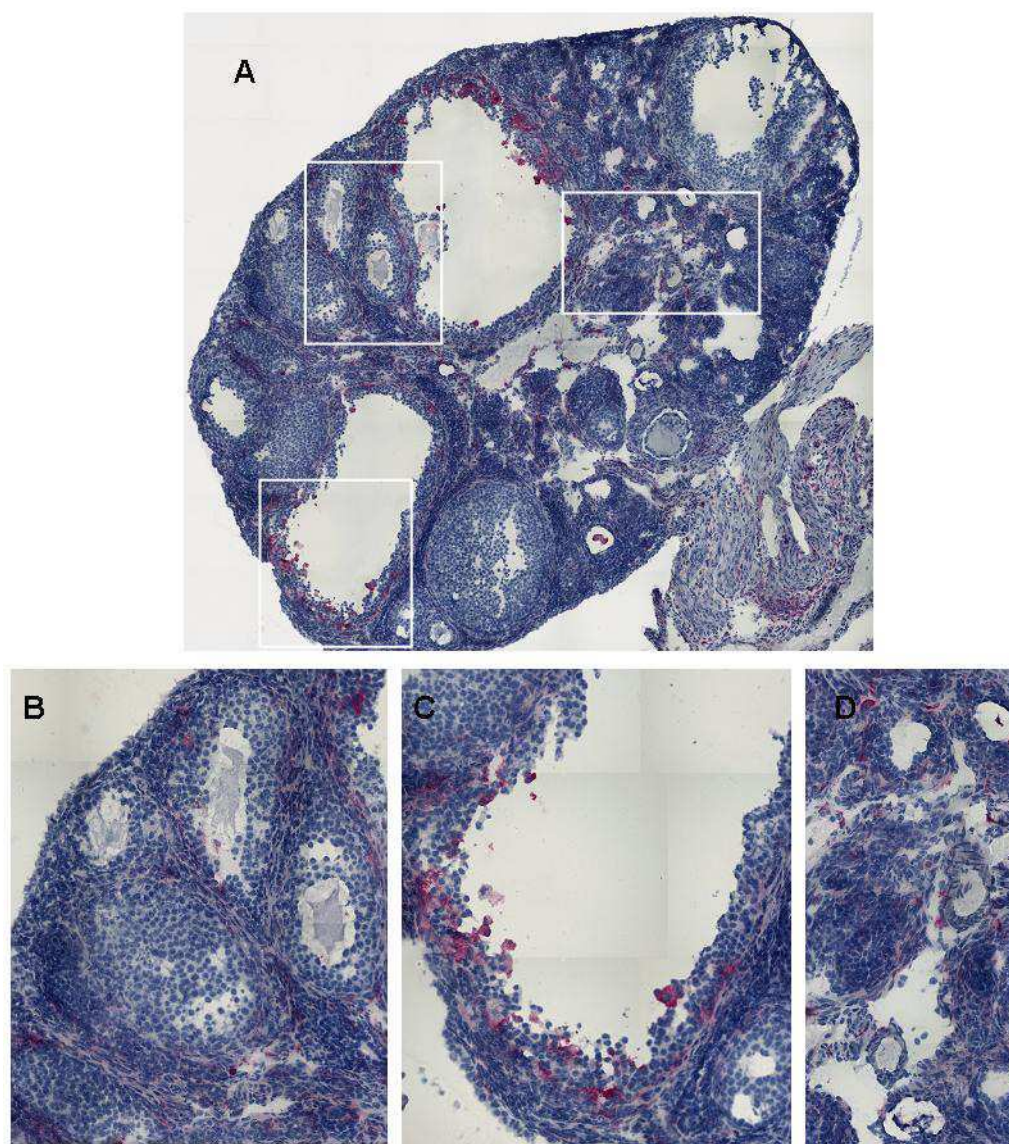
### Localización Fisiológica de Células CD4+ en Ovarios



**Figura 18: Localización de células CD4<sup>+</sup> en ovarios.** La foto (A) muestra una sección de tejido ovárico representativo del grupo control, en los que se realizó la inmunomarcación de CD4 (rosa). Las ampliaciones muestran detalles de (B) folículos en distintas etapas de desarrollo, (C) un folículo antral y (D) la vasculatura medular. Las células CD4<sup>+</sup> ováricas se localizaron en la capa de células de la teca de folículos en distintos estadíos, infiltrando en la granulosa de bajo número folículos pre-antrales y del cuerpo lúteo, en el estroma ovárico y periféricos a vasos sanguíneos. Amplificación 25 X en (A) y 200 X en (B), (C) y (D), contratinción hematoxilina. n = 6; réplicas = 2.



**Localización de Células CD4<sup>+</sup> Ovarios Poliquisticos**

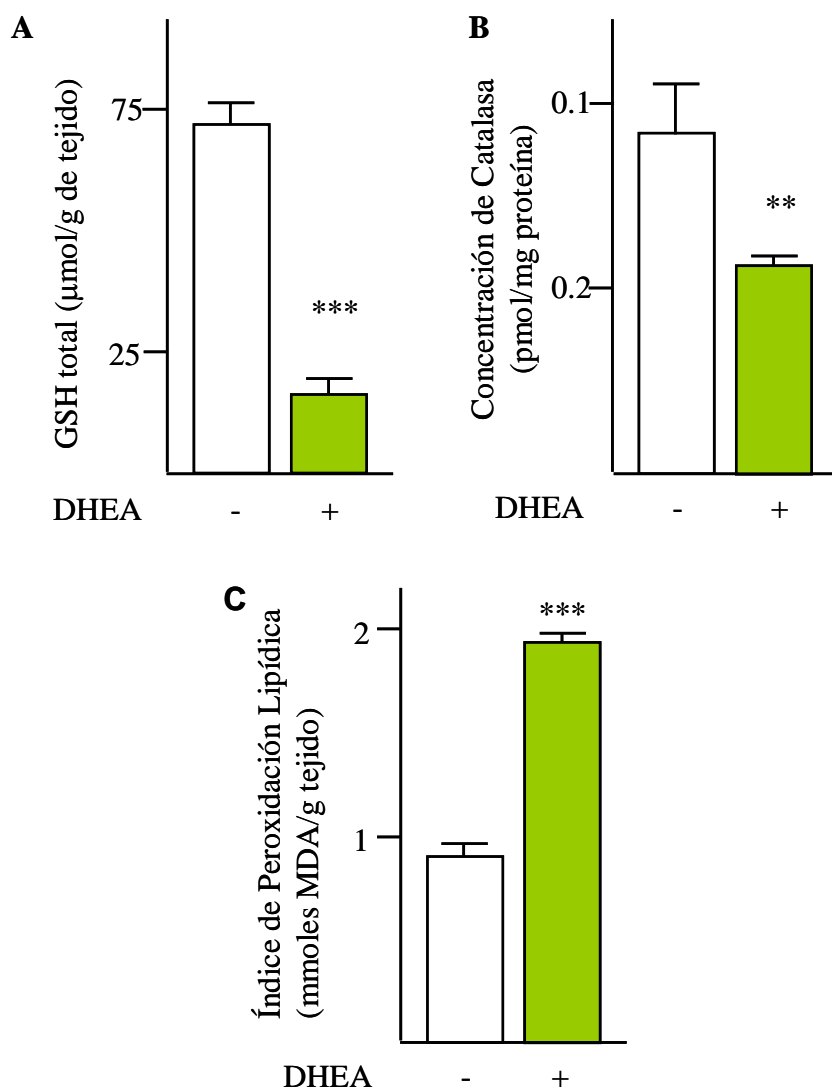


**Figura 19: Localización de células CD4<sup>+</sup> en ovarios de animales hiperandrogénicos.** La foto (A) muestra una sección de tejido ovárico representativo del grupo androgenizado, en los que se realizó la inmunomarcación de CD4 (rosa). Las ampliaciones muestran detalles de (B) folículos en distintas etapas de desarrollo, (C) un folículo quístico y (D) la vasculatura medular. Las células CD4<sup>+</sup> ováricas se encontraron infiltrando las capas de células de la teca y granulosa y el antro de los quistes, en la capa de células de la teca de folículos en distintos estadios, en el estroma ovárico y periféricos a vasos sanguíneos. Amplificación 25 X en (A) y 200 X en (B), (C) y (D), contratinción hematoxilina. n = 6; réplicas = 2.

### **1.3.2. Homeostasis de Óxido- Reducción en el Tejido Ovárico**

La producción de EROs en el tejido ovárico se ha encontrada involucrada en la modulación de procesos tanto fisiológicos, como patológicos o inmunes (Bonello y col., 1996; Minegishi y col., 2002). Se estudiaron los efectos de la hiperandrogenización sobre la homeostasis de óxido reducción en el ovario determinando por métodos colorimétricos al contenido de glutatión y la actividad de la catalasa como mecanismos antioxidantes y cuantificando la formación de peróxidos lipídicos como indicador del daño oxidativo tisular.

Tanto los niveles de glutatión como la actividad de la catalasa, se encontraron disminuidos en los tejidos de animales tratados con DHEA (figura 20.A y B) marcando una menor capacidad de neutralizar EROs. Asimismo, los productos de peroxidación lipídica en los ovarios se vieron incrementados por el tratamiento de androgenización. Estos resultados muestran una disminución de las defensas antioxidantes tisulares que junto con el aumento observado en la oxidación de componentes lipídicos, evidenciaría una alteración de la homeostasis de óxido-reducción hacia un estado de estrés oxidativo.

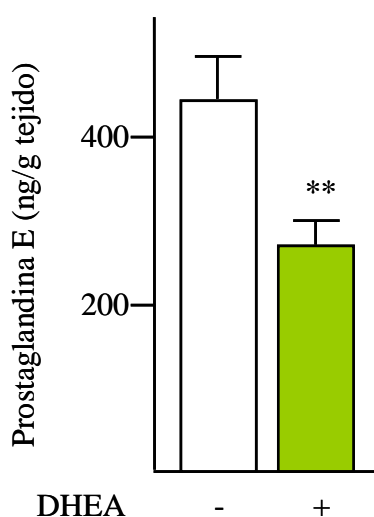
**Efecto de la androgenización sobre el estrés oxidativo ovárico**

**Figura 20: La hiperandrogenización aumentó el estrés oxidativo ovárico.** Los gráficos muestran los niveles de GSH intracelular (A), de actividad de la Catalasa (B) y del Índice de Peroxidación Lipídica (C) en ovarios de animales controles y androgenizados. Las barras representan la media  $\pm$  ESM.  $n = 7$ . \*\*  $p < 0.005$  y \*\*\*  $p < 0.0005$ . Mann Whitney U Test.

### 1.3.3. Producción de Prostaglandina E<sub>2</sub> por parte del Ovario

Las prostaglandinas, además poseer efectos inmunoregulatorios (Harris y col., 2002) están involucradas en diversas funciones ováricas (Husein y Kridli, 2003; Medan y col., 2003)). Por estos motivos se determinó la producción ovárica de PGE<sub>2</sub>, mediante la técnica de radioinmunoensayo. Los tejidos de animales androgenizados produjeron niveles de PGE significativamente menores comparados a los tejidos del grupo control (figura 21).

#### Producción de PGE por Parte del Tejido Ovárico



**Figura 21: La androgenización con DHEA suprimió la producción de PGE<sub>2</sub> por parte de los ovarios.** Los gráficos muestran los niveles de PGE liberados al medio de cultivo por ovarios de animales controles y androgenizados. Las barras representan la media  $\pm$  ESM. n = 5. \*\* p < 0.005. Mann Whitney U Test.

## **2. Estudios *in Vitro***

### ***Efectos Directos de la DHEA sobre Células Inmunes***

En esta sección se estudiaron mediante cultivos de leucocitos los efectos directos de la DHEA sobre diversos parámetros de diferenciación y funcionalidad de las células inmunes para poder diferenciarlos de los efectos ocasionados por las alteraciones endócrinas y metabólicas *in vivo*.

#### **2.1. Expresión de Marcadores de Activación y Moléculas de Adhesión en Poblaciones Celulares Claves para la Respuesta Inmune**

La activación y diferenciación linfocitaria involucran cambios en la expresión de proteínas de membrana, que pueden ser cuantificados por citometría de flujo para ser usados como marcadores de estos procesos. Dado que la administración de DHEA *in vivo* afectó la infiltración linfocitaria en ovarios y aumentó la fracción de células T helper circulantes (figura 8, 9, 16-19), se estudió la capacidad de inducir en forma directa la expresión de moléculas de adhesión y marcadores de activación sobre distintas poblaciones celulares en cultivos tratados por 21 horas en un primer grupo y, dado que la complejidad del proceso de activación puede requerir tiempos mayores, en un segundo grupo se prolongaron las incubaciones a 48 horas. La expresión de receptores de interés luego de los distintos períodos de incubación con la hormona fueron estudiados por citometría de flujo y se observaron los cambios producto del tiempo de cultivo (independientes del tratamiento) comparando la expresión de marcadores celulares a las 21 y 48 horas.

**Caracterización de células CD4<sup>+</sup>**

A. 21 horas	Concentración de DHEA (µM)			
	0	0,1	1	10
Marcadores Celulares				
CD3 <sup>+</sup> (% linfocitos)	74,15 ± 1,02	74,20 ± 1,13	73,32 ± 1,18	74,08 ± 0,96
CD4 <sup>+</sup> (% células T)	69,72 ± 0,19	69,74 ± 0,13	69,86 ± 0,18	69,82 ± 0,18
VLA-4 <sup>+</sup> (% CD4 <sup>+</sup> )	96,55 ± 0,10	94,90 ± 0,25*	95,16 ± 0,19*	95,33 ± 0,17*
CD25 <sup>+</sup> LFA-1 <sup>+</sup> (% VLA-4 <sup>+</sup> )	8,49 ± 0,38	8,40 ± 0,19	8,37 ± 0,37	8,26 ± 0,34
VLA-4 <sup>+</sup> (% CD4 <sup>+</sup> )	4,45 ± 0,10	5,10 ± 0,25*	4,84 ± 0,19*	4,67 ± 0,17*
CD25 <sup>+</sup> LFA-1 <sup>+</sup> (% VLA-4 <sup>+</sup> )	8,92 ± 0,45	8,25 ± 0,53	8,15 ± 0,29	7,93 ± 0,32
CD25 <sup>+</sup> (% CD4 <sup>+</sup> )	9,49 ± 0,46	9,36 ± 0,26	9,43 ± 0,42	9,64 ± 0,35
LFA-1 <sup>+</sup> (% CD4 <sup>+</sup> )	88,60 ± 0,71	88,60 ± 0,62	87,18 ± 0,91	85,60 ± 1,22

B. 48 horas	Concentración de DHEA (µM)			
	0	0,1	1	10
Marcadores Celulares				
CD3 <sup>+</sup> (% linfocitos)	75,76 ± 0,54	75,88 ± 0,50	75,86 ± 0,61	76,08 ± 0,58
CD4 <sup>+</sup> (% células T)	70,74 ± 0,24	70,53 ± 0,28	70,66 ± 0,22	70,83 ± 0,28
VLA-4 <sup>+</sup> (% CD4 <sup>+</sup> )	98,41 ± 0,10	98,13 ± 0,08*	98,14 ± 0,09*	98,09 ± 0,07*
CD25 <sup>+</sup> LFA-1 <sup>+</sup> (% VLA-4 <sup>+</sup> )	7,54 ± 0,33	9,02 ± 0,61	9,52 ± 0,50*	10,00 ± 0,89*
VLA-4 <sup>+</sup> (% CD4 <sup>+</sup> )	1,59 ± 0,10	1,88 ± 0,08*	1,87 ± 0,09*	1,91 ± 0,07*
CD25 <sup>+</sup> LFA-1 <sup>+</sup> (% VLA-4 <sup>+</sup> )	19,9 ± 1,4	22,42 ± 1,48	24,60 ± 1,08*	25,12 ± 1,11*
CD25 <sup>+</sup> (% CD4 <sup>+</sup> )	9,30 ± 0,40	11,15 ± 0,72*	11,94 ± 0,37**	12,91 ± 1,11**
LFA-1 <sup>+</sup> (% CD4 <sup>+</sup> )	58,01 ± 1,19	61,20 ± 1,90*	60,87 ± 1,90	57,98 ± 2,42

**Tabla 3: Resumen de la expresión de moléculas de adhesión y marcadores de superficie en subpoblaciones de células T CD4<sup>+</sup> luego de 21 (A) y 48 (B) horas de incubación con medio de cultivo control o con concentraciones crecientes de DHEA. Valores expresados como porcentaje del cuadrante parental. n = 6 por grupo. \* p< 0.05, \*\* p< 0.01 Mann Whitney U Test.**

### Células T

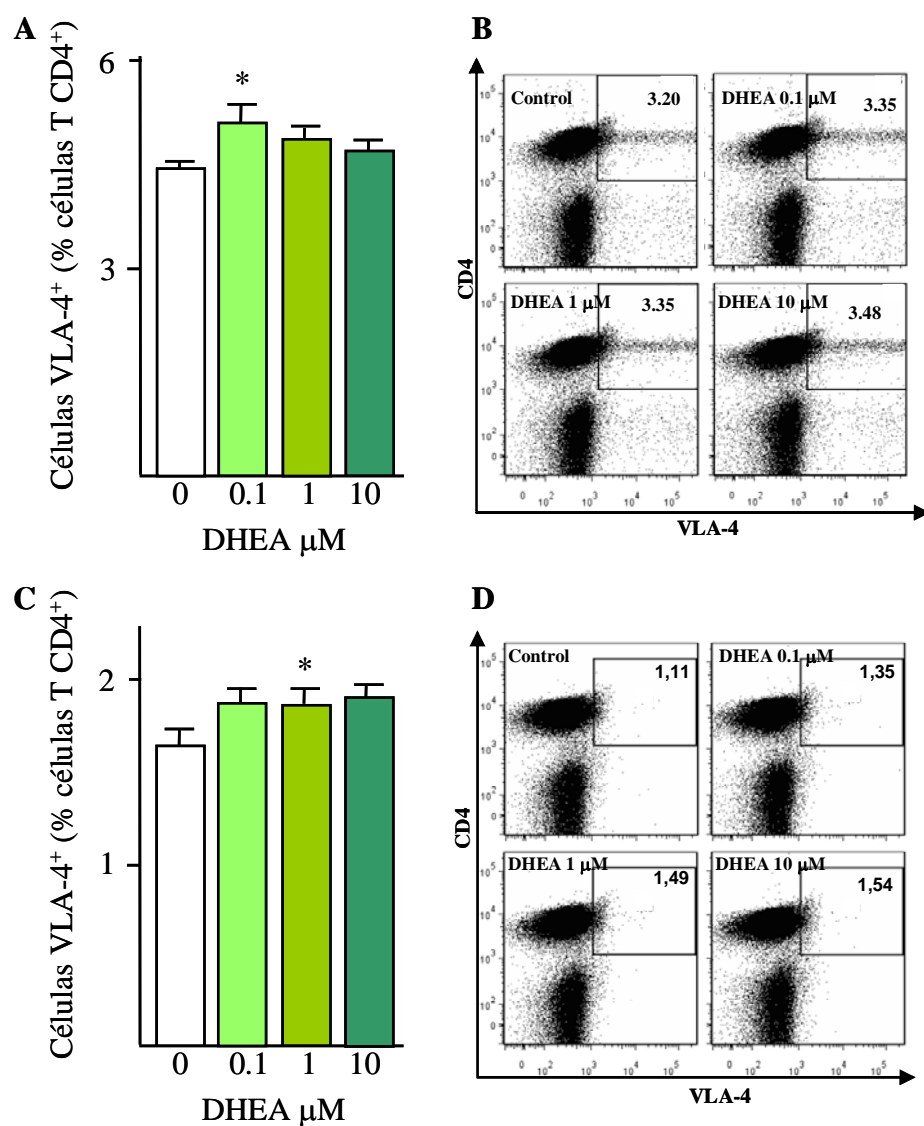
La fracción de células T ( $CD3^+$ ), Th ( $CD4^+CD3^+$ ) y T supresoras/citotóxicas ( $CD8^+CD3^+$ ) no fueron afectadas por los tratamientos con DHEA por 21 ni por 48 horas de incubación, sin embargo. Al comparar los cultivos a ambos tiempos, se observó una tendencia al aumento de la fracción de células T. Si bien esta tendencia no alcanzó niveles significativos, sin embargo se reflejó en un incremento moderado pero significativo de la fracción de células T  $CD4^+$  a las 48 horas (Tabla 3.a y b), mientras que la frecuencia de células  $CD8^+$  se mantuvo constante (Tabla 4.a y b).

*Expresión de Moléculas de Adhesión e IL-2R $\alpha$  en Células Th:* Al analizar la expresión en membrana de moléculas de adhesión se observó que DHEA indujo un incremento de VLA-4 en células  $CD4^+$ , que fue significativo en los cultivos tratados con DHEA 0,1  $\mu$ M a las 21 horas y con 1  $\mu$ M a las 48 horas (figura 22). Se encontró mayor número de células expresando VLA-4 y en mayor intensidad en las estimulaciones de 21 horas que en las de 48 horas, lo cual indica que DHEA no solo induce la expresión en membrana de la misma sino que estimula que permanezca en el tiempo. Es importante destacar que VLA-4 no sólo es la molécula de adhesión leucocitaria sino también es frecuentemente usado como marcador de diferenciación a células  $CD4^+$  efectoras (Fainboim y Geffner, 2005).

Las células  $VLA-4^+CD4^+$  se caracterizaron por expresar LFA-1 en más de un 90 % y bajos niveles de la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2 (IL-2R = CD25, figura 23. A y B). A las 48 horas de incubación, la DHEA indujo un aumento significativo de la expresión en membrana de dicho receptor (figura 25. C y D).

*Expresión de Moléculas de Adhesión y IL-2R $\alpha$  en Células T supresoras/citotóxicas:* las células T  $CD8^+$  tratadas con DHEA mostraron una tendencia al incremento en la expresión de CD25 a las 21 horas, que resultó en un aumento significativo del mismo a las 48 horas (tabla 4, Fig 24). Las células  $CD8^+CD25^+$  mostraron mayor expresión de LFA-1 que aquellas  $CD25^-$ . Los niveles de VLA-4 fueron bajos en ambos casos y, al igual que su expresión en las células  $CD4^+$ , disminuyeron a las 48 h en relación a la observada a las 21 h. En estas células la expresión de moléculas de adhesión no fue modulada por DHEA.

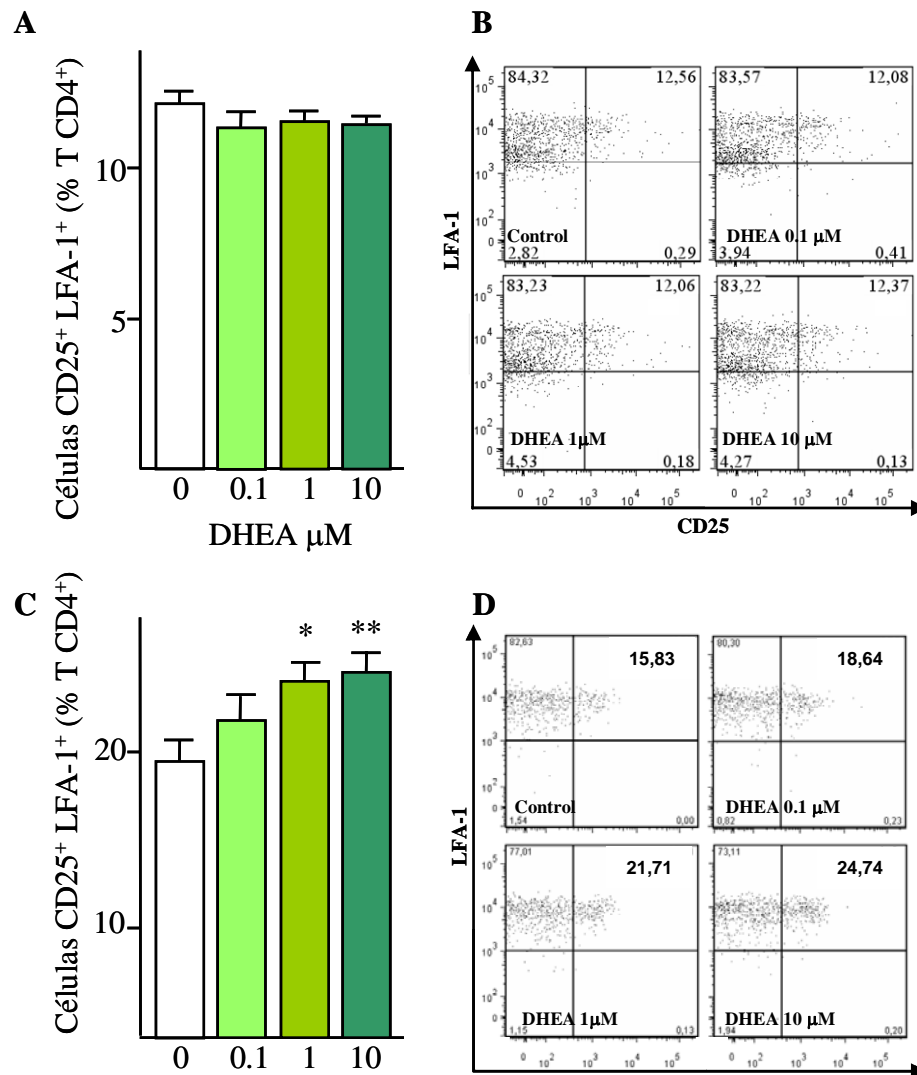
## Efecto del DHEA sobre la expresión de moléculas de adhesión



**Figura 22: El tratamiento con DHEA incrementó la expresión de VLA-4 en células T CD4<sup>+</sup>.** Expresión de VLA-4 en membrana de células TCD4<sup>+</sup> determinada por citometría de flujo luego de 21 (A) y 48 horas (C) de incubación. Gráficos de puntos representativos de las citometrías de flujo de los distintos grupos para 21 (B) y 48 horas (D) mostrando la intensidad de fluorescencia para CD4 (ordenadas) y VLA-4 (absisas) y el cuadrante determinado. Valores expresados como porcentaje del cuadrante parental. Las barras representan la media  $\pm$  ESM. n = 6. 2 réplicas. \*  $p < 0.05$ . Mann Whitney U Test.



Efecto del DHEA sobre la expresión de moléculas de adhesión



**Figura 23: El tratamiento con DHEA incrementó la expresión conjunta de CD25 y LFA en células T CD4<sup>+</sup>VLA-4<sup>+</sup>.** Expresión de CD25 y LFA-1 en membrana de células T CD4<sup>+</sup>VLA-4<sup>+</sup> determinada por citometría de flujo luego de 21 (A) y 48 horas (C) de incubación. Gráficos de puntos representativos de las citometrías de flujo de los distintos grupos para 21 (B) y 48 horas (D) mostrando la intensidad de fluorescencia para LFA-1 (ordenadas) y CD25 (absisas) y los cuadrantes usados. Valores expresados como porcentaje del cuadrante parental. Las barras representan la media  $\pm$  ESM. n = 6. 2 réplicas. \* p < 0.05, \*\* p < 0.001. Mann Whitney U Test.

**Caracterización de células CD8<sup>+</sup>**

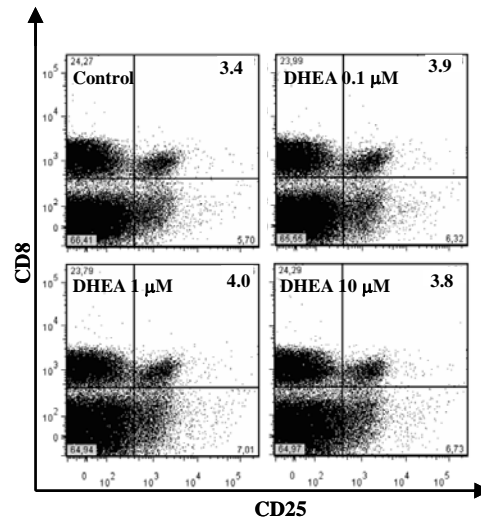
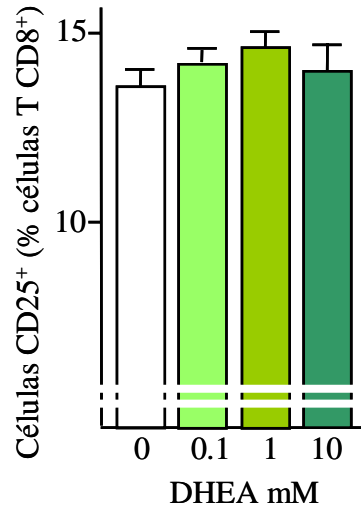
A. 21 horas	Concentración de DHEA (µM)			
	Marcadores Celulares	0	0,1	1
CD3 <sup>+</sup> (% linfocitos)	74,1 ± 1,0	74,2 ± 1,1	73,3 ± 1,2	74,1 ± 1,0
CD8 <sup>+</sup> (% células T)	27,12 ± 0,66	27,07 ± 1,05	26,78 ± 0,89	26,51 ± 0,89
CD25 <sup>-</sup> (% CD8 <sup>+</sup> )	86,41 ± 0,44	85,81 ± 0,40	85,36 ± 0,41	86,03 ± 0,71
VLA-4 <sup>-</sup> LFA-1 <sup>+</sup> (% CD25 <sup>-</sup> )	90,56 ± 0,34	90,24 ± 0,34	89,89 ± 0,36	88,90 ± 0,55
VLA-4 <sup>+</sup> LFA-1 <sup>+</sup> (% CD25 <sup>-</sup> )	3,07 ± 0,09	3,25 ± 0,29	3,33 ± 0,14	2,97 ± 0,12
CD25 <sup>+</sup> (% CD8 <sup>+</sup> )	13,59 ± 0,44	14,19 ± 0,40	14,64 ± 0,41	13,97 ± 0,71
VLA-4 <sup>-</sup> LFA-1 <sup>+</sup> (% CD25 <sup>+</sup> )	93,95 ± 0,30	94,07 ± 0,30	93,63 ± 0,55	92,53 ± 0,40
VLA-4 <sup>+</sup> LFA-1 <sup>+</sup> (% CD25 <sup>+</sup> )	2,54 ± 0,16	2,50 ± 0,12	2,66 ± 0,20	2,51 ± 0,20
VLA-4 <sup>+</sup> (% CD8 <sup>+</sup> )	2,51 ± 0,08	2,47 ± 0,09	2,75 ± 0,11	2,54 ± 0,08
LFA-1 <sup>+</sup> (% CD8 <sup>+</sup> )	94,02 ± 0,38	93,95 ± 0,39	93,74 ± 0,33	92,27 ± 0,47

B. 48 horas	Concentración de DHEA (µM)			
	Marcadores Celulares	0	0,1	1
CD3 <sup>+</sup> (% linfocitos)	75,76 ± 0,54	75,88 ± 0,50	75,86 ± 0,61	76,08 ± 0,58
CD8 <sup>+</sup> (% células T)	27,20 ± 0,28	27,45 ± 0,34	27,15 ± 0,26	26,75 ± 0,46
CD25 <sup>-</sup> (% CD8 <sup>+</sup> )	76,52 ± 0,71	72,72 ± 0,93*	70,73 ± 0,55*	67,83 ± 2,95*
VLA-4 <sup>-</sup> LFA-1 <sup>+</sup> (% CD25 <sup>-</sup> )	84,17 ± 0,42	85,17 ± 0,64	85,10 ± 0,51	83,64 ± 0,77
VLA-4 <sup>+</sup> LFA-1 <sup>+</sup> (% CD25 <sup>-</sup> )	0,83 ± 0,11	0,97 ± 0,13	0,92 ± 0,13	1,04 ± 0,08
CD25 <sup>+</sup> (% CD8 <sup>+</sup> )	23,48 ± 0,71	27,28 ± 0,93*	29,27 ± 0,55*	32,17 ± 2,95*
VLA-4 <sup>-</sup> LFA-1 <sup>+</sup> (% CD25 <sup>+</sup> )	94,17 ± 0,27	94,25 ± 0,46	93,93 ± 0,52	93,42 ± 0,98
VLA-4 <sup>+</sup> LFA-1 <sup>+</sup> (% CD25 <sup>+</sup> )	0,81 ± 0,12	0,94 ± 0,08	1,03 ± 0,15	1,04 ± 0,06
VLA-4 <sup>+</sup> (% CD8 <sup>+</sup> )	1,01 ± 0,11	1,16 ± 0,12	1,14 ± 0,15	1,23 ± 0,09
LFA-1 <sup>+</sup> (% CD8 <sup>+</sup> )	87,40 ± 0,44	88,63 ± 0,67	88,68 ± 0,59	87,96 ± 0,88

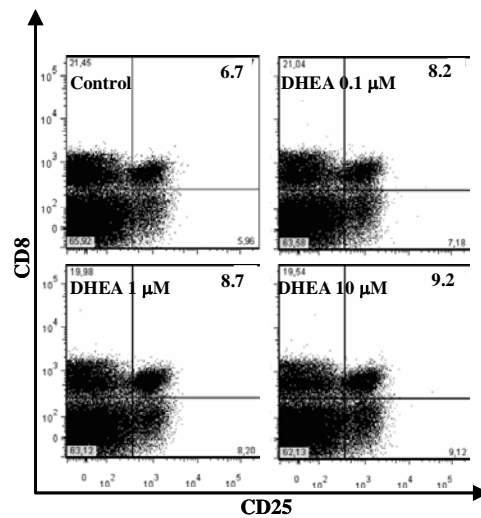
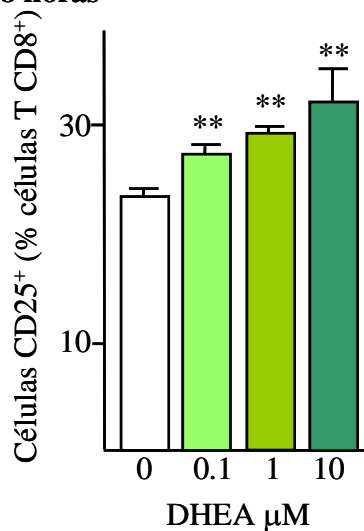
**Tabla 4: Resumen de la expresión de moléculas de adhesión y marcadores de superficie en subpoblaciones de células T CD8<sup>+</sup> luego de 21 (A) y 48 (B) horas de incubación con medio de cultivo control o con concentraciones crecientes de DHEA. Valores expresados como porcentaje del cuadrante parental. n = 6 por grupo. 2 réplicas. \* p< 0.05 Mann Whitney U Test.**

**Efecto del DHEA sobre la marcadores de células T CD8+**

**A. 21 horas**



**B. 48 horas**



**Figura 24: El tratamiento con DHEA por 48 horas incrementó la expresión de CD25 en células T CD8<sup>+</sup>.** Expresión de CD25 en membrana de células T CD8<sup>+</sup> determinada por citometría de flujo luego de 21 (A) y 48 horas (C) de incubación. Gráficos de puntos representativos de las citometrías de flujo de los distintos grupos para 21 (B) y 48 horas (D) mostrando la intensidad de fluorescencia para CD8 (ordenadas) y CD25 (absisas) y los cuadrantes usados. Valores expresados como porcentaje del cuadrante parental. Las barras representan la media  $\pm$  ESM. n = 6. 2 réplicas. \* p < 0.05, \*\* p < 0.005. Mann Whitney U Test.

### **Células de la Inmunidad Innata**

La fracción de macrófagos fue determinada por la expresión de células F4/80<sup>+</sup>. No se observaron efectos del tratamiento con DHEA en el número de macrófagos ni su expresión de moléculas de adhesión en los tiempos analizados (tabla 5). La fracción de macrófagos incrementó significativamente a las 48 horas de cultivo en relación a los niveles cuantificados a las 21 horas, mientras que su expresión en superficie de VLA-4, principal molécula de adhesión que dirige su migración, se encontró disminuída al comparar ambos puntos temporales (tabla 5, figura 25. C).

Los monocitos y granulocitos, caracterizados por los marcadores de superficie CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>-</sup>, no se vieron afectados por los tratamientos con DHEA a las 21 horas. Sin embargo, a las 48 horas altas concentraciones de DHEA (10 µM) disminuyeron la frecuencia de estos fagocitos comparado al grupo control, sin modificar los niveles de expresión en membrana de las moléculas de adhesión estudiadas (tabla 5). Por otro lado, la fracción de células CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>-</sup> aumentaron luego de 48 horas de incubación comparado a incubaciones de 21 horas, mientras que su expresión de VLA-4 y LFA-1 se vió disminuída en el mismo período de tiempo (tabla 5, figura 25. A).

La fracción de células dendríticas, diferenciadas por la expresión en superficie de CD11c, no presentó diferencias entre tratamientos luego de 21 horas de incubación, mientras que luego de 48 horas el tratamiento con DHEA 10 µM indujo una disminución de esta fracción celular comparado al control correspondiente. En estos tiempos, la DHEA no afectó la expresión de moléculas de adhesión. Al comparar los diferentes tiempos, se observó una disminución de células dendríticas luego de 48 horas de cultivo comparado a los cultivos de 21 horas, mientras que la expresión de moléculas de adhesión fue incrementada (tabla 5, figura 25. B).

**Células de la Inmunidad Innata**

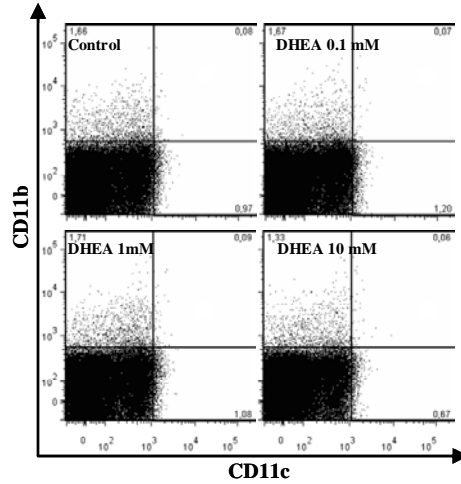
A. 21 horas	Concentración de DHEA (µM)			
	0	0,1	1	10
Marcadores Celulares				
F4/80 <sup>+</sup> (% leucocitos)	0,60 ± 0,07	0,62 ± 0,06	0,55 ± 0,05	0,55 ± 0,06
VLA-4 <sup>+</sup> (% Macrófagos)	61,74 ± 1,50	60,93 ± 1,83	57,77 ± 1,72	57,21 ± 2,37
CD11b <sup>+</sup> CD11C <sup>-</sup> (% F4/80 <sup>-</sup> )	0,61 ± 0,06	0,63 ± 0,04	0,58 ± 0,05	0,57 ± 0,06
VLA-4 <sup>+</sup> (% Fagocitos)	75,40 ± 0,59	77,34 ± 1,04	74,59 ± 1,24	73,55 ± 1,25
LFA-1 <sup>+</sup> (% Fagocitos)	22,44 ± 1,83	22,88 ± 1,37	21,47 ± 2,04	21,74 ± 1,53
CD11c <sup>+</sup> CD11b <sup>-</sup> (% F4/80 <sup>-</sup> )	1,55 ± 0,12	1,72 ± 0,15	1,28 ± 0,11	1,57 ± 0,10
VLA-4 <sup>+</sup> (% Células Dendríticas)	90,70 ± 0,95	91,10 ± 0,81	89,00 ± 0,99	89,69 ± 0,78
LFA-1 <sup>+</sup> (% Células Dendríticas)	2,80 ± 0,30	2,46 ± 0,24	2,381 ± 0,23	3,02 ± 0,29

B. 48 horas	Concentración de DHEA (µM)			
	0	0,1	1	10
Marcadores Celulares				
F4/80 <sup>+</sup> (% leucocitos)	0,84 ± 0,04	0,80 ± 0,07	0,76 ± 0,07	0,89 ± 0,16
VLA-4 <sup>+</sup> (% Macrófagos)	32,19 ± 2,44	30,30 ± 2,83	31,40 ± 2,16	27,03 ± 1,58
CD11b <sup>+</sup> CD11C <sup>-</sup> (% F4/80 <sup>-</sup> )	1,56 ± 0,06	1,50 ± 0,10	1,42 ± 0,10	1,33 ± 0,07*
VLA-4 <sup>+</sup> (% Fagocitos)	73,73 ± 1,42	73,10 ± 1,09	71,40 ± 1,11	70,85 ± 1,48
LFA-1 <sup>+</sup> (% Fagocitos)	19,08 ± 2,01	17,89 ± 1,72	18,36 ± 2,11	17,95 ± 2,11
CD11c <sup>+</sup> CD11b <sup>-</sup> (% F4/80 <sup>-</sup> )	1,16 ± 0,13	1,01 ± 0,08	0,94 ± 0,10	0,74 ± 0,12*
VLA-4 <sup>+</sup> (% Células Dendríticas)	92,56 ± 0,54	92,34 ± 0,56	92,11 ± 0,23	92,42 ± 0,46
LFA-1 <sup>+</sup> (% Células Dendríticas)	5,22 ± 0,72	4,80 ± 0,63	5,27 ± 0,75	5,91 ± 0,32

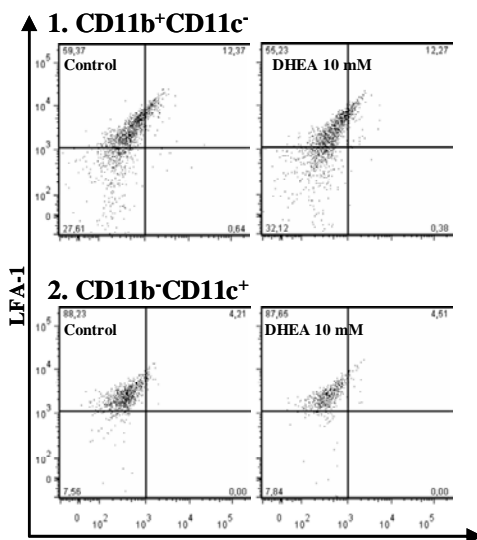
**Tabla 5: Resumen de la expresión de moléculas de adhesión y marcadores de superficie en subpoblaciones de células de la inmunidad innata** luego de 21 (A) y 48 (B) horas de incubación con medio de cultivo control o con concentraciones crecientes de DHEA. Valores expresados como porcentaje del cuadrante parental. n = 6 por grupo. 2 réplicas. \* p< 0.05 Mann Whitney U Test.

Efecto del DHEA sobre Células de la Inmunidad Innata

A. Mo, Granulocitos (CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>) y Células Dendríticas (CD11b<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>)



B. Mo, Granulocitos y CD



C. Macrófagos

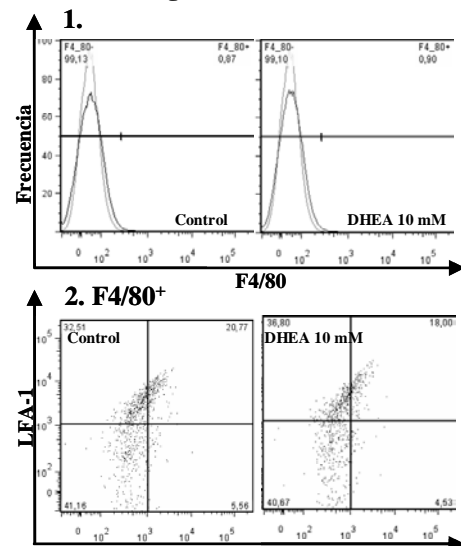


Figura 25: El tratamiento con DHEA por 48 horas disminuyó la fracción de Mo, granulocitos y células dendríticas. Gráficos de puntos e histogramas representativos de los resultados obtenidos por citometría de flujo de cultivos control o androgenizados por 48 horas. (A) En la ordenada se muestra la intensidad fluorescencia para CD11b y en la absisa para CD11c. Intensidad de fluorescencia de LFA-1 (ordenadas) y VLA-4 (absisas) para granulocitos y monocitos-Mo- (B.1), células dendríticas (B.2) y macrófagos (C.2). Histograma de frecuencia para células incubadas con anticuerpo F4/80 (línea negra), que identifica macrófagos, y control negativo (línea gris) (C.1). n = 6. 2 réplicas.

## 2.2. Ensayo de Proliferación Celular

La proliferación clonal es uno de los primeros procesos de la respuesta inmune adaptativa, inducida por la presentación antigénica y la activación de clones específicos (Mukherjee y col., 2005). Dado que la DHEA indujo la expresión de IL2R $\alpha$ , marcador de activación que posee un rol clave en la proliferación inducida por IL2, resultó de interés estudiar los efectos del andrógeno en este evento. Para ello se realizó el ensayo de incorporación de [ $^3$ H]-timidina en dos condiciones distintas:

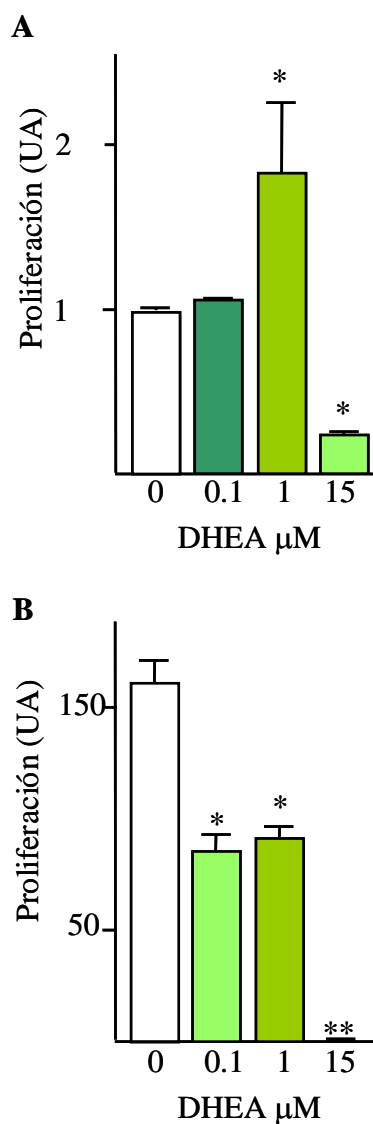
- en ausencia de mitógenos, para evaluar si la DHEA afecta *per se* la proliferación basal;
- en presencia de ConA, mitógeno que activa en forma inespecífica la proliferación de linfocitos T simulando una presentación antigénica por interacción con el TCR, para estudiar si la DHEA interfiere en el proceso de activación antigénica.

Los efectos del DHEA sobre la proliferación basal dependieron de la concentración de la hormona en el medio de incubación: a bajos niveles (0,1  $\mu$ M) no produjo efectos sobre la proliferación mientras que DHEA 1  $\mu$ M la incrementó y 10  $\mu$ M la suprimió significativamente (figura 7. A).

En el caso de los cultivos estimulados con ConA, todas las concentraciones de la hormona resultaron supresoras de la proliferación, en mayor grado en el caso de DHEA 10  $\mu$ M (figura 7. B).

El estudio del efecto de DHEA en la proliferación de células T fue reportado previamente en forma controvertida. A partir de estos resultados surgió la necesidad de estudiar los mecanismos que podrían estar involucrados en la modulación de la proliferación y de la activación. Entre ellos, nos propusimos estudiar la modulación de la síntesis de citoquinas, la inducción de apoptosis y el estrés oxidativo.

## Efecto del DHEA sobre la Proliferación Linfocitaria



**Figura 26: El tratamiento con DHEA afectó en forma dual la proliferación basal (A) e inhibió la estimulada mitogénicamente (B).** Los gráficos muestran la radioactividad intracelular resultado de la incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-timidina a la célula (UA respecto al control basal) para cultivos celulares no estimulados (A) y estimulados (B) con ConA 1  $\mu\text{M}$ . Las barras representan la media  $\pm$  ESM.  $n = 3$ . 2 réplicas. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ . Mann Whitney U Test.

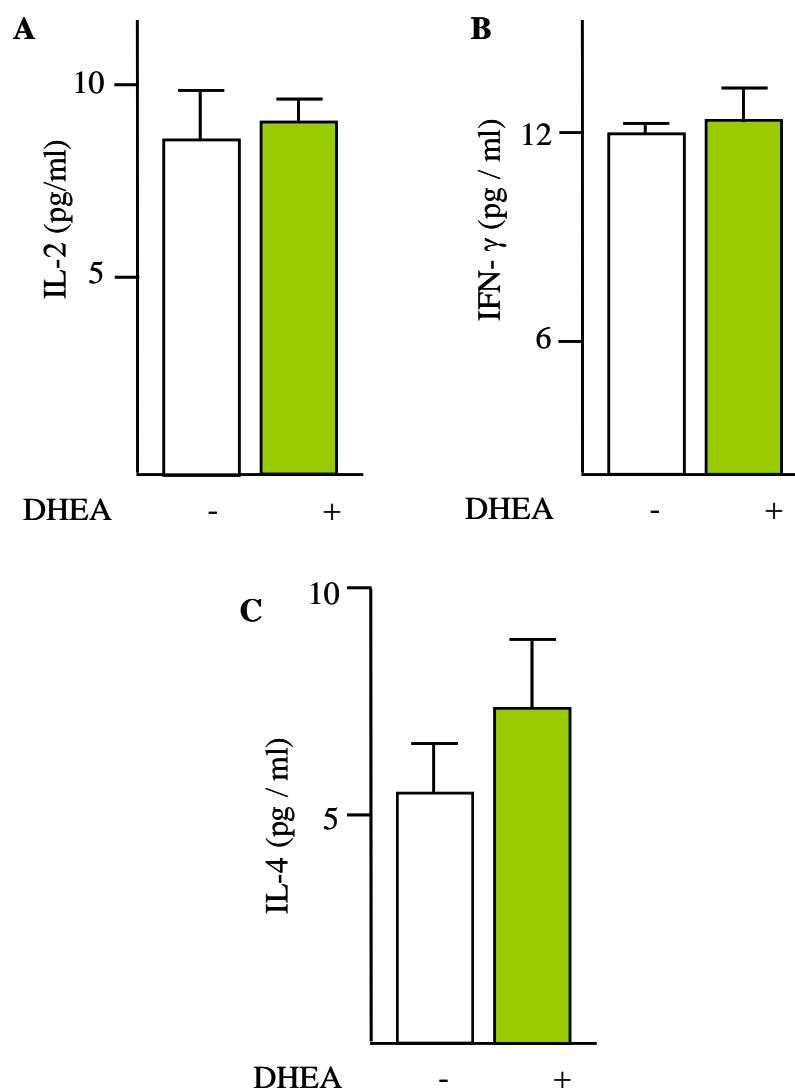


### 2.3. Cuantificación de Citoquinas en Medio de Cultivo

Las citoquinas son mediadores autócrinos y parácrinos que inducen y determinan la respuesta inmune (Abbas y col., 2008). En el caso de las células T, la secreción de IL-2 y expresión en membrana de sus receptores de alta afinidad estimulan la proliferación clonal. Por otro lado, el entorno de citoquinas determinará si la respuesta adaptativa será de tipo Th1, cuando durante la diferenciación está presente IFN- $\gamma$  en el medio, o Th2, en presencia de IL-4. Ensayos *in vivo* mostraron que la androgenización con DHEA aumenta la síntesis de citoquinas proinflamatorias (Th1) y la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> plasmáticos. Se demostró además que la DHEA puede modular la proliferación linfocitaria y estimular la expresión en superficie del IL-2R $\alpha$  *in vitro*. Por estos motivos se estudió si la DHEA es capaz de regular en forma directa la secreción de citoquinas detectando, mediante un kit comercial de ELISA, IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-4 en medios de cultivo luego de 21 horas de incubación.

La incubación con DHEA no alteró en forma significativa la secreción de las citoquinas estudiadas (Fig 27). Solo en el caso de IL-4 se observó un leve y no significativo incremento de la concentración.

**Acción de la DHEA sobre la Secreción de Citoquinas**



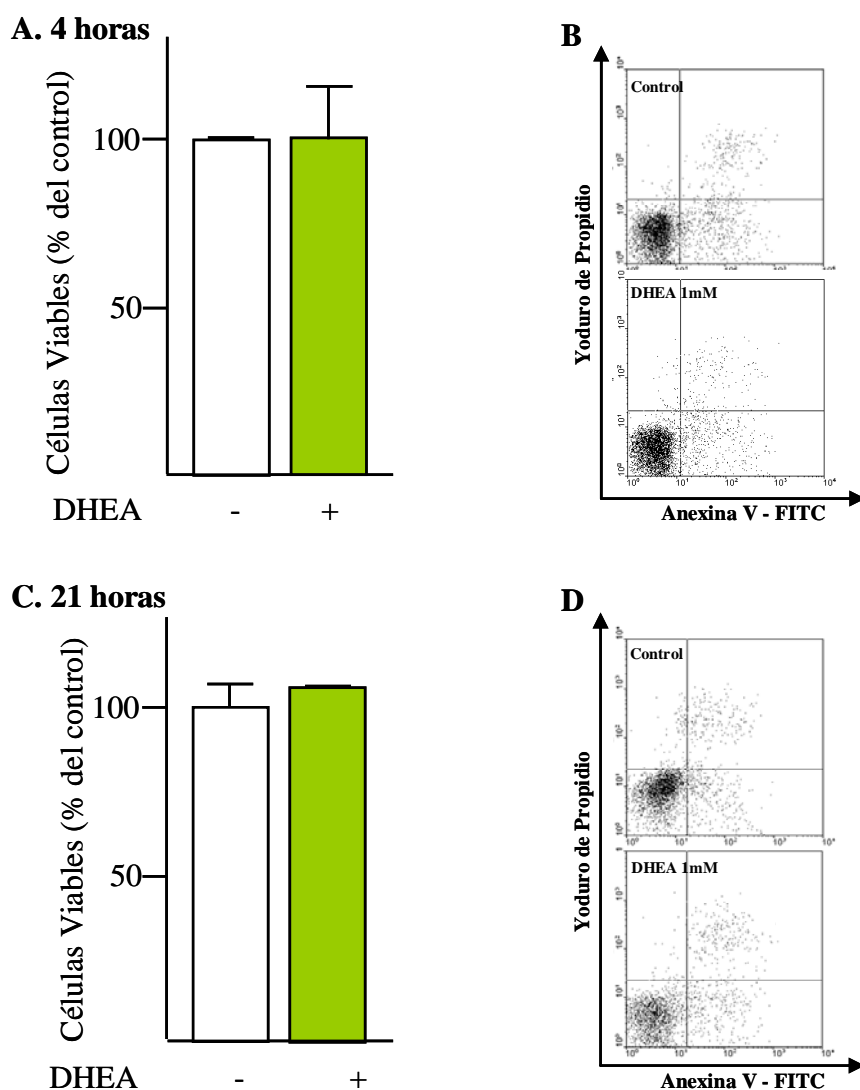
**Figura 27: El tratamiento con DHEA no indujo en forma significativa la secreción de citoquinas.** Los gráficos muestran la concentración en medio de cultivo condicionado de las citoquinas IL-2 (A) IFN- $\gamma$  y IL-4 luego de 21 horas de cultivo. Las barras representan la media  $\pm$  ESM. n = 7. Mann Whitney U Test. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0.05$ )

#### **2.4. Determinación de la Viabilidad Celular**

Como se explicó previamente, la activación linfocitaria involucra cambios en los patrones de expresión y activación proteica que involucran un aumento del IL-2R de alta afinidad y de la IL-2 que llevan a la proliferación clonal, y un estímulo a la síntesis de proteínas antiapoptóticas como Bcl-XL (Fainboim y Geffner, 2005). Asimismo, numerosos reportes han aportado evidencias de efectos pro apoptóticos como anti apoptóticos de la DHEA. Para estudiar las acciones de esta hormona sobre la sobrevivencia celular, se realizó un ensayo de anexina V- YP luego de 4 y 21 horas de incubación.

A las 4 horas no se observaron diferencias significativas entre cultivos controles y androgenizados en la inducción de apoptosis temprana o tardía, encontrándose la misma proporción de células viables (figura 28. A y B).

Dado que la inducción de apoptosis es un proceso que puede requerir más tiempo, como ser para la acumulación de EROs o la apoptosis por anergia linfocitaria, se repitió el ensayo luego de 21 horas de incubación. Sin embargo, nuevamente no se observaron diferencias entre cultivos androgenizados y controles en cuanto a la fracción de células viables y en diferentes estadios de la apoptosis (figura 28. C y D).

**Efecto de la DHEA sobre la Viabilidad Celular**

**Figura 28: El tratamiento con DHEA no afectó la viabilidad celular.** Los gráficos muestran el porcentaje de células viables (anexina V<sup>-</sup> YP<sup>+</sup>) con respecto al 100 % de células viables en el grupo control para incubaciones por 4 (A) y 21 (C) horas. Gráficos de puntos representativos de las citometrías de flujo de los distintos grupos para 21 (B) y 48 horas (D) mostrando la intensidad de fluorescencia para yoduro de propidio (ordenadas) y anexina V (absisas) y los cuadrantes usados para identificar células viables (anexina V<sup>-</sup> YP<sup>+</sup>), en apoptosis temprana (anexina V<sup>+</sup> YP<sup>+</sup>) y en apoptosis tardía o necrosis (anexina V<sup>+</sup> YP<sup>-</sup>). Las barras representan la media  $\pm$  ESM. n = 4. Mann Whitney U Test. No se observaron diferencias entre los grupos.

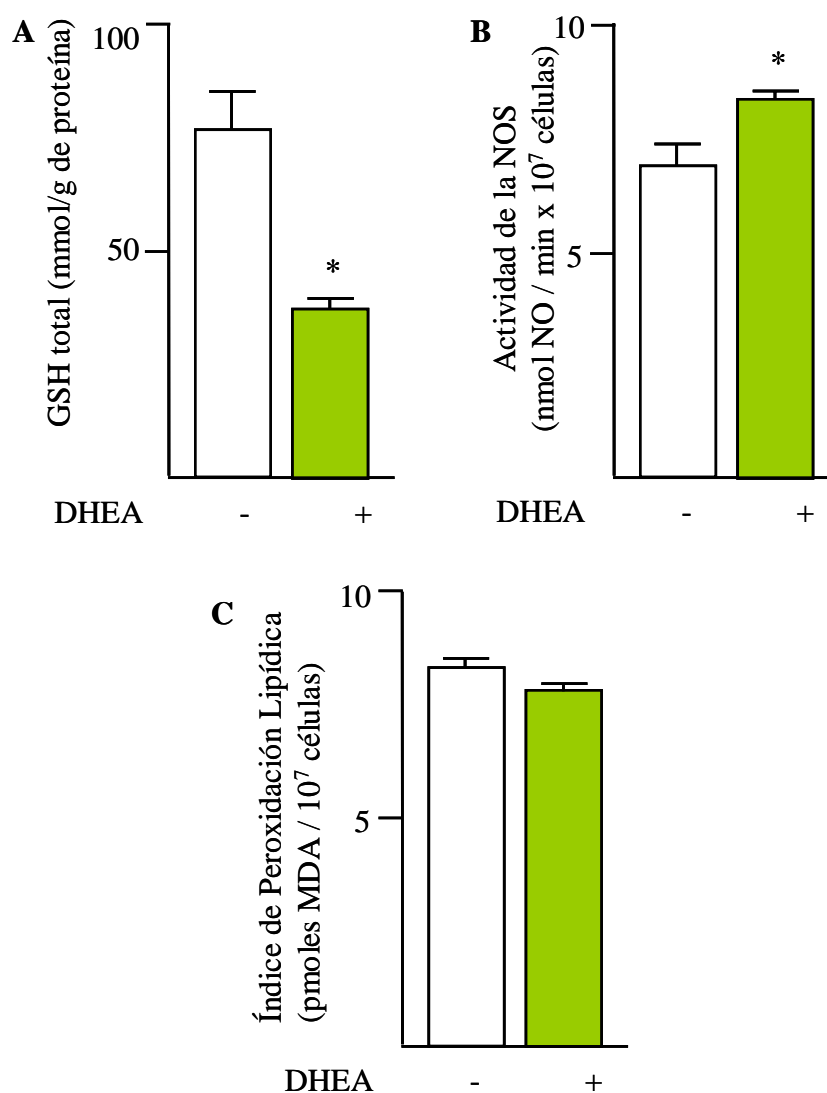
## 2.5. Determinación de Parámetros Relacionados a las EROs, ERNs y Estrés Oxidativo

Las especies reactivas del oxígeno se han visto implicadas en la regulación de procesos fisiológicos en células inmunes. Entre ellos, se encuentran implicadas en los procesos de migración, como factores quimioattractantes e inductores de la adhesión celular, en la fagocitosis y la citotoxicidad. Se observó que la administración de DHEA *in vivo* induce en el ovario un aumento del estrés oxidativo y una redistribución de células inmunes mientras que *in vitro* estimula la expresión de moléculas de adhesión. Asimismo, las EROs y ERNs pueden actuar como intermediarios en las vías de señalización implicadas en desencadenar la activación o la apoptosis en células linfocitarias (Tripathi y col., 2004).

En consecuencia, se estudió el rol de la DHEA en la homeostasis de óxido-reducción en leucocitos, determinando en forma espectrofotométrica el contenido de glutatión (GSH) intracelular, la actividad de la NOS por conversión de \*Arginina a \*Citulina y la peroxidación lipídica por la técnica de TBARS en cultivos androgenizados, en células incubadas por 4 horas.

Se observó que la incubación con DHEA indujo un aumento en la actividad de la NOS y consecuentemente de la producción de NO (figura 29. B). Esto se correspondió con una disminución en el contenido de GSH (figura 29. A), dado que el mismo es capaz de reaccionar con las ERNs al igual que con las EROs y neutralizarlas. Pese a los efectos observados del andrógeno sobre la homeostasis de óxido reducción celular, estos no modificaron los niveles de peroxidación lipídica (figura 29. C). Esto indicaría que la DHEA modula la producción de especies oxidantes en niveles que no resultan tóxicos para la célula y que podrían tener un rol en vías de señalización intracelular.

## Modulación de Parámetros del Estrés Oxidativo por DHEA



**Figura 29: El tratamiento con DHEA alteró la homeostasis de óxido reducción celular.** Los gráficos muestran los niveles de GSH intracelular (A), de actividad de la NOS (B) y del Índice de Peroxidación Lipídica (C) luego de 4 horas de incubación. Las barras representan la media  $\pm$  ESM. n = 5. \* p < 0.05. Mann Whitney U Test.

## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2008. Cellular and Molecular Immunology, 6th Edition. Postgrad Med J.

Abbott, DH, Barnett, DK, Bruns, CM, Dumesic, DA. 2005. Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome?. Human Reproduction Update, 11:4, 357–374.

Abbott, DH, Dumesic, DA, Franks, S. 2002. Developmental origin of polycystic ovary syndrome-a hypothesis. J Endocrinol 174, 1-5

Abbott, DH, Padmanabhan, V, Dumesic, DA. 2006. Contributions of androgen and estrogen to fetal programming of ovarian dysfunction. Reprod Biol Endocrinol 4:17.

Abisogun, AO, Daphna-Iken, D, Reich, R, Kranzfelder, D, Tsafiriri, A. 1988. Modulatory role of eicosanoids in vascular changes during the preovulatory period in the rat. Biol Reprod 38, 756-762.

Adams, J, Polson, DW, Franks, S. 1986. Prevalence of polycystic ovaries in women with anovulation and idiopathic hirsutism. Br Med J (Clin Res Ed); 293, 355–359.

Agarwal A, Gupta S, Sharma R. 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. Reproductive Biology and Endocrinology 3, 28.

Ahmad M, Theofanidis P, Medford RM. 1998. Role of activating protein-1 in the regulation of the vascular cell adhesion molecule-1 gene expression by tumor necrosis factor- $\alpha$ . J Biol Chem 273:4616–4621.

Akamine EH, Marc AC, Camporez JP, Hoshida MS, Caperuto LC, Bevilacqua E, Carvalho CRO. 2010. Obesity induced by high-fat diet promotes insulin resistance in the ovary. Jou of Endocrinol 206, 65-74.

Amato G, Izzo A, Tucker AT, Bellstella A. 1999. Lack of insulin-like growth factor binding protein-3 variation after follicle-stimulating hormone stimulation in women with polycystic ovary syndrome undergoing in vitro fertilization. Fertility and sterility 72:3, 454-457.

Amato MC, Verghi M, Nucera M, Galluzzo A, Giordano C. 2010. Low estradiol-to-testosterone ratio is associated with oligo-anovulatory cycles and atherogenic lipidic pattern in women with polycystic ovary syndrome. Gynecol Endocrinol, publicado online. 8 pág.

Amato, G, Conte, M, Mazziotti, G, Lalli, E, Vitolo, G, Tucker, A, Bellastella, A, Carella, C, Izzo, A. 2003. Serum and follicular fluid cytokines in polycystic ovary syndrome during stimulated cycles, *Obstetrics and Gynecology* 101:6, 1177-1182.

Anderson E y Lee K. 1997. The polycystic ovarian (PCO) condition: apoptosis and epithelialization of the ovarian antral follicles are aspects of cystogenesis in the dehydroepiandrosterone (DHEA)-treated rat model. *LeeTissue & Cell*, 1997 29 (2) 171 189

Anderson E, Lee GY, O'Brien K. 1997. Polycystic Ovarian Condition in the Dehydroepiandrosterone-Treated Rat Model: Hyperandrogenism and the Resumption of Meiosis are Major Initial Events Associated with Cystogenesis of Antral Follicles. *The Anatomical Record* 249:44-53

Anderson, E, Lee, MT, Lee GY. 1992. Cytogenesis of the ovarian antral follicle of the rat: ultra structural changes and hormonal profile following the administration of dehydroepiandrosterone. *The Anat. Rec.*, 234, 359-382.

Ando M, Kol S, Kokia E, Ruutiainen-Altman K, Sirois J, Rohan RM, Payne DW, Adashi EY. 1998. Rat Ovarian Prostaglandin Endoperoxide Synthase-1 and -2: Perioovulatory Expression of Granulosa Cell-Based Interleukin-1-Dependent Enzymes. *Endocrinology* 139, 2501-2508.

Andrikopoulos S, Blair AR, Deluca N, Fam BC, Proietto J. 2008. Evaluating the glucose tolerance test in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E1323-E1332.

Apter D. 1998. How possible is the prevention of polycystic ovary syndrome development in adolescent patients with early onset of hiperandrogenism. *J Endocrinol Inves*, 21, 613-617.

Arlt W, Auchus RJ, Miller, WL 2001. Thiazolidinediones but Not Metformin Directly Inhibit the Steroidogenic Enzymes P450c17 and  $3\beta$  -Hydroxysteroid Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 276(20): 16767-16771.

Armstrong, DT, Goff, AK, Dorrington, JH. 1979. *Ovarian Follicular Development and Function*. Raven Press, New York, 169-182

Aten, RF, Duarte, KM, Behrman, HR. 1992. Regulation of ovarian antioxidant vitamins, reduced glutathione, and lipid peroxidation by luteinizing hormone and prostaglandin F2 alpha. *Biol Reprod.* 46:3, 401-407.

Aukrust P, Muller F, Svardal AM, Ueland T, Berge RK, Froland SS. 2003 Disturbed glutathione metabolism and decreased antioxidant levels in human immunodeficiency virus-infected patients during highly active antiretroviral therapy--potential immunomodulatory effects of antioxidants. *J Infect Dis*; 188, 232-238.

Azziz, R. 2004. PCOS: a diagnostic challenge. *Reprod Biomed Online* 8:6, 644-648



Baraňao RI, Dain L, Palak de Fried E, Rumi LS. 1995. Human granulose cells express HLA-DR antigen and are capable of synthesizing interleukin-1. *Horm Metab Res* 27, 495-498.

Barber TM, Wass JA, McCarthy MI, Franks S. 2007. Metabolic characteristics of women with polycystic ovaries and oligo-amenorrhoea but normal androgen levels: implications for the management of polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 66, 513–517.

Barkhausen T, Westphal BM, Pütz C, Krettek C, van Griensven M. 2006. Dehydroepiandrosterone administration modulates endothelial and neutrophil adhesion molecule expression in vitro. *Crit Care* 10:4, R109.

Barnett KR, Schilling C, Greenfeld CR, Tomic D, Flaws JA. 2006. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Hum Reprod Update* 12: 537-555.

Barrett TA, Gajewski TF, Danielpour D, Chang EB, Beagley KW, Bluestone JA. 1992. Differential function of intestinal intraepithelial lymphocyte subsets. *J Immunol* 149:1124–1130.

Barthel SV, Johansson MW, Annis DS, Mosher DF. 2006. Cleavage of human 7-domain VCAM-1 (CD106) by thrombin. *Thromb Haemost* 95: 873–80.

Benifla JL, Bringuier AF, Sifer C, Porcher R, Madelenat P, Feldmann G. 2001. Vascular endothelial growth factor, platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in the follicular fluid of patients undergoing IVF. *Hum Reprod* 16:7, 1376-81.

Benson S, Janssen OE, Hahn S, Tan S, Dietz T, Mann K, Pleger K, Schedlowski M, Arck PC, Elsenbruch S. 2007. Obesity, depression, and chronic low-grade inflammation in women with polycystic ovary syndrome. *Brain, Beh, and Immunity*, 22:2, 177-184

Bergh C, Carlsson B, Olsson JH, Selleskog U, Hillensjo T. 1993. Regulation of androgen production in culture human theca cells by insulin-like growth factor I and insulin. *Fertil Steril* 59, 323-331

Bjorntorp P. 1996. The regulation of adipose tissue distribution in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20, 291–302.

Blois SM, Tometten M, Kandil J, Hagen E, Klapp BF, Margni RA, Arck PC. Intercellular Adhesion Molecule-1/LFA-1 Cross Talk Is a Proximate Mediator Capable of Disrupting Immune Integration and Tolerance Mechanism at the Feto-Maternal Interface in Murine Pregnancies. *The Jour of Immunol* 174: 1820-29.

Bloomgarden ZT. 2003. Inflammation and insulin resistance. *Diabetes Care*, 1:6, 1922–1926.

Bonello N, Jasper MJ, Norman RJ. 2004. Periovulatory expression of intercellular adhesion molecule-1 in the rat ovary. *Biol Reprod*, 71:4, 1384-1390.

Bonello N, McKie K, Jasper M, Andrew L, Ross N, Braybon E, Brannstrom M, Norman RJ. 1996. Inhibition of nitric oxide: effects on interleukin-1  $\beta$ -enhanced ovulation rate, steroid hormones, and ovarian leukocyte distribution at ovulation in the rat. *Biol Reprod* 54, 436-445.

Bonser J, Walker, Purohit A, Reed MJ, Potter VL, Willis DS, Franks S, Mason HD. 2000. Human granulosa cells are a site of sulphatase activity and are able to utilize dehydroepiandrosterone sulphate as a precursor for oestradiol production. *Journal of Endocrinology* 167, 465-471

Brannstrom M, Mayrhofer G, Robertson SA. 1993. Localization of leukocyte subsets in the rat ovary during the periovulatory period. *Biol Reprod* 48, 277-286

Brannstrom M, Norman RJ. 1993. Involvement of leukocytes and cytokines in the ovulatory process and corpus luteum function. *Hum Reprod* 8, 1762-1775.

Brannstrom M, Pascoe V, Norman RJ, McClure N. 1994. Localization of leukocyte subsets in the follicle wall and in the corpus luteum throughout the human menstrual cycle. *Fertil Steril* 61, 488-495.

Britt KL, Drummond AE, Cox VA, Dyson M, Wreford NG, Jones MEE, Simpson ER, Findlay JK. 2000. An age-related ovarian phenotype in mice with targeted disruption of the Cyp 19 (aromatase) gene. *Endocrinology* 141:2614-2623.

Bronson FH, Clarke SH. 1966. Adrenalectomy and coat color in deer mice. *Science*. 154:754, 1349-50.

Brüüngaard H, Pedersen BK. 2003. Age-related inflammatory cytokines and disease. *Immunol Allergy Clin North Am*, 23:1, 15-39.

Buege, JA, Aust, SD. 1979. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology* 52, 302-310.

Bukovsky A, Presley J. 1979. Ovarian function and the immune system. *Med Hypoth* 5, 415-436

Bukovsky, A, Caudle MR. 2008. Immune Physiology of the Mammalian Ovary - A Review. *American Journal of Reproductive Immunology* 59:1, 12-26.

Bukulmez O, Arici, A. 2000. Leukocytes in ovarian function. *Hum Reprod Update* 6, 1-15.

Burbach BJ, Medeiros RB, Mueller KL, Shimizu Y. 2007. T-cell receptor signaling to integrins. *Immunol Rev* 218: 65-81.

Caia J, Yanga J, Jones JD. 1998. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1366:1-2, 139-49.

Carman CV, Jun CD, Salas A, Springer TA. 2003. Endothelial Cells Proactively Form Microvilli-Like Membrane Projections upon Intercellular Adhesion Molecule 1 Engagement of Leukocyte LFA-1. *J. Immunol* 171:6135-6144

Carmina E, Orio F, Palomba S, Cascella T, Longo RA, Colao AM, Lombardi G, Lobo RA. 2005. Evidence for altered adipocyte function in polycystic ovary syndrome. *European Journal of Endocrinology*, 152:3, 389-394

Casson PR, Andersen RN, Herrod HG, Stentz FB, Straughn AB, Abraham GE, Buster JE. 1993. Oral dehydroepiandrosterone in physiologic doses modulates immune function in postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol*, 169, 1536–1539.

Champlin AK, Dorr DL, Gtes AH. 1973. Determining the stage of the estrous cycle in the Mouse by the appearance of the vagina. *Biol Reprod* 8:4, 491-4.

Chan JR, Hyduk SJ, Cybulsky MI. 2000.  $\alpha 4\beta 1$  integrin/VCAM-1 interaction activates  $\alpha L\beta 2$  integrinmediated adhesion to ICAM-1 in human T cells. *J Immunol* 164:746–53.

Chance B. Special methods: catalase. Ed por Glick, R. Interscience. New York . 408-424, 1954.

Chang RJ, Laufer LR, Meldrum DR, DeFazio J, Lu JK, Vale WW, Rivier JE, Judd HL. 1983. Steroid secretion in polycystic ovarian disease after ovarian suppression by a long-acting gonadotropin-releasing hormone agonist. *J Clin Endocrinol Metab* 56:897–903.

Chattopadhyay R, Ganesh A, Samanta J, Jana SK, Chakravarty BN, Chaudhury K. 2010. Effect of follicular fluid oxidative stress on meiotic spindle formation in infertile women with polycystic ovarian syndrome. *Gynecol Obstet Invest.* 69:3, 197-202.

Chen Q, Sun X, Chen J, Cheng L, Wang J, Wang Y, Sun Z. 2009. Direct rosiglitazone action on steroidogenesis and proinflammatory factor production in human granulosa-lutein cells. *Reprod Biol Endocrinol.* 9;7:147.

Cheng G, Weihua Z, Mäkinen S, Makela S, Saji S, Warner M, Gustafsson J-A, Hovatta O. 2002. A role for the androgen receptor in follicular atresia of estrogen  $\beta$  knockout mouse ovary. *Biol Reprod*, 66, 77-84.

Chhabra S, McCartney CR, Yoo RY, Eagleson CA, Chang RJ, Marshall JC. 2005. Progesterone inhibition of the hypothalamic gonadotropin-releasing hormone pulse generator: evidence for varied effects in hyperandrogenemic adolescent girls. *J Clin Endocrinol Metab*, 90, 2810–2815.

Chuang KP, Tsai WS, Wang YJ, Shieh CC. 2003. Superoxide activates very late antigen-4 on an eosinophil cell line and increases cellular binding to vascular cell adhesion molecule-1. *Eur J Immunol*, 33:3, 645-55.

Clark MR, Marsh JM & LeMaire WJ. 1978. Mechanism of luteinizing hormone regulation of prostaglandin synthesis in rat granulosa cells. *Journal of Biological Chemistry* 253: 7757.

Codner E, Iñíguez G, Villarroel C, Lopez P, Soto N, Sir-Petermann T, Cassorla F, Rey RA. 2007. Hormonal profile in women with polycystic ovarian syndrome with or without type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 92:12, 4742-6.

Cordo-Russo R, Garcia MG, Barrientos G, Orsal AS, Viola M, Moschansky P, Ringel F, Passi A, Alaniz L, Hajos S, Blois SM. 2009. Murine abortion is associated with enhanced hyaluronan expression and abnormal localization at the fetomaternal interface. *Placenta*. 30:1, 88-95

Curry TE Jr, Osteen KG. 2001. Cyclic changes in the matrix metalloproteinase system in the ovary and uterus. *Biol Reprod* 64, 1285-1296.

Cybulsky MI Gimbrone MA. 1991. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 251, 788.

De Zheger F e Ibañez L. 2005. Prenatal growth restraint followed by catch-up of weight: a hyperinsulinemic pathway to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 86:1, S4-5

Denton MD, Geehan CS, Alexander SI, Sayegh MH, Briscoe DM. 1999. Endothelial cells modify the costimulatory capacity of transmigrating leukocytes and promote CD28-mediated CD4+ T cell alloactivation. *J Exp Med* 190: 555–66.

DeNucci CC, Mitchell JS, Shimizu Y. 2009. Integrin Function In T Cell Homing To Lymphoid And Non-Lymphoid Sites: Getting There And Staying There. *Crit Rev Immunol* 29(2): 87–109.

Deshpande, R.R., Chang, M.Y., Chapman, J.C., Michael, S.D., 2000. Alteration of cytokine production in follicular cystic ovaries induced in mice by neonatal estradiol injection. *Am. J. of Reprod. Immunol.*, 44, 80-88.

Diamanti-Kandarakis (b) E, Alexandraki K, Piperi C, Protogerou A, Katsikis I, Paterakis T, Lekakis J, Panidis D. 2006. Inflammatory and endothelial markers in women with polycystic ovary syndrome. *Eur J Clin Invest* 36:10, 691-7.

Diamanti-Kandarakis E, Kandarakis H, Legro RS (a). 2006. The role of genes and environment in the etiology of PCOS. *Endocrine*. 30:1, 19-26.

Díaz-Flores M, Ibañez-Hernández MA, Galvan RE, Durán-Reyes G, Medina-Navarro R, Ortega-Camarillo C, Vilar-Rojas C, Cruz M, Baiza-Gutman LA. 2006. Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and NADPH/NADPC ration in liver and pancreas are dependent on the severity of hyperglycemia in rat. *Life Sciences* 78 2601–2607.

Domingos CK, Deshpande SS, Irani K, Alevriadou BR. 2002. Adhesion of flowing monocytes to hypoxia-reoxygenationexposed endothelial cells: role of Rac1, ROS, and VCAM-1. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: 93-102.

Drummond AE. 2006. Review: The role of steroids in follicular growth. *Reproductive Biology and Endocrinology* 4:16

Du C, Guan Q, Khalil MW, Sriram S. 2001. Stimulation of Th2 Response by High Doses of Dehydroepiandrosterone in KLH-Primed Splenocytes. *Experimental Biology and Medicine*, 226:11, 1051-1060.

Dubey, C., M. Croft, and S. L. Swain. 1995. Costimulatory requirements of naïve CD4 T cells. ICAM-1 or B7-1 can costimulate naïve CD4 T cell activation but both are required for optimum response. *J. Immunol.* 155:45.

Duffy DM, Stouffer RL. 2001. The ovulatory gonadotrophin surge stimulates cyclooxygenase expression and prostaglandin production by the monkey follicle. *Mol Hum Reprod* 7:8, 731-9.

Duggal PS, Van Der Hoek KH, Milner CR, Ryan NK, Armstrong DT, Magoffin DA, Norman RJ. 2000. The in vivo and in vitro effects of exogenous leptin on ovulation in the rat. *Endocrinology*, 141, 1971–1976.

Dunaif A, Graf M, Mandeli J, Laumas V, Dobrjansky A. 1987. Characterization of groups of hyperandrogenic women with acanthosis nigricans, impaired glucose tolerance, and/or hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*, 65, 499–507.

Eagleson CA, Gingrich MB, Pastor CL, Arora TK, Burt CM, Evans WS, Marshall JC. 2000. Polycystic ovarian syndrome: evidence that flutamide restores sensitivity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator to inhibition by estradiol and progesterone. *J Clin Endocrinol Metab*, 8, :4047–4052.

Edwards DA. 1971. Neonatal administration of androstenedione, testosterone or testosterone propionate: effects on ovulation, sexual receptivity and aggressive behavior in female mice. *Physiol Behav* 6,223–228.

Ehrmann, D.A. 2005. Polycystic ovary syndrome. *N. Engl. J. Med.* 352, 1223–1236

Eisner JR, Dumesic DA, Kemnitz JW, Colman RJ, Abbott DH. 2003. Increased adiposity in female rhesus monkeys exposed to androgen excess during early gestation. *Obes Res.* 11:2, 279-86.

Elbers JM, Giltay EJ, Teerlink T, Scheffer PG, Asscheman H, Seidell JC, Gooren LJ. 2003. Effects of sex steroids on components of the insulin resistance syndrome in transsexual subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 58, 562–571.

Enríquez J, Klínger J, Arturo JA, Delgado M, Tobar C, Mosquera M. 2002. Peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis: cytokines in peritoneal fluid and blood. *Adv Perit Dial* 18: 177-83.

Erickson GF, Magoffin DA, Dyer CA & Hofeditz C. 1985 The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. *Endocr Rev* 6, 371- 399.

Escobar-Morreale HF, San Millán JL. 2007. Focus on Polycystic Ovary Syndrome Abdominal adiposity and the polycystic ovary syndrome. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 18:7, 266-272.

Escobar-Morreale, G. Villuendas, J. I. Botella-Carretero, J. Sancho, and J. L. San Millan. 2003. Obesity, and not insulin resistance, is the major determinant of serum

inflammatory cardiovascular risk markers in pre-menopausal women. *Diabetologia* 46:5, 625-633.

Fainboim L, Geffner JG. 2005. Introducción a la Inmunología Humana. Med Panam. Cap 3 y 9.

Fejes I, Koloszar S, Závaczki Z, Daru J, Szöllösi J, Pál A. 2006. Effect of body weight on testosterone/estradiol ratio in oligozoospermic patients. *Arch Androl* 52:2, 97-102.

Ferrara N, Frantz G, LeCouter J, Dillard-Telm L, Pham T, Draksharapu A, Giordano T, Peale F. 2003. Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries. *Am J Pathol* 162:6, 1881-93.

Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. 2006. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1b generation. *Clinical and Experimental Immunology*, 147: 227–235

Festa A, D'Agostino Jr.D, Williams K, Karter AJ, Mayer-Davis EJ, Tray P, Haffner SM. 2001. The relation of body fat mass and distribution to markers of chronic inflammation. *International Journal of Obesity* 25: 10,. 1407–1415.

Fidler IJ, Raz A, Fogler WE, Kirsh R, Bugelski P, Poste G. 1980. Design of liposomes to improve delivery of macrophage-augmenting agents to alveolar macrophages. *Cancer Res* 40:12, 4460-6.

Fornaro F, Cobellis L, Mele D, Tassou A, Badolati B, Sorrentino S, De Lucia D, Colacurci N. 2007. Effects of gonadotropin-releasing hormone agonist/recombinant follicle-stimulating hormone versus gonadotropin-releasing hormone antagonist/recombinant follicle-stimulating hormone on follicular fluid levels of adhesion molecules during in vitro fertilization. *Fertil Steril* 87:1, 39-47

Fortier MA, Krishnaswamy K, Dayod G, Boucher-Kovalik S, P Chapdelaine. 2008. A postgenomic integrated view of prostaglandins in reproduction: implications for other body systems. *Journal of Physiol and Pharmacol* 59:1, 65-89.

Franco R y Cidlowski JA. 2006. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ* 16: 10, 1303-14.

Franks S, Strak J, Hardy K. 2008. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction Update*, 14:4, 367–378.

Franks S. 1995. Polycystic Ovary Syndrome. *N England J Med* 333, 853-861.

Freedman AS, Munro JM, Rice GE, Bevilacqua MP, Morimoto P, McIntyre BW, Rhynhart K, Poher JS, Nadler LM. 1990. Adhesion of human B cells to germinal centers in vitro involves VLA-4 and INCAM-110. *Science* 249, 1030.

Fuentes L, Roszer T, Ricote M. 2010. Inflammatory Mediators and Insulin Resistance in Obesity: Role of Nuclear Receptor Signaling in Macrophages. *Mediators of Inflammation*, publicado online: ID 219583, 10 pág.

Funk PE, Stephan RP, Witte PL. 1995. Vascular cell adhesion molecule-1-positive reticular cells express interleukin-7 and stem cell factor in the bone marrow. *Blood* 86, 2661.

Gallinelli A, Ciaccio I, Giannella L, Salvatori M, Marsella T, Volpe A. 2003. Correlations between concentrations of interleukin-12 and interleukin-13 and lymphocyte subsets in the follicular fluid of women with and without polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 79, 1365–1372.

Gambineri A, Pelusi C, Vicennati V, Pagotto U, Pasquali R. 2002. Obesity and the polycystic ovary syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 26:7, 883-896.

Gaytán F, Morales C, Bellido C, Aguilar E, Sánchez-Criado JE. 1998. Ovarian follicle macrophages: is follicular atresia in the immature rat a macrophage-mediated event? *Biol Reprod* 58:1, 52-9.

Geer EB, Shen W. 2009. Gender differences in insulin resistance, body composition, and energy balance. *Gend Med*. 6:1, 60-75.

Gelety TJ, Chaudhuri G. 1992. Prostaglandins in the ovary and fallopian tube. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 6:4,707-29.

Gilling-Smith C, Story H, Rogers V, Franks S. 1994. Hypersecretion of androstenedione by isolated theca cells from polycystic ovaries. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 79, 1158-1165.

González F, Rote NS, Minium J, Kirwan JP. 2005. Reactive Oxygen Species-Induced Oxidative Stress In The Development Of Insulin Resistance And Hyperandrogenism In Polycystic Ovary Syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Publicado online como doi:10.1210/jc.2005-1696.

Gonzalez F, Rote NS, Minium J, Kirwan JP. 2006. Reactive Oxygen Species-Induced Oxidative Stress in the Development of Insulin Resistance and Hyperandrogenism in Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 91:1, 336-340.

Gonzalez K, Thusu E, Abdel-Rahman E, Prabhala A, Tomani M, Dandona P. 1999. Elevated serum levels of tumor necrosis factor alpha in normal-weight women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism*, 48:4, 437–441.

Gruemmer R, Klein-Hitpaß L, Neulen J. 2005. Regulation of gene expression in endothelial cells: the role of human follicular fluid. *Journal of Molecular Endocrinology* 34, 37–46.

Hadzic T, Li L, Cheng N, Walsh SA, Spitz DR, Knudson, CM. 2005. The Role of Low Molecular Weight Thiols in T Lymphocyte Proliferation and IL-2 Secretion. *J Immunol* 175:12, 7965-7972.

Hahn S, Tan S, Elsenbrunch S, Quadbeck B, Herrmann BL, Mann K, Janssen OE. 2005. Clinical and Biochemical Characterization of Women with Polycystic Ovary Syndrome in North Rhine-Westphalia. *Horm Metab Res* 37:07, 438-444.

Halliwell B, Gutteridge JMC. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*, 219:1-14.

Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. 2002. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends in Immunology* 23:3, 144-150.

Hector J, Schwarzloh B, Goehring J, Strate TG, Hess UF, Deuretzbacher G, Hansen-Algenstaedt N, Beil FU, Algenstaedt P. 2007. TNF-alpha alters visfatin and adiponectin levels in human fat. *Horm Metab Res* 39:250–255.

Hellberg P, Larson L, Olofsson J, Brännström M, Hedin L. 1996. Regulation of the inducible form of prostaglandin endoperoxide synthase in the perfused rat ovary. *Mol Hum Reprod* 2:2, 111-6.

Hemler ME, Lands WE. 1980. Evidence for a peroxide-initiated free radical mechanism of prostaglandin biosynthesis. *J Biol Chem* 255:13, 6253-61.

Henmi H, Endo T, Nagasawa K, Hayashi T, Chida M, Akutagawa N., Iwasaki M, Kitajima Y, Kiya T, Nishikawa A, Manase K, Kudo R. 2001. Lysil oxidase and MMP-2 expression in dehydroepiandrosterone – induced polycystic ovary in rats. *Biol. Reprod* 64, 157-162.

Henninger DD, Panes J, Eppihimer M, Russell J, Gerritsen M, Anderson DC, Granger DN. 1997. Cytokine induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. *J Immunol* 158, 1825–32.

Hillier SG, Whitelaw PF, Smyth CD. 1994. Follicular oestrogen synthesis: the ‘two-cell, two-gonadotrophin’ model revisited. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 100, 51-54.

Hirshfield AN. 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 124,43–101.

Honnma H; Endo T, Henmi H, Nagasawa K, Baba T, Yamzaki K, Kitajima Y, Hayashi T, Manase K, Saito T. 2006. Altered expression of Fas/Fas ligand/caspase 8 and membrane type 1-matrix metalloproteinase in atretic follicles within dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovaries in rats. *Apoptosis* 11:1525–1533.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, 259:5091, 87–91.



Hovatta O, Wright C, Krausz T, Hardy K, Winston RM. 1999. Human primordial, primary and secondary ovarian follicles in long-term culture: effect of partial isolation. *Hum Reprod*, 14, 2519–2524.

Hu Y, Wang P, Yeh S, Wang R, Xie C, Xu Q, Zhou X, Chao H, Tsai M, Chang C. 2004. Subfertility and defective folliculogenesis in female mice lacking androgen receptor. *Proc Acad Science* 101, 11209-11214.

Huang W, Glass CK. 2010. Nuclear receptors and inflammation control: molecular mechanisms and pathophysiological relevance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30:8, 1542-1549.

Hughesdon PE. 1982. Morphology and morphogenesis of the Stein-Leventhal ovary and of so-called 'hyperthecosis'. *Obstet Gynecol Surv*, 37, 59–77.

Husein MQ, Kridli RT. 2003. Effect of progesterone prior to GnRH- prostaglandin F2 alpha treatment on induction of oestrus and pregnancy in anoestrous Awassi ewes. *Reprod Dom Anim*, 38:228-232.

Hyun YM, Chung HL, McGrath JL, Waugh RE, Kim M. 2009. Activated integrin VLA-4 localizes to the lamellipodia and mediates T cell migration on VCAM-1. *J Immunol*. 183:1, 359-69.

Ibanez L, DiMartino-Nardi J, Potau N, Saenger P. 2000. Premature adrenarche—normal variant or forerunner of adult disease?. *Endocrine Reviews* 21, 671–696

Ibanez L, Valls C, Ferrer A, Ong K, Dunger D, de Zegher F. 2002. Additive effects of insulin-sensitizing and anti-androgen treatment in young, nonobese women with hyperinsulinism, hyperandrogenism, dyslipidemia, and anovulation, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87, 2870–2874.

Ibanez L, Valls C, Ong K, Dunger DB, de Zegher F. 2006. Metformin Therapy during Puberty Delays Menarche, Prolongs Pubertal Growth, and Augments Adult Height: A Randomized Study in Low-Birth-Weight Girls with Early-Normal Onset of Puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 2068-2073.

Ignarro LJ. 1990. Haem-dependent activation of guanylate cyclase and cyclic GMP formation by endogenous nitric oxide: a unique transduction mechanism for transcellular signaling. *Pharmacol Toxicol*. 67:1, 1-7.

Izumo K, Horiuchi M, Komatsu M, Aoyama K, Bandow K, Matsuguchi T, Takeuchi M, Takeuchi T. 2009. Dehydroepiandrosterone increased oxidative stress in a human cell line during differentiation. *Free Radical Research* 43:10, 922-931.

Jabbour JN, Sales KJ, Catalano RD, Norman JE. 2009. Inflammatory pathways in female reproductive health and disease. *Reproduction* publicado online: REP-09-0247.

Jansen E, Laven JS, Dommerholt HB, Polman J, van Rijt C, van den Hurk C, Westland J, Mosselman S, Fauser BC. 2004. Abnormal gene expression profiles in human ovaries from polycystic ovary syndrome patients. *Mol Endocrinol.*, 18:12, 3050-3063.

Jasper M and Norman RJ. 1995. Immunoactive interleukin-1  $\beta$  and tumour necrosis factor-alpha in thecal, stromal and granulosa cell cultures from normal and polycystic ovaries. *Hum Reprod* 10,1352–1354.

Jasper MJ, Robertson SA, Van der Hoek KH, Bonello N, Brannstrom M, Norman RJ. 2000. Characterization of Ovarian Function in Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Deficient Mice 10.1095/biolreprod62.3.704. *Biol Reprod* 62:3, 704-713.

Kanwar JR, Kanwar RK, Krissansen GW. 2004. Simultaneous neuroprotection and blockade of inflammation reverses autoimmune encephalomyelitis. *Brain.* 127, 1313-1331.

Karimi K, Inman MD, Bienenstock J, Forsythe P. 2009. *Lactobacillus reuteri*-induced regulatory T cells protect against an allergic airway response in mice. *Am J Respir Crit Care Med*, 179:3,186-193.

Katayama T, Kusanagi Y, Kiyomura M, Ochi H, Ito M. 2003. Leukocyte behaviour and permeability in the rat mesenteric microcirculation following induction of ovulation. *Hum Reprod* 18:6, 1179-84.

Kelly, CCJ, Lyall, H, Petrie, JR, Gould, GW, Connell, MC, Sattar, N. 2001. Low grade chronic inflammation in women with polycystic ovarian syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86:6, 2453–2455.

Kim HH, Shaipanich M, Hasselblatt K, Yeh J. 2003. Induction of apoptosis and ovarian cyst formation in the mouse ovary by dehydroepiandrosterone (DHEA). *J Med* 34:1-6, 101-12.

Kirschner MA, Samojlik E, Drejka M, Szmál E, Schneider G, Ertel N. 1990. Androgen-estrogen metabolism in women with upper body versus lower body obesity. *J Clin Endocrinol Metab*, 70, 473–479.

Kitani A, Nakashima N, Izumihara T, Inagaki M, Baoui X, Yu S, Matsuda T, Matsuyama T. 1998. Soluble VCAM-1 induces chemotaxis of Jurkat and synovial fluid T cells bearing high affinity very late antigen-4. *J Immunol* 1998; 161: 4931–8.

Klecha AJ, Genaro AM, Gorelik G, Barreiro Arcos ML, Silberman DM, Schuman M, Garcia SI, Pirola C, Cremaschi GA. 2006. Integrative study of hypothalamus-pituitary-thyroid-immune system interaction: thyroid hormone-mediated modulation of lymphocyte activity through the protein kinase C signaling pathway. *J Endocrinol*, 189:1, 45-55.

Knudsen JF, Mahesh VB. 1975. Initiation of precocious sexual maturation in the immature rat treated with dehydroepiandrosterone. *Endocrinology* 97,458–468.

Koninckx PR, Kennedy SH, Barlow DH. 1998. Endometriotic disease: the role of peritoneal fluid. *Hum Reprod Update* 4:5, 741-751.

Kumar 2000 desentrañar

Kumar TR, Wiseman AL, Kala G, Kala SV, Matzuk MM and Lieberman MW. 2000. Reproductive defects in  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Endocrinology* 141,4270–4277.

Kuroda E, Yamashita U, 2003. Mechanisms of enhanced macrophage-mediated prostaglandin E2 production and its suppressive role in Th1 activation in Th2-dominant BALB/C mice. *J Immunol*, 15:757-764.

La Marca A, Morgante G, Palumbo M, Cianci A, Petraglia F, De Leo V. 2002. Insulin-lowering treatment reduces aromatase activity in response to follicle-stimulating hormone in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility* 78, 1234-1239.

Labrie F, Luu-The V, Bélanger A, Lin SX, Simard J, Pelletier G, Labrie C.J. 2005. Is dehydroepiandrosterone a hormone?. *Endocrinol.* 187:2, 169-196.

Lai KN, Leung JCK. 2010. Peritoneal Adipocytes and Their Role in Inflammation during Peritoneal Dialysis. *Mediators Inflamm.* Publicado online doi: 10.1155/2010/495416.

Lakier SL, 2003. Over training, excessive exercise, and altered immunity: is this a Th1 versus Th2 lymphocyte response?. *Sports Med*, 33:347-364.

Lawler DF, Hopkins J, Watson ED. 1999. Immune cell populations in the equine corpus luteum throughout the oestrus cycle and early pregnancy: an immunohistochemical and flow cytometric study. *J of Reprod and Fertil*, 117, 281-290.

Lawson C, Wolf S. 2009. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep* 61: 22-32.

Lédée-Bataille N, Laprée-Delage G, Taupin JL, Dubanchet S, Taieb J, Moreau JF, Chaouat G. 2001. Follicular fluid concentration of leukaemia inhibitory factor is decreased among women with polycystic ovarian syndrome during assisted reproduction cycles. *Hum Reprod* 16(10):2073-8.

Lee GY, Croop JM, Anderson E. 1998. Multidrug Resistance Gene Expression Correlates with Progesterone Production in Dehydroepiandrosterone-Induced Polycystic and Equine Chorionic Gonadotropin-Stimulated Ovaries of Prepubertal Rats. *Biology Of Reproduction* 58, 330-337.

Lee K, Esselman WJ. 2002. Inhibition of PTPs by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> regulates the activation of distinct MAPK pathways. *Free Radical Biology and Medicine* 33: 8, 1121-1132.

Lee M, Anderson E, Lee GY. 1991. Changes in ovarian morphology and serum hormones in the rat after treatment with dehydroepiandrosterone. *Anat Rec.* 231:2, 185-92.

Lee, GY, Croop, JM, Anderson, E. 1998. Multidrug resistance gene expression correlates with progesterone production in dehydroepiandrosterone-induced polycystic and equine chorionic gonadotropin-stimulated ovaries of prepubertal rats. *Biol Reprod* 58, 330-337.

Leplina OY, Tikhonova MA, Sakchno LV, Tyrinova TV, Ostanin AA, Chernykh ER. 2008. Effect of Dehydroepiandrosterone Sulfate on Maturation and Functional Properties of Interferon- $\alpha$ -Induced Dendritic Cells. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 148:1, 68-71

Leung AK, Robson WL. 2008. Premature adrenarche. *J Pediatr Health Care*, 22:4, 230-233,

Lévesque JP, Leavesley DI, Niutta S, Vadas M, Simmons PJ. 1995. Cytokines increase human hemopoietic cell adhesiveness by activation of very late antigen (VLA)-4 and VLA-5 integrins. *J Exp Med*, 181:5, 1805-1815.

Li, CQ, Wogan GN. 2005. Nitric oxide modulation of apoptosis. *Cancer Lett*, 226, 1-15.

Liew FY. 1995. Regulation of lymphocyte functions by nitric oxide. *Curr Opin Immunol*; 7(3):396-399.

Lord, JM, Flight IHK, Norman RJ. 2003. Metformin in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 327(7421): 951.

Lu FX, Abel K, Ma Z, Rourke T, Lu D, Torten J, Mc Chesney M, Miller CJ. 2002. The strength of B cell immunity in female rhesus macaques is controlled by CD8+ T cells under the influence of ovarian steroid hormones. *Clin. Experim. Immunol.*, 128, 10-20.

Luchetti CG, Solano ME, Sander V, Barreiro Arcos ML, Gonzalez C, Di Girolamo G, Chiochio S, Cremaschi G, Motta AB. 2004. Effects of dehydroepiandrosterone on ovarian cystogenesis and immune function. *Journal of reproductive immunology* 64:1, 59-74.

Maciel GA, Baracat EC, Benda JA, Markham SM, Hensinger K, Chang RJ, Erickson GF. 2004. Stockpiling of transitional and classic primary follicles in ovaries of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 89, 5321–5327.

Macphail SE, Gibney CA, Brooks BM, Booth CG, Flanagan BF, Coleman JW. 2003. Nitric oxide regulation of human peripheral blood mononuclear cells: critical time dependence and selectivity for cytokine versus chemokine expression. *J Immunol*, 171, 4809-4815.

Magnotti M y Futterweit W. 2007. Obesity and the Polycystic Ovary Syndrome. *Med Clin N Am* 91, 1151–1168

Mahesh VB and Greenblatt, RB. 1962. Isolation of dehydroepiandrosterone and 17 $\alpha$ -hydroxy-pregnenolone from polycystic ovaries of Stein-Leventhal syndrome. *J. Clin. Endocrinol. & Metab* 22, 441-448.

Maia DC, Sassa MF, Placeres MC, Carlos IZ. 2006. Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. *Mycopathology*; 161:11-19.

Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN & Yancopoulos GD. 1997. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, 277, 55-60.

Mannerås L, Cajander S, Holmäng A, Seleskovic Z, Lystig T, Lönn M, Stener-Victorin E. 2007. A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome. *Endocrinology*. 148:8, 3781-91.

Margolin Y, Aten RF & Berhman HR. 1990. Antigonadotropin and antisteroidogenic actions of peroxide in rat granulosa cells. *Endocrinology* 127, 245–250.

Martinez-Bermejo E, Luque-Ramirez M, Escobar- Morreale HF. 2007. Obesity and the polycystic ovary syndrome. *Minerva Endocrinol*, 32, 129–140.

Maser RL, Vassmer D, Magenheimer BS, Calvet JP. 2002. Oxidant stress and reduced antioxidant enzyme protection in polycystic kidney disease. *J. of Am. Soc. of Nephrol.*, 13, 991-999

Matthews DR, Hosker JR, Rudenski AS, Naylor SA, Treacher DF, Turner RC. 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and B-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28: 412-9.

McArdle CA & Holtorf AP. 1989. Oxytocin and progesterone release from bovine corpus luteal cells in culture: Effects of insulin-like growth factor I, insulin, and prostaglandins. *Endocrinology* 124: 1278.

McGarry HF, Plant LD and Taylor MJ. 2005. Diethylcarbamazine activity against *Brugia malayi* microfilariae is dependent on inducible nitric-oxide synthase and the cyclooxygenase pathway. *Filaria J* 4,4.

McGee EA, Hsueh AJ. 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 21, 200–214.

Medan MS, Watanabe G, Sasaki K, Nagura Y, Sakaime H, Fujita M, Scharaway S, Taya K, 2003. Effect of passive immunization of goats against inhibin on follicular development, hormone profile and ovulation rate. *Reproduction*, 125:751–757.

Meikle AW, Dorchuck RW, Araneo BA, Stringham JD, Evans TG, Spruance SL, Daynes RA. 1992. The presence of a dehydroepiandrosterone specific receptor binding complex in murine T cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 42:293–304.

Minegishi K, Tanaka M, Nishimura O, Tanigaki S, Miyakoshi K, Ishimoto H, Yoshimura Y. 2002. Reactive oxygen species mediate leukocyte-endothelium interactions in prostaglandin F<sub>2</sub>α-induced luteolysis in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:6, 1308-1315

Minge, CE, Ryan, NK, Van Der Hoek, KH, Robker, RL, Norman, RJ. 2009 Troglitazone Regulates Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Inducible Nitric Oxide Synthase in Murine Ovarian Macrophages. *Biology of Reproduction* 74:1, 153-160.

Möhlig M, Spranger J, Osterhoff M, Ristow M, Pfeiffer AF, Schill T, Schlösser HW, Brabant G, Schöfl C. 2004. The polycystic ovary syndrome per se is not associated with increased chronic inflammation. *Eur J Endocrinol* 150:4, 525-32.

Moran LJ, Noakes M, Clifton PM, Wittert GA, Williams G, Norman RJ. 2006. Short-term meal replacements followed by dietary macronutrient restriction enhance weight loss in polycystic ovary syndrome. *Am J Clin Nutr* 84:1, 77-87.

Motta AB, Estevez A, Franchi A, Perez-Martinez S, Farina M, Ribeiro ML, Lasserre A, Gimeno MF. 2001. Regulation of lipid peroxidation by nitric oxide and PGF<sub>2</sub>α during luteal regression in rats 10.1530/rep.0.1210631. *Reproduction* 121:4, 631-637.

Motta AB, Gimeno MA. 1999. Nitric oxide system and prostaglandin production in the mechanism of corpus luteum regression. *Reproductive Technologies* 10:1, 22-28

Motta AB. 2010 Report of the international symposium: polycystic ovary syndrome: first Latin-American consensus. *Int J Clin Pract.* 64:5, 544-57.

Mukherjee S, Ahmed A, Nandi D. 2005. CTLA4-CD80/CD86 interactions on primary mouse CD4<sup>+</sup> T cells integrate signal-strength information to modulate activation with Concanavalin A. *Journal of Leukocyte Biology*, 78:1, 144-157

Muller WM. 2009. Mechanisms of Transendothelial Migration of Leukocytes. *Circ. Res.*, 105, 223-230

Muniyappa R, Lee S, Chen H, Quaoan MJ. 2008. Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294:1, E15-26.

Nakao S, Kuwano T, Ishibashi T, Kuwano M, Ono M. 2003. Synergistic effect of TNF-α in soluble VCAM-1-induced angiogenesis through α4 integrins. *J Immunol* 170:11, 5704-11.

Nathan CF. 1987. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 79, 319-326.

Navarra P, Andreani CL, Lazzarin N, Pierro E, Mirtella A, Lanzone A, Mancuso S. 1996. Increased production and release of prostaglandin-E<sub>2</sub> by human granulosa cells from polycystic ovaries. *Prostaglandins* 52:3, 187-97.

Nefiawy1 NE, Hakim KA, Kanayama N. The selective prostaglandin EP4 agonist, APS-999 Na, induces follicular growth and maturation in the rat ovary. *European Journal of Endocrinology* 152, 315–323

Nelson JF, Felicio LS, Randall PK, Sims C, Finch CE. 1982. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. *Biol Reprod* 27, 327-339.

Odegaard JI, Chawla A. 2008. Mechanisms of macrophage activation in obesity-induced insulin resistance. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 4:11, 619-26.

Oksjoki S, Soderstrom M, Vuorio E, Anttila L. 2001. Differential expression patterns of cathepsins B, H, K, L and S in the mouse ovary. *Mol Hum Reprod* 7, 27-34.

Omu AE, Al-Azemi MK, Makhseed M, Al-Oattan F, Ismail AA, Al-Tahir S, Al-Busiri N. 2003. Differential expression of T-helper cytokines in the peritoneal fluid of women with normal ovarian cycle compared with women with chronic anovulation. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 82(7):603-9.

Onalan G, Selam B, Baran Y, Cincik M, Onalan R, Gündüz U, Ural AU, Pabuccu R. 2005. Serum and follicular fluid levels of soluble Fas, soluble Fas ligand and apoptosis of luteinized granulosa cells in PCOS patients undergoing IVF. *Hum Reprod* 20(9):2391-5.

Orio, FJr, Palomba S, Cascella T, Di Biase S, Manguso F, Tauchmanovà L, Nardo LG, Labella D, Savastano S, Russo T, Zullo F, Colao A, Lombardi, G. 2005. The increase of leukocytes as a new putative marker of low-grade chronic inflammation and early cardiovascular risk in polycystic ovary syndrome," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90:1, 2–5.

Ortega-Camarillo C, González-González A, Vergara-Onofre M, González-Padilla E, Avalos-Rodríguez A, Gutiérrez-Rodríguez ME, Arriaga-Pizano L, Cruz M, Baiza-Gutman LA, Díaz-Flores M. 2009. Changes in the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in granulosa cells during follicular atresia in ewes. *Reproduction* 137:6, 979-86.

Parma P, Radi O, Vidal V, Chaboissier MC, Dellambra E, Valentini S, Guerra L, Schedl A, Camerino G. 2006. R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet.* 38:11, 1304–1309.

Pasquali R, Casimirri F, Platè L, Capelli M. 1990. Characterization of obese women with reduced sex hormone-binding globulin concentrations. *Horm Metab Res.*, 22:5, 303-306.

Pasquali R. 2006. Obesity and androgens: facts and perspectives. *Fertil Steril*, 85:5, 1319-1340.

Pastor CL, Griffin-Korf ML, Aloï JA, Evans WS, Marshall JC. 1998. Polycystic ovary syndrome: evidence for reduced sensitivity of the gonadotropin- releasing hormone pulse generator to inhibition by estradiol and progesterone. *J Clin Endocrinol Metab*, 83, 582–590.

Pesce M, Gioia Klinger F, De Felici M. 2002. Derivation in culture of primordial germ cells from cells of the mouse epiblast: phenotypic induction and growth control by Bmp4 signalling. *Mech Dev.*, 112:1-2, 15–24.

Petrovska M, Dimitrov DG and Michael SD. 1996. Quantitative changes in macrophage distribution in normal mouse ovary over the course of the estrous cycle examined with an image analysis system. *Am J Reprod Immunol* 36, 175-183.

Petrovska M, Sedlak R, Nouza K, Presl J and Kinsky R. 1992. Development and distribution of the white blood cells within various structures of the human menstrual corpus luteum examined using an image analysis system. *Am J Reprod Immunol* 28, 77-80.

Pigny P, Cortet-Rudelli C, Decanter C, Deroubaix D, Soudan B, Duhamel A, Dewailly D. 2000. Serum levels of inhibins are differentially altered in patients with polycystic ovary syndrome: effects of being overweight and relevance to hyperandrogenism. *Fertil Steril* 73:5, 972-977

Pigny P, Desailoud R, Cortet-Rudelli C, Duhamel A, Deroubaix-Allard D, Racadot A, Dewailly D. 1997. Serum alpha-inhibin levels in PCOS: relationship to the serum androstenedione level. *J Clin Endocrinol Metab* 82:6, 1939-1943.

Pillinger MH, Dinsell V, Apsel B, Tolani NM, Marjanovic N, Chan ESL, Gomez P, Clancy R, Chang LF, Abramson SB. 2004. Regulation of metalloproteinases and NF- $\kappa$ B activation in rabbit synovial fibroblasts via E prostaglandins and Erk: contrasting effects of nabumetone and 6MNA. *Br J Pharmacol.* 142:973Y982.

Pillinger MH, Philips MR, Feoktistov A, Weissmann G. 1995. Crosstalk in signal transduction via EP receptors: prostaglandin E1 inhibits chemoattractant-induced mitogen-activated protein kinase activity in human neutrophils. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.* 23, 311-316.

Pincus-Knackstedt MK, Joachim RA, Blois SM, Douglas AJ, Orsal AS, Klapp BF, Wahn U, Hamelmann E, Arck PC. 2006. Prenatal stress enhances susceptibility of murine adult offspring toward airway inflammation. *J Immunol.* 15; 177:12, 8484-8492.

Powell JM, Sonnenfeld G. 2006. The effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on in vitro spleen cell proliferation and cytokine production. *J Int Cytokine Res,* 26, 34-9.

Priddy AR, Killick SR. 1993. Eicosanoids and ovulation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 49:5, 827-31.

Puder JJ, S. Varga, M. Kraenzlin, C. De Geyter, U. Keller, and B. Muller. 2005. Central fat excess in polycystic ovary syndrome: relation to low-grade inflammation and insulin resistance. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 90, no. 11, pp. 6014–6021.

Rapoport R, Sklan D, Hanukoglu I. 1995. Electron leakage from the adrenal cortex mitochondrial P450<sub>scc</sub> and P450<sub>c11</sub> systems: NADPH and steroid dependence. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 317, 412–416.

Richards AJ, Enders GC, Resnick JL. 1999. Activin and TGF $\beta$  limit murine primordial germ cell proliferation. *Dev Biol* 207:2, 470–475.

Richards AJ, Pangas SA. 2010. The ovary: basic biology and clinical implications. *J Clin Invest.*, 120:4, 963–972.



Rishi L, Dhiman R, Raje M, Majumdar S. 2007. *Biochim Biophys Acta*; 1770(8):1230-9.

Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Conference Workshop Group 2004 Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 81:19-25

Roy S, Mahesh VB, Greenblatt, RB. 1962. Effect of dehydroepiandrosterone and Androstenedione on the reproductive organs of female rats; production of cystic changes in the ovary. *Nature*, 196, 2-6.

Ruiz-Ramos R, Cebriana ME, Garrido E. 2009. E Benzoquinone activates the ERK/MAPK signaling pathway via ROS production in HL-60 cells. *Toxicology Issue 3*, 279-287.

Sancho D, Yanez-Mo M, Tejedor R, Sanchez-Madrid F. 1999. Activation of peripheral blood T cells by interaction and migration through endothelium: role of lymphocyte function antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-15. *Blood* 93: 886-96.

Sander V, Luchetti CG, Elia E, Solano ME, Di Girolamo G, Gonzalez C, Motta AB. 2006. Role of the N, N'-dimethylbiguanide metformin in the treatment of female prepuberal BALB/c mice hyperandrogenized with dehydroepiandrosterone. *Reproduction* 131:3, 591-602.

Sander VA, Piehl L, Facorro GB, Rubín de Celis E, Motta AB. 2008. Regulation of functional and regressing stages of corpus luteum development in mice. Role of reactive oxygen species. *Reprod Fertil Dev.*, 20:7, 760-769.

Sathyalapan T y Atkin SL. 2010. Mediators of Inflammation in Polycystic Ovary Syndrome in Relation to Adiposity. *Mediators of Inflammation*. Publicado on-line ID 758656, 5 páginas.

Schaeffler A, Gross P, Buettner R, Bollheimer C, Buechler C, Neumeier M, Kopp A, Schoelmerich J, Falk W. 2009. Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor-4/nuclear factor-kappaB pathway in adipocytes links nutritional signalling with innate immunity. *Immunology*. 126: 2, 233-45.

Schwartz AG, Pashko LL. 2004. Dehydroepiandrosterone, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and longevity. *Ageing Res Rev.* 3:2, 171-187

Shayya R y Chang RJ. 2010. Reproductive endocrinology of adolescent polycystic ovary syndrome. *BJOG* 117:150-155.

Spicer LJ. 2004. Proteolytic Degradation of Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins by Ovarian Follicles: A Control Mechanism for Selection of Dominant Follicles 10.1095/biolreprod.103.021006. *Biol Reprod*, 70:5, 1223-1230.

Sprugel KH, McPherson JM, Clowes AW, Ross R. 1987. Effects of growth factors in vivo. I. Cell ingrowth into porous subcutaneous chambers. *Am J Pathol* 129, 601-613.

Stubbs SA, Hardy K, Da Silva-Buttkus P, Stark J, Webber LJ, Flanagan AM, Themmen AP, Visser JA, Groome NP, Franks S. 2005. Anti-mullerian hormone protein expression is reduced during the initial stages of follicle development in human polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab*, 90, 5536–5543.

Stubbs SA, Stark J, Dilworth SM, Franks S, Hardy K. 2007. Abnormal preantral folliculogenesis in polycystic ovaries is associated with increased granulosa cell division. *J Clin Endocrinol Metab*, 92, 4418–4426.

Sugino N, Karube-Harada A, Kashida S, Takiguchi S, Kato H. 2001. Reactive oxygen species stimulate prostaglandin F<sub>2</sub>{alpha} production in human endometrial stromal cells in vitro. *Hum. Reprod.* 16, 1797-1801.

Sugino N, Karube-Harada A, Sakata A, Takiguchi S, Kato H. 2002. Nuclear Factor- $\kappa$ B Is Required for Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Induced Manganese Superoxide Dismutase Expression in Human Endometrial Stromal Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 3845-3850.

Sugino N, Karube-Harada A, Taketani T, Sakata A, Nakamura Y. 2004. Withdrawal of Ovarian Steroids Stimulates Prostaglandin F<sub>2a</sub> Production Through Nuclear Factor-B Activation via Oxygen Radicals in Human Endometrial Stromal Cells: Potential Relevance to Menstruation. *J. Reprod. Dev.* 50, 215-225.

Sugino N, Shimamura K, Takiguchi S, Tamura H, Ono M, Nakata M, Nakamura Y, Ogino K, Uda T, Kato H. 1996. Changes in activity of superoxide dismutase in the human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Hum. Reprod.* 11:5, 1073-1078.

Suikkari AM, McLachlan V, Montalto J, Calderon I, Healy DL, McLachlan RI. 1995. Ultrasonographic appearance of polycystic ovaries is associated with exaggerated ovarian androgen and oestradiol responses to gonadotrophin-releasing hormone agonist in women undergoing assisted reproduction treatment. *Hum Reprod* 10, 513–519.

Sunderkotter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R and Sorg C. 1994. Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol* 55,410±422.

Tan S, Hahn S, Benson S, Diets T, Lahner H, Moeller LC, Schmidt M, Elsenbrunch S, Kimming R, Mann K, Janssen OE. 2007. Metformin improves polycystic ovary syndrome symptoms irrespective of pre-treatment insulin resistance. *Eur J Endocrinol* 157:5, 669-676.

Tanaka N, Espey LL, Okamura H. 1989. Increase in ovarian blood volume during ovulation in the gonadotropin-primed immature rat. *Biol Reprod* 40, 762-768.

Taylor PD, Hillier SG, Fraser HM. 2004. Effects of GnRH antagonist treatment on follicular development and angiogenesis in the primate ovary. *J Endocrinol*, 183, 1-17.

Tietze, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues (1969). *Anal Biochem* 27, 502-522.

Tomizuka K, Horikoshi K, Kitada R, Sugawara Y, Iba Y, Kojima A, Yoshimote A, Yamawaki K, Amagai M, Inoue A, Oshima T, Kakitani M. 2008. R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating Wnt-4 signaling. *Hum Mol Genet.* 17:9,1278–1291.

Tripathi P y Hildeman D. 2004. Sensitization of T cells to apoptosis--a role for ROS? *Apoptosis* 9:5, 515-23.

Turton MT, Luderer U. 2006. Opposing effects of glutathione depletion and follicle-stimulating hormone on reactive oxygen species and apoptosis in cultured preovulatory rat follicles. *Endocrinology.* 2006 Mar;147(3):1224-36.

Van der Veen RC, Dietlin TA, Dixon Gray J, Gilmore W. 2000. Macrophage-derived nitric oxide inhibits the proliferation of activated T helper cells and is induced during antigenic stimulation of resting T cells. *Cell Immunol*; 199:43-9.

van Hooff MH, Voorhorst FJ, Kaptein MB, Hirasings RA, Koppenaar C, Schoemaker J. 2000. Insulin, androgen, and gonadotropin concentrations, body mass index, and waist to hip ratio in the first years after menarche in girls with regular menstrual cycles, irregular menstrual cycles, or oligomenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab.* 85:4, 1394-400

van Wetering S, van Buul JD, Quik S, Mul FP, Anthony EC, ten Klooster JP, Collard JG, Hordijk PL. 2002. Reactive oxygen species mediate Rac-induced loss of cell-cell adhesion in primary human endothelial cells. *J Cell Sci* 115, 1837–46.

van Wetering S, van den Berk N, van Buul JD, Mul FP, Lommerse I, Mous R, ten Klooster JP, Zwaginga JJ, Hordijk PL. 2003. VCAM-1-mediated Rac signaling controls endothelial cell-cell contacts and leukocyte transmigration. *Am J Physiol Cell Physiol* 285, 343–52.

VanderHoek KH, Maddocks S, Woodhouse CM, van Rooijen N, Robertson SA, Norman RJ. 2000. Intrabursal injection of clodronate liposomes causes macrophage depletion and inhibits ovulation in the mouse ovary. *Biol Reprod*, 62, 1059-1066.

Visser JA, Durlinger AL, Peters IJ, van den Heuvel ER, Rose UM, Kramer P, de Jong FH, Themmen AP. 2007. Increased oocyte degeneration and follicular atresia during the estrous cycle in anti-Müllerian hormone null mice. *Endocrinology* 148:5, 2301-8.

Vrbikova J, Hainer V. 2009. Obesity and polycystic ovary syndrome. *Obes Facts*, 2:1, 26-35

Wachs DS, Coffler MS, Malcom PJ, Shimasaki S, Chang RJ. 2008. Increased androgen response to follicle-stimulating hormone administration in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 93:5, 1827-33.

Wang B, Trayhurn P. 2006. Acute and prolonged effects of TNF-alpha on the expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture. *Pflugers Arch.* 452:418–427.

Ward RC, Costoff A, Mahesh, VB. 1978. The Induction of Polycystic Ovaries in Mature Cycling Rats by the Administration of Dehydroepiandrosterone (DHA). *Biol Reprod* 18:4, 614-623.

Webber LJ, Stubbs SA, Stark J, Margara RA, Trew GH, Lavery SA, Hardy K, Franks S. 2007. Prolonged survival in culture of preantral follicles from polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1975–1978.

West C, Foster DL, Evans NP, Robinson J, Padmanabhan V, 2001. Intra-follicular activin availability is altered in prenatally-androgenized lambs. *Mol. Cell. Endocrinol*, 185:51-59.

West MA, Wallin RP, Matthews SP, Svensson HG, Zaru R, Ljunggren HG, Prescott AR, Watts C. 2004. Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science* 305:5687, 1153-7.

Wittchen ES. 2009. Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration. *Front Biosci* 14, 2522–2545.

Wojtowicz-Praga S. 1997. Reversal of tumor-induced immunosuppression: a new approach to cancer therapy. *J Immunother* 20:3, 165-77.

Wong KH, Negishi H, Adashi EY. 2002. Expression, hormonal regulation, and cyclic variation of chemokines in the rat ovary: key determinants of the intraovarian residence of representatives of the white blood cell series. *Endocrinology* 143, 784-791.

Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE. 2009. Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Dig Dis Sci.* 54:9, 1847-56.

Wright CS, Hovatta O, Margara R, Trew G, Winston RM, Franks S, Hardy K. 1999. Effects of follicle stimulating hormone and serum substitution on the in vitro growth and development of early human ovarian follicles. *Hum Reprod*, 14, 1555–1562.

Wu H, S. Ghosh, X. D. Perrard, Feng L, Garcia GE, Perrard JL, Sweeney JF, Peterson LE, Chan L, Smith CW, Ballantyne CM.. T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity,” *Circulation*, vol. 115, no. 8, pp. 1029–1038, 2007.

Wu MF, Chang HL, Tseng J. 1997. Dehydroepiandrosterone induces the transforming growth factor- $\beta$  production by murine macrophages. *Int J Tissue React* 19:141–148.

Wu R, Fujii S, Ryan NK, Van der Hoek KH, Jasper MJ, Sini I, Robertson SA, Robker RL, Norman RJ. 2007. Ovarian leukocyte distribution and cytokine/chemokine mRNA expression in follicular fluid cells in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 22(2):527-35.

Wu R, Van der Hoek KH, Ryan NK, Norman RJ, Robker RL. 2004. Macrophage contributions to ovarian function. *Hum Reprod Update*, 10:2, 119-33.

Xita N, Georgiou I, Tsatsoulis A. 2002. The genetic basis of polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* 147:6, 717-725.

Yan Z, Lee GY, Anderson E. 1997. Influence of Dehydroepiandrosterone on the Expression of Insulin-Like Growth Factor-1 during Cystogenesis in Polycystic Rat Ovaries and in Cultured Rat Granulosa Cells. *Biology of Reproduction* 57, 1509-1516

Yang H, Bhat GK, Wadley R, Wright KL, Chung BM, Whittaker JA, Dharmarajan AM, Sridaran R. 2003. Gonadotropin-Releasing Hormone-Agonist Inhibits Synthesis of Nitric Oxide and Steroidogenesis by Luteal Cells in the Pregnant Rat. *Biol Reprod* 68, 2222-2231.

Yao G, Shang XJ. 2005. A comparison of modulation of proliferation of thymocyte by testosterone, dehydroisoandrosterone and androstenedione in vitro. *Arch Androl* 4:257-65.

Yilmaz M, Bukan N, Ayvaz G, Karakoç, Törüner F, Çakir N, Arslan M. 2005. The effects of rosiglitazone and metformin on oxidative stress and homocysteine levels in lean patients with polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod.* 20:12, 3333-3340.

Young DG, Skibinski G, Skibinska A, Mason JI, James K. Preliminary studies on the effect of dehydroepiandrosterone (DHEA) on both constitutive and phytohaemagglutinin (PHA)-inducible IL-6 and IL-2 mRNA expression and cytokine production in human spleen mononuclear cell suspensions in vitro. *Clin Exp Immunol* 123:28-35, 2001.

Young JM, McNeilly SM. 2010. THECA – The forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction* Publicado on-line 13 de julio 2010 (REP-10-0094).

Youssef S, Nguyen DT, Soulis T, y col. Effect of diabetes and aminoguanidine therapy on renal advance glycation end products binding. *Kidney Int* 55. 907-916

Yu WH, Kimura M, Walczewska A, Kaant S, McCann SM. 1997. Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proc Natl Acad Sci U SA*, 94, 1023- 1028.

Zackrisson U, Mikuni M, Wallin A, Delbro D, Hedin L, Brännström M. 1996. Cell-specific localization of nitric oxide synthases (NOS) in the rat ovary during follicular development, ovulation and luteal formation. *Hum Reprod*, 11:12, 2667-2673.

Zhu JQ, Zhu L, Liang XW, Xing FQ, Schatten H, Sun OY. 2010. Demethylation of LHR in dehydroepiandrosterone-induced mouse model of polycystic ovary syndrome. *Molecular Human Reproduction*, 16:4, 260-266.

Zimmerman RJ, Chan A, Leadon SA. 1989. Oxidative damage in murine tumor cells treated in vitro by recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer Res* 49, 1644-1648.

Zolti M, Bider D, Seidman DS, Mashiach S and Ben-Rafael Z (1992) Cytokine levels in follicular Fluid of polycystic ovaries in patients treated with dexamethasone. *Fertil Steril* 57,501-504.