

Tesis Doctoral

Implicancias del factor de crecimiento derivado de plaquetas B y del esfingolípido ceramida-1-fosfato en patologías reproductivas femeninas con alteraciones severas en la dinámica folicular

Pascuali, Natalia Marisa

2018

Este documento forma parte de las colecciones digitales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [bibliotecadigital.exactas.uba.ar](http://bibliotecadigital.exactas.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

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

Cita tipo APA:

Pascuali, Natalia Marisa. (2018). Implicancias del factor de crecimiento derivado de plaquetas B y del esfingolípido ceramida-1-fosfato en patologías reproductivas femeninas con alteraciones severas en la dinámica folicular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n6342\\_Pascuali](https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6342_Pascuali)

Cita tipo Chicago:

Pascuali, Natalia Marisa. "Implicancias del factor de crecimiento derivado de plaquetas B y del esfingolípido ceramida-1-fosfato en patologías reproductivas femeninas con alteraciones severas en la dinámica folicular". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2018. [https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n6342\\_Pascuali](https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6342_Pascuali)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

**Implicancias del factor de crecimiento derivado de  
plaquetas B y del esfingolípidio ceramida-1-fosfato  
en patologías reproductivas femeninas con  
alteraciones severas en la dinámica folicular**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad  
de Buenos Aires en el área de Química Biológica

**Lic. Natalia Marisa Pascuali**

Director de tesis: Dra. Fernanda Parborell

Consejero de estudios: Dr. Juan Carlos Calvo

Lugar de trabajo: Laboratorio de Estudios de la Fisiopatología del Ovario,  
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME-CONICET).

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2018.

# Implicancias del factor de crecimiento derivado de plaquetas B y del esfingolípido ceramida-1-fosfato en patologías reproductivas femeninas con alteraciones severas en la dinámica folicular

## RESUMEN

Este trabajo está compuesto por dos capítulos referidos a dos patologías reproductivas femeninas con alteraciones severas en la dinámica folicular, que se producen de forma iatrogénica. En primer lugar, se estudian las implicancias del factor de crecimiento derivado de plaquetas B (PDGF-B) en la patogénesis del Síndrome de Hiperestimulación Ovárica (OHSS). En segundo lugar, se estudia el efecto protector del esfingolípido ceramida-1-fosfato (C1P) sobre la foliculogénesis en la Falla Ovárica Prematura (FOP) ocasionada por gonadotoxicidad de drogas quimioterapéuticas.

### I) Síndrome de estimulación ovárica (OHSS)

El OHSS es una complicación iatrogénica severa del crecimiento y maduración folicular ocasionada por la inducción de la ovulación con gonadotrofinas en tratamientos de fertilización. La prevalencia de OHSS se encuentra entre el 5-10% de las pacientes que se someten a estas técnicas y una de sus características principales es el aumento de la permeabilidad de la microvasculatura. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) está involucrado en la patogénesis de este síndrome, induciendo alta permeabilidad vascular y, por consiguiente, la presencia de ascitis en las pacientes. En nuestro laboratorio, hemos demostrado que la inhibición del VEGF disminuye la severidad del OHSS en un modelo desarrollado en rata. Pero además, para que exista una vasculatura madura y funcional, colaboran junto al VEGF otros sistemas angiogénicos, como la familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y la familia de la esfingosina-1 fosfato. Sin embargo, hasta ahora ningún estudio ha mostrado la posible participación de estos sistemas en la patología mencionada.

En base a estos antecedentes, se planteó la siguiente hipótesis: La desregulación de los sistemas de PDGF y S1P está involucrada en la patogenia de OHSS, afectando en parte a la angiogénesis ovárica y aumentando la permeabilidad vascular que conduce a la presencia de ascitis observada en este síndrome. Los objetivos específicos propuestos fueron:

1. Estudiar el efecto in vivo intraovárico que produce el agregado de PDGF-B sobre la permeabilidad vascular y la angiogénesis ovárica, y su relación con la dinámica folicular y luteal, y con la esteroidogénesis en un modelo de OHSS desarrollado en rata.

2. Estudiar el transporte de colesterol en fluidos foliculares humanos (FF) de pacientes sometidas a técnicas de reproducción asistida (ART) con alto riesgo de desarrollar OHSS y pacientes controles.

3. Evaluar el efecto in vitro que produce el agregado del esfingolípido S1P al FF proveniente de pacientes con alto riesgo de desarrollar OHSS sobre un cultivo primario de células vasculares de músculo liso.

## **II) Falla prematura ovárica (FOP)**

La FOP es un desorden multicausal caracterizado por la desaparición o disfunción prematura de los folículos ováricos, que afecta al 1-2% de mujeres menores de 40 años. Estas pacientes presentan amenorrea, hipoenstrogenismo y elevados niveles de gonadotrofinas. Las causas que provocan FOP pueden ser: genéticas, inmunes, infecciosas y/o iatrogénicas (quimioterapia, radioterapia). La mayoría de las drogas quimioterapéuticas, tales como ciclofosfamida y doxorubicina, poseen un fuerte efecto tóxico sobre el ovario, afectando tanto la reserva ovárica como la vasculatura. Hasta ahora, los tratamientos disponibles para FOP no son efectivos.

Por otra parte, se ha demostrado que esfingolípidos como la ceramida, la esfingosina y sus formas fosforiladas, la ceramida-1 fosfato (C1P) y la esfingosina-1 fosfato (S1P), regulan procesos celulares esenciales, la apoptosis, la migración y la

angiogénesis. Hasta ahora ningún trabajo ha evaluado la participación de C1P en ovario en condiciones patológicas, tal como la FOP inducida con quimioterapia.

En base a estos antecedentes, se planteó la siguiente hipótesis: El C1P protege al ovario en la FOP inducida por quimioterapia a través de la modulación de la función ovárica, la mejora de la dinámica folicular y la angiogénesis. Los objetivos específicos fueron:

1. Analizar el efecto in vivo intraovárico del esfingolípido C1P en ovarios provenientes del modelo de FOP inducida por quimioterapia desarrollado en ratón hembra adulto sobre: el desarrollo folicular, la atresia, la apoptosis ovárica, los niveles de esteroides sexuales, el desarrollo y estabilidad vascular del ovario, los mecanismos de transducción de señales, la funcionalidad ovocitaria y la fertilidad de la hembra;

2. Evaluar el efecto in vitro que produce el C1P sobre la viabilidad y la funcionalidad celular en una línea celular de macrófagos expuestos a quimioterapia.

En cuanto al modelo de OHSS, el tratamiento local con PDGF-B disminuyó el % de estructuras quísticas, los niveles de progesterona sérica, la expresión de las enzimas esteroideogénicas P450scc y 3 $\beta$ -HSD, la proliferación de células luteales y la permeabilidad vascular ovárica comparado a las ratas OHSS sin tratar. Por otra parte, aumentó el área peri-endotelial en cuerpos lúteos y quistes luteales, así como la deposición de colágeno IV en las membranas basales. Todos estos efectos indican una disminución en la permeabilidad vascular y presencia de ascitis, las cuales representan una de las mayores complicaciones causadas por el OHSS. Al estudiar los FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS, se observaron alteraciones en los perfiles lipoproteicos y en proteínas relacionadas con el metabolismo del colesterol, así como también alteraciones en las células peri-endoteliales (claves para la estabilidad vascular) al ser tratadas con FF de pacientes con riesgo de OHSS, respecto de FF de pacientes control.

Respecto al modelo de FOP inducida por quimioterapia en roedor, observamos que la ciclofosfamida tuvo fuertes efectos gonadotóxicos sobre el ovario (disminución de folículos pequeños y aumento de folículos atrésicos, aumento de la apoptosis, pérdida de la reserva ovárica, alteraciones vasculares, hormonales y disminución en la fertilidad). Todos estos efectos fueron prevenidos, al menos de manera parcial, por la co-administración local de C1P junto con la quimioterapia. Además, la ciclofosfamida causó modificaciones en la morfología uterina, que fueron prevenidas por el co-tratamiento con C1P. Por último, se estudiaron los efectos citotóxicos *in vitro* en macrófagos generados por ciclofosfamida, siendo estas las células inmunes más relevantes del ovario. C1P fue capaz de aumentar la viabilidad celular y la producción de citoquinas, y de disminuir la apoptosis inducida por ciclofosfamida en este tipo celular.

En conclusión, los resultados observados en el modelo de OHSS indican que el sistema de PDGF participaría activamente en el ovario, regulando la permeabilidad vascular y estableciendo una vasculatura funcional. En el futuro, en el ámbito clínico, este factor podría utilizarse como marcador predictivo y evitar el desarrollo del síndrome en las pacientes que comienzan un tratamiento de fertilización asistida. Por otra parte, los resultados obtenidos con el modelo de FOP inducida por quimioterapia sugieren que C1P es capaz de mejorar la dinámica folicular y de modular el desarrollo vascular en el ovario. Por lo tanto, C1P cumpliría un rol protector en el ovario, preservando la funcionalidad ovárica frente a la toxicidad causada por la quimioterapia. En el futuro, la administración de C1P podría implementarse como posible estrategia para proteger al ovario antes y/o durante el tratamiento antitumoral. De esta manera, aquellas pacientes que han padecido cáncer y están recuperadas tendrían mayor posibilidad de concebir un hijo.

**Palabras clave: OHSS, FOP, angiogénesis, ovario, oncofertilidad.**

# Implications of platelet derived growth factor B and sphingolipid ceramide-1-phosphate in female reproductive pathologies with severe alterations of follicular dynamics

## **ABSTRACT**

The present work comprises two chapters in relation with two female reproductive pathologies with severe alterations in follicular dynamics and that are both iatrogenic (caused by medical treatments). Firstly, we addressed the implications of platelet derived growth factor B (PDGF-B) on the pathogenesis of the Ovarian Hyperstimulation Syndrome (OHSS). Secondly, we have studied the protective effect of sphingolipid ceramide-1-phosphate (C1P) on ovarian function in premature ovarian failure (POF) induced by chemotherapy gonadotoxicity.

## **I) Ovarian Hyperstimulation Syndrome (OHSS)**

Ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) is an iatrogenic complication of ovulation induction and ovarian stimulation for assisted reproductive technology (ART) and is characterised by rapid fluid shifts from the intravascular compartment to the third space. Its prevalence is 5-10% of patients that undergo ART and it is a potentially life-threatening condition in its severe form. Although the patho-physiology of the syndrome is not completely understood, and no specific therapy or prevention is available yet, it is known that vascular endothelial growth factor (VEGF) induces high permeability and, therefore, the presence of ascites in these patients. In our laboratory, we have shown that VEGF inhibition decreases the severity of this syndrome in a rat OHSS model. However, in order to maintain a mature and functional vasculature, there are other angiogenic systems that must collaborate with VEGF in a coordinate and complementary manner, such as the family of platelet derived growth factor (PDGF)

and the family of sphingosine-1-phosphate. So far, no studies have demonstrated the participation of these systems in OHSS.

Based on our background, the following hypothesis was proposed: a) Deregulation of PDGF and S1P systems is implicated in the OHSS pathogeny, therefore affecting vascular stability and contributing to the excessive vascular permeability that leads to ascitis in OHSS. The specific objectives for this chapter were:

1. To study in a rat OHSS model the *in vivo* effect of recombinant PDGF-B on: follicular development, ovulation and corpora lutea formation; development, stability and permability of ovarian vasculature; apoptosis and cell proliferation; sexual steroids and steroidogenic enzyme levels and cell signalling pathways implicated in OHSS.

2. To assess the transport of cholesterol and the composition of lipoproteins in human follicular fluids (hFF) from patients with high risk of developing OHSS and from control patients.

3. To evaluate the *in vitro* effect of the sphingolipid S1P in the presence of hFF from patients at risk of developing OHSS on a primary culture of vascular smooth muscle cells.

## **II) Premature ovarian failure (POF)**

POF is a multicausal disorder defined by loss of ovarian activity before the age of 40 and it affects 1-2% of women under 40 years old. POF is characterised by menstrual disturbance (amenorrhea or oligomenorrhea) with raised gonadotropins and low estradiol and can be caused by a variety of factors including genetic, immune, infectious and /or iatrogenic factors, such as chemotherapy or radiotherapy. Certain cancer-directed therapies, such as cyclophosphamide and doxorubicin treatments, can cause accelerated loss of ovarian reserve and alterations to ovarian vasculature, leading to POF.

It has been demonstrated that sphingolipids like ceramide, sphingosine and their phosphorylated forms, ceramide-1-phosphate and sphingosine-1-phosphate



regulate essential cellular processes, such as cell proliferation, apoptosis, migration and angiogenesis. So far, no studies have evaluated the role of C1P in the ovary in pathological conditions, as is chemotherapy-induced POF.

Therefore, we postulated the following hypothesis: C1P protects ovaries from chemotherapy-induced POF by modulating ovarian function and improving follicular dynamics and angiogenesis. The specific objectives were:

1) To analyze the *in vivo* effect of intraovarian administration of C1P in ovaries from a cyclophosphamide-induced POF mice model on: follicular development, atresia, apoptosis, sexual hormone levels, ovarian vascular development and stability; oocyte quality and female fertility

2. To evaluate the *in vitro* effect of C1P in the presence of cyclophosphamide on a macrophage culture.

As for the OHSS model, local treatment with PDGF-B decreased the percentage of cystic structures, serum progesterone levels, expression of steroid-producing enzymes, luteal proliferation and ovarian vascular permeability, which are all increased parameters in the OHSS rat model. Moreover, PDGF-B treatment increased ovarian peri-endothelial area and collagen IV deposition in vascular basal membranes. All of these effects tend to diminish the excessive vascular permeability, which would help prevent ascites, one of the most severe complications in this syndrome. Studies on Hff from patients with high risk of developing OHSS revealed that lipoproteic profiles were altered, as well as the expression of proteins related to cholesterol metabolism. PDGF-B and PDGF-D, key ligands for vascular stability, were decreased in hFF from OHSS patients compared to control.

Regarding the chemotherapy-induced POF model, cyclophosphamide had strong gonadotoxic effects on the ovary: decrease of follicles from early stages and increase of atretic follicles, loss of ovarian reserve, increased apoptosis, vascular alterations, FSH increase and estradiol decrease, and impaired fertility. All of these

effects were at least partially prevented when C1P was co-administered together with chemotherapy. Furthermore, cyclophosphamide modified uterine morphology, which was protected by C1P treatment. Lastly, we studied the cytotoxic effects of cyclophosphamide on macrophages, which are the most frequent and relevant immune cells in the ovary. C1P was able to increase cell viability and cytokine production, while decreasing apoptosis induced by cyclophosphamide.

In conclusion, our results in the OHSS model indicate that the PDGF system is actively participating in the ovary, regulating vascular permeability. In the future, this factor could be used as a predictive marker and to avoid the onset of this syndrome in patients starting ART procedures.

On the other hand, the results regarding the chemotherapy-induced POF model suggest that C1P is able to improve follicular dynamics, especially during the first stages of folliculogenesis, and to modulate ovarian vasculature. Therefore, C1P would have a fertoprotective role in the ovary, preserving ovarian function against chemotherapy toxicity. In the future, C1P administration could be implemented as a possible strategy to protect ovaries before or during anti-tumoral treatments, helping women who have recovered from cancer to increase their possibilities to conceive a child.

**KEYWORDS: OHSS, POF, ovary, angiogenesis, oncofertility**

## AGRADECIMIENTOS

**Esta tesis no podría haberse realizado sin el apoyo de muchísima gente.**

En primer lugar, quiero agradecerle de todo corazón a **Fer**, que es la mejor directora. Ya son casi 8 años de aprender al lado tuyo y no tengo más que palabras de cariño y agradecimiento! Gracias por acompañarme constantemente y, a la vez, darme todas las herramientas para ser independiente. Gracias por alentarme siempre para alcanzar mi máximo potencial y también por corregirme con paciencia cuando me equivoco. No todos tienen la bendición de tener una directora incondicional, motivadora, activa, empática, honesta, comprometida, divertida y, por sobre todo, una excelentísima persona! Gracias por hacer que nuestro lab sea un lugar donde se disfruta trabajar y por seguir eligiéndome!

A **todos los miembros del 208/218**, gracias por ser compañeros con todas las letras, por hacer que este equipo sea imparable! A **Leo**, que desde el día que llegué me enseñó con toda la paciencia del mundo, me brindó su ayuda generosa, y aún lo sigue haciendo. Aunque no quedó en papel, en el día a día, fuiste mi guía y codirectora, y eso para mí vale oro! Es un placer hacer equipo con vos, ya sea en proyectos, cursos o congresos, gracias! A **Gri** y **Dalhi**, gracias por su consejo invaluable y por estar siempre disponibles. A **Gonza**, mi “pequeño” saltamontes, gracias de corazón por ayudarme estos últimos años, es una alegría contar con vos siempre! Además, antes cantaba sola en el lab y ahora somos un dúo! A **Pauli**, gracias por tu amistad y por las incontables anécdotas juntas, te quiero y te voy a extrañar! A **Sully**, gracias por recibirme con los brazos abiertos y por ser mi codirectora de beca. A **Diani**, gracias por estar siempre atenta a las necesidades de todos y por alegrarte conmigo en cada logro. A **Sebas, Andy y Cande**, gracias por la buena onda, los almuerzos compartidos y por ayudarme siempre que necesité una mano.

Al **Dr. Juan Carlos Calvo**, por ser mi consejero de estudios, ya que con su paciencia infinita hizo que este proceso sea mucho más ameno y me ayudó a resolver cada problema con máxima predisposición. Gracias JC!!

A los siguientes investigadores con los que tuvimos el placer de colaborar en esta tesis: a la **Dra. Flavia Saravia** y al **Lic. Carlos Pomilio** por su colaboración en los estudios de permeabilidad vascular y a la **Dra. Debora Cohen** por su colaboración en los estudios de fertilidad.

A **PREGNA** Medicina Reproductiva, por colaborar con nosotros y proveernos del material humano. En especial, al **Dr. Ignacio de Zúñiga**, gracias por tu constante interés y por tus palabras de aliento en cada momento.

A la **Dra. Dolores Busso** y a todo el equipo de la PUC, gracias por recibirme allá por el 2012 y ayudarme en mi primer contacto con el mundo de los lípidos. Gracias Loli por tu calidez y por la hermosa experiencia.

Al **Dr. Antonio Gómez Muñoz** y a su gran equipo, gracias por todo lo que aprendí en la increíble aventura que fue trabajar en la UPV. Gracias Antón por abrirme las puertas de tu lab y de tu casa, por hacer todo lo posible para que me sintiera cómoda, por ayudarme en todo momento. Una parte de mi corazón se quedó para siempre en Bilbao, y eso es gracias a vosotros!

A las fuentes de financiamiento de esta tesis y a las becas que permitieron llevarla a cabo: **CONICET, PLISSER y BEC.AR.**

A todos los que conforman nuestro querido instituto, gracias por hacer del IByME una gran familia. A **Caro Mondillo**, por su dulzura, por ser mi primer contacto con la ciencia, por recomendarme a Fer y por alegrarse conmigo en cada paso de este camino!

A los **compas de pasillo** por su buena onda de todos los días y por bancarse los mangazos de un poquito de esto y aquello! Somos el pasillo más copado y se sabe :) Un gracias muy especial a **Nico Dalton** y a **Cintia** por prenderse en las locuras y tener siempre un oído dispuesto, un abrazo listo y, lo más importante, comida por si hay hambre.

A todos los que forman el **coro**, mis tiburones, pulpos y mantarrayas, gracias por las risas y por hacer de esos ratos cantando juntos, lo mejor del día.

A todos **mis amigos del IByME**, pasados y presentes, que le dan vida a mis días en este instituto. Gracias por las charlas de pasillo, por los after y las fiestas, por los viernes de tortas, por las palabras de ánimo cuando algo no sale, por el abrazo sincero y las risas compartidas. Mención especial a mi co-equipper **Nico Brukman**, por ser mi compañero fiel de aventuras y reinado! Te quiero!

A **Camí** y a **Mari**, mis amigas del alma. No me puedo imaginar cómo hubiese sido mi doctorado sin ustedes. Gracias por ser mucho más que compañeras, por ser mis confidentes, mis fellows, por estar ahí conmigo siempre, incondicionales, por conocerme tanto. Gracias por cada congreso juntas, por cada aventura científica (y por las otras también). Las quiero muchísimo. Nuestra amistad es infinita, colibríes.

A mis amigos de la facu, gracias me queda chico! A mi brother **Guido**, las biolocapas **Estefi y Euge**, los incondicionales **Juli, Emi, Martu, Aye**, a los primeros **Mary, Manu, Ivi, Lula, Dani Papparini, Javi...** y seguro me estoy olvidando alguien (perdón!). Soy feliz de poder seguir compartiendo la vida con ustedes, gracias por bancarme en todas y porque cada reencuentro es una fiesta. Los quiero tanto!

A todos mis amigos en países lejanos (o no tanto) que pude conocer gracias a este doctorado y que son uno de mis más grandes tesoros!! **Cote, Maritxu, Haize, Pau, Mai, Haize de la Vega** gracias por ser mi roca cuando estaba lejos de casa y por seguir estando conmigo hoy <3

Y a los que hoy están lejos físicamente, pero son una parte muy, muy importante de mi vida y están siempre conmigo: **Elvi, Negrito, Fede, Emi Ru, Benja**, los quiero! Gracias por su amistad!

A mis amigas de toda la vida, **mis wildies**, gracias por seguir apoyándome en esta etapa, por interesarse por mis locuras científicas, por bancarse mis ausencias cuando no me da la vida y mis anécdotas eternas cuando logramos juntarnos. Aunque cuando nos juntamos volvemos a ser adolescentes por un rato, es hermoso ver cómo vamos creciendo y seguimos juntas a lo largo de los años. Gracias por estar siempre!

A mis **amigos de GJE**, mis hermanos de batalla, no tengo palabras para agradecerles. Gracias por su amistad sincera, por sus oraciones, por preocuparse siempre por mi bienestar, por entender cuando no puedo estar con ustedes, por todas las experiencias vividas juntos, que tanto me enseñaron en esta vida. Los quiero a todos y cada uno, ustedes ya saben quiénes son. Agradezco especialmente a Mer, por incluirnos en su familia y darnos un sobri tan hermoso como Nachito!

A **Oliver**, que me bancó como ningún ser humano podría haber hecho horas y horas frente a la compu y me espera feliz en cada regreso a casa. Sos una gran compañía, perritopiii!

A **Joaco**, gracias por ser parte de esta loca familia, por las charlas científicas que solo nosotros disfrutamos, por ser un gran cuñado, pero especialmente, por cuidar tan bien a mi persona favorita.

A **Giuli**, mi cómplice en todo, mi gran amiga, confidente, la persona por la que daría todo en esta vida. Gracias simplemente por ser quien sos, por el millón de chistes que nadie más entiende, por bancarme en mis crisis existenciales, por tirarme una dosis de sabiduría cuando la necesito, por ser mi consultora N°1. Te amo con todo mi corazón, gracias hermanita!

A **mi papá**, por su apoyo incondicional en todo momento, por estar siempre al tanto de mi carrera, por ser una fuente inagotable de refranes que cada vez son más ciertos, por buscar siempre lo mejor para mí y por enseñarme a ser fuerte e independiente. Te amo, pa!

A mi **mamá**. Esta tesis es tan mía como tuya. No podría haberlo hecho sin tu amor inmenso, que me sostiene y me anima. Gracias por disfrutar cada paso de esto conmigo, por las noches desvelada cuando estaba de viaje sólo para desearme buen día, por soportar mis locuras, por estar pendiente de que nada me falte para poder hacer bien mi trabajo. Porque me ayudás a ver lo positivo en cada situación y nada es tan malo si estás vos para consolarme. Porque todo lo que soy es gracias a tu esfuerzo de cada día y al amor que pusiste para criarnos. Te amo con toda el alma, gracias!

Y por último, quiero agradecer a **Dios**, al que me regaló la vida y todo lo que acabo de mencionar. Gracias por sostenerme cuando me caigo, por ser la fuente de todo lo bueno y verdadero. Por darme fuerzas para seguir luchando por hacer del mundo un

lugar con un poco más de amor. Por poner en mi camino tantas personas maravillosas que me ayudan y me enseñan. Por darme ejemplos de coraje y entrega cuando los necesito. Por llevarme de la mano en esta vida y darme esta vocación tan increíble. Gracias!

**A mi familia.**

*Un poco de ciencia aleja de Dios,  
pero mucha ciencia devuelve a Él.*

Louis Pasteur

---

## PUBLICACIONES

Los resultados presentados en esta Tesis de Doctorado fueron parte de los siguientes trabajos científicos publicados en revistas internacionales:

**"In vivo intrabursal administration of bioactive lipid sphingosine-1-phosphate enhances vascular integrity in a rat model of ovarian hyperstimulation syndrome".** Pascuali N\*, Di Pietro M\*, Scotti L, Irusta G, Bas D, May M, Tesone M, Abramovich D, Parborell F. \*Los autores contribuyeron de igual forma al artículo. *Molecular Human Reproduction* (2017), Vol.23 (6), 417-427, doi: 10.1093/molehr/gax021.

**"Ceramide-1-phosphate protective properties against cyclophosphamide-induced ovarian damage in a mice model of premature ovarian failure".** Natalia Pascuali, Leopoldina Scotti, Mariana Di Pietro, Gonzalo Oubiña, Diana Bas, María May, Antonio Gómez Muñoz, Patricia S Cuasnicú, Débora J Cohen, Marta Tesone, Dalhia Abramovich, Fernanda Parborell. *Human Reproduction* (2018, in press), DOI: 10.1093/humrep/dey045.



---

I B Y M E

***Esta tesis se realizó con el apoyo de CONICET, ANPCyT,  
Plisser, BEC.AR y Fundación Roemmers***



---

# ÍNDICE

|                                                                       |           |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ABREVIATURAS</b> .....                                             | <b>19</b> |
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....                                             | <b>21</b> |
| EL OVARIO .....                                                       | 21        |
| <i>Foliculogénesis</i> .....                                          | 22        |
| <i>Selección del folículo dominante</i> .....                         | 28        |
| <i>Atresia folicular</i> .....                                        | 29        |
| <i>Ovulación</i> .....                                                | 33        |
| <i>Luteinización</i> .....                                            | 34        |
| <i>Ciclo ovárico en roedores</i> .....                                | 35        |
| APOPTOSIS.....                                                        | 36        |
| Apoptosis como mecanismo de atresia folicular .....                   | 37        |
| ANGIOGÉNESIS .....                                                    | 38        |
| FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS (PDGF).....               | 42        |
| <i>Estructura del PDGF</i> .....                                      | 42        |
| <i>Estructura del receptor de PDGF (PDGFR)</i> .....                  | 43        |
| <i>Activación de PDGFR</i> .....                                      | 44        |
| <i>Vías de señalización asociadas a PDGF</i> .....                    | 45        |
| <i>Rol de PDGF en angiogénesis</i> .....                              | 47        |
| ESFINGOSINA-1-FOSFATO (S1P).....                                      | 48        |
| ANGIOGÉNESIS FISIOLÓGICA EN EL OVARIO.....                            | 50        |
| TRANSPORTE DE COLESTEROL EN EL OVARIO .....                           | 51        |
| PATOLOGIAS ASOCIADAS A DISFUNCIÓN OVARICA.....                        | 54        |
| <i>Síndrome de Hiperestimulación Ovárica (OHSS)</i> .....             | 54        |
| Rasgos clínicos de OHSS.....                                          | 55        |
| Etiología de OHSS .....                                               | 56        |
| <i>Falla prematura ovárica (POF)</i> .....                            | 57        |
| <b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....                                    | <b>59</b> |
| <b>METODOLOGÍA GENERAL</b> .....                                      | <b>63</b> |
| MATERIALES Y REACTIVOS .....                                          | 63        |
| <i>Anticuerpos</i> .....                                              | 63        |
| MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS .....                   | 64        |
| <i>Cirugía e inyección intrabursa</i> .....                           | 64        |
| COLORACIÓN CON HEMATOXILINA - EOSINA .....                            | 65        |
| TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) E HISTOQUÍMICA.....               | 66        |
| EXTRACCIÓN Y MEDICIÓN DE PROTEÍNAS .....                              | 67        |
| WESTERN BLOT .....                                                    | 68        |
| EXTRACCIÓN DE ESTEROIDES DE OVARIO.....                               | 69        |
| RADIOINMUNOENSAYO (RIA) .....                                         | 69        |
| <b>CAPÍTULO I: SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA (OHSS)</b> ..... | <b>71</b> |
| <i>Etiología de OHSS</i> .....                                        | 72        |
| <i>Incidencia de OHSS</i> .....                                       | 75        |
| Factores de riesgo que influyen en la incidencia de OHSS.....         | 75        |
| <i>Métodos actuales de prevención de OHSS</i> .....                   | 76        |
| METODOLOGÍA .....                                                     | 80        |
| <i>Modelo animal de OHSS desarrollado en rata</i> .....               | 80        |

|                                                                                                                                                                                                   |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <i>Procesamiento de tejidos</i> .....                                                                                                                                                             | 81  |
| <i>Morfología ovárica</i> .....                                                                                                                                                                   | 82  |
| <i>Evaluación de parámetros de proliferación</i> .....                                                                                                                                            | 83  |
| <i>Cuantificación de las áreas vasculares</i> .....                                                                                                                                               | 83  |
| <i>Evaluación de permeabilidad vascular por extravasado de fluoresceína de sodio (NaFlu)</i> .....                                                                                                | 84  |
| <i>Inmunofluorescencia (IF)</i> .....                                                                                                                                                             | 85  |
| <i>Pacientes y obtención de FF humano</i> .....                                                                                                                                                   | 86  |
| <i>Ensayo enzimático para la determinación de los niveles de colesterol total</i> .....                                                                                                           | 87  |
| <i>Obtención y análisis de perfiles lipoproteicos</i> .....                                                                                                                                       | 87  |
| <i>Cultivo primario de células de granulosa-luteínicas humanas (CGL)</i> .....                                                                                                                    | 88  |
| <i>Cultivo primario de células de músculo liso vasculares (VSMCs)</i> .....                                                                                                                       | 89  |
| <i>Colocalización de N-cadherina y filamentos de actina en VSMCs</i> .....                                                                                                                        | 90  |
| <b>RESULTADOS</b> .....                                                                                                                                                                           | 91  |
| <i>Modelo de OHSS desarrollado en rata</i> .....                                                                                                                                                  | 91  |
| Efecto del tratamiento con PDGF-B sobre el peso ovárico en el modelo de OHSS desarrollado en rata. ....                                                                                           | 91  |
| Efecto del tratamiento con PDGF-B sobre la dinámica folicular y luteal en ovarios provenientes del modelo de OHSS desarrollado en rata.....                                                       | 92  |
| Efecto del tratamiento con PDGF-B sobre los niveles séricos de progesterona en el modelo de OHSS desarrollado en rata.....                                                                        | 95  |
| Efecto del tratamiento con PDGF-B sobre los niveles proteicos de P450scc y 3 $\beta$ -HSD en ovarios provenientes del modelo de OHSS desarrollado en rata.....                                    | 95  |
| Efecto del tratamiento con PDGF-B sobre la proliferación de células luteales en el modelo de OHSS desarrollado en rata.....                                                                       | 96  |
| Efecto del tratamiento con PDGF-B sobre la estabilidad vascular en un modelo de OHSS desarrollado en rata .....                                                                                   | 98  |
| Efecto del tratamiento con PDGF-B sobre las uniones intercelulares en ovarios provenientes del modelo de OHSS desarrollado en rata .....                                                          | 100 |
| Efecto del tratamiento con PDGF-B sobre el sistema de S1P en ovarios provenientes del modelo de OHSS desarrollado en rata.....                                                                    | 101 |
| Efecto del tratamiento con PDGF-B sobre la permeabilidad vascular en ovario proveniente del modelo de OHSS desarrollado en rata .....                                                             | 102 |
| Efecto del tratamiento con PDGF-B sobre la presencia de células de músculo liso vasculares y la deposición de matriz extracelular .....                                                           | 104 |
| <i>FF humanos</i> .....                                                                                                                                                                           | 106 |
| Transporte de colesterol en fluidos foliculares humanos de pacientes control y pacientes con alto riesgo a desarrollar OHSS.....                                                                  | 106 |
| <i>Cultivo primario de VSMCs de aorta de rata</i> .....                                                                                                                                           | 110 |
| Caracterización del cultivo primario de VSMCs aisladas de aorta de rata .....                                                                                                                     | 110 |
| Efecto de S1P en presencia de FF de pacientes controles y con riesgo a desarrollar OHSS sobre el citoesqueleto de actina y la localización de N-cadherina en VSMCs aisladas de aorta de rata..... | 113 |
| Efecto de S1P en presencia de FF de pacientes control y con riesgo a desarrollar OHSS sobre la expresión de proteínas de unión intercelular en VSMCs aisladas de aorta de rata .....              | 116 |
| Efecto de S1P en presencia de FF de pacientes controles y con riesgo a desarrollar OHSS sobre la expresión de receptores de S1P en VSMCs aisladas de aorta de rata.....                           | 118 |
| <b>DISCUSIÓN</b> .....                                                                                                                                                                            | 120 |
| <i>Modelo in vivo de OHSS desarrollado en rata</i> .....                                                                                                                                          | 120 |
| <i>FF humanos</i> .....                                                                                                                                                                           | 128 |
| <i>Cultivo primario de VSMCs de aorta de rata</i> .....                                                                                                                                           | 131 |
| <b>CAPÍTULO II: FALLA OVÁRICA PREMATURA (FOP)</b> .....                                                                                                                                           | 134 |
| FISIOPATOLOGÍA DE FOP .....                                                                                                                                                                       | 135 |
| LA QUIMIOTERAPIA COMO AGENTE INDUCTOR DE FOP .....                                                                                                                                                | 137 |
| <i>Agentes alquilantes: el uso de ciclofosfamida (CTX)</i> .....                                                                                                                                  | 139 |

|                                                                                                                                     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <i>Blancos potenciales de CTX en el ovario</i> .....                                                                                | 141 |
| Efectos de CTX sobre los distintos estadios foliculares .....                                                                       | 141 |
| Efectos de CTX sobre las células germinales y células somáticas ováricas.....                                                       | 143 |
| Efectos de CTX sobre otros tipos celulares del ovario .....                                                                         | 146 |
| Efectos de CTX sobre otros tejidos.....                                                                                             | 148 |
| <i>Protección de la fertilidad frente a CTX</i> .....                                                                               | 148 |
| <i>Potenciales tratamientos “fertoprotectores”</i> .....                                                                            | 150 |
| AS101.....                                                                                                                          | 150 |
| AMH.....                                                                                                                            | 151 |
| Inhibidores de mTOR .....                                                                                                           | 151 |
| Compuestos antioxidantes.....                                                                                                       | 151 |
| Esfingolípidos .....                                                                                                                | 152 |
| <i>El esfingolípido C1P: candidato para la preservación de la fertilidad</i> .....                                                  | 152 |
| Estructura y metabolismo de los esfingolípidos .....                                                                                | 152 |
| Características y señalización .....                                                                                                | 154 |
| El rol de C1P en la regulación celular .....                                                                                        | 154 |
| <b>METODOLOGÍA</b> .....                                                                                                            | 156 |
| <i>Modelo de falla ovárica prematura (FOP) inducida por quimioterapia en ratón</i> .....                                            | 156 |
| <i>Procesamiento de tejidos</i> .....                                                                                               | 158 |
| <i>Recuento folicular</i> .....                                                                                                     | 158 |
| <i>Evaluación de fertilidad in vivo</i> .....                                                                                       | 159 |
| <i>Ensayos de fertilización in vitro y desarrollo embrionario</i> .....                                                             | 160 |
| <i>Técnica de TUNEL</i> .....                                                                                                       | 161 |
| <b>RESULTADOS</b> .....                                                                                                             | 162 |
| Efecto de C1P sobre la foliculogénesis ovárica y la morfología uterina en el modelo de FOP inducida por ciclofosfamida (CTX). ..... | 162 |
| Efecto de C1P sobre la expresión ovárica de AMH en el modelo de FOP inducida por ciclofosfamida .....                               | 166 |
| Efecto de C1P sobre los niveles hormonales en el modelo de FOP inducida por ciclofosfamida .....                                    | 168 |
| Efecto de C1P sobre la apoptosis en el modelo de FOP inducida por ciclofosfamida.....                                               | 169 |
| Efecto de C1P sobre la vasculatura ovárica en el modelo de FOP inducida por ciclofosfamida .....                                    | 172 |
| Efecto de C1P sobre la fertilidad en el modelo de FOP inducida por ciclofosfamida .....                                             | 175 |
| Efecto de C1P sobre la calidad ovocitaria y la fertilización in vitro en el modelo de FOP inducida por ciclofosfamida .....         | 176 |
| Efecto de C1P sobre la funcionalidad de macrófagos en presencia de ciclofosfamida.....                                              | 178 |
| <b>CONCLUSIONES GENERALES</b> .....                                                                                                 | 194 |
| <b>REFERENCIAS</b> .....                                                                                                            | 199 |

## **ABREVIATURAS**

$\alpha$ -SMA:  $\alpha$ -actina de músculo liso

$\mu$ g: microgramo

$\mu$ l: microlitro

$\mu$ M: micromolar

3 $\beta$ -HSD: 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa

ADN: ácido desoxirribonucleico

ANGPTs: Angiopietinas

ANOVA: Análisis de varianza

Apo A-I: apolipoproteína A-I

BSA: Albúmina de suero bovino

C1P: ceramida-1-fosfato

CL: cuerpo lúteo

CTX: Ciclofosfamida

DMSO: Dimetil sulfóxido

E2: Estradiol

eCG: Gonadotrofina coriónica equina

ESM: Error estándar de la media

FF: Fluido folicular

FSH: Hormona folículo estimulante

fVW: factor de VonWillebrand

GnRH: Hormona liberadora de gonadotrofinas

hCG: Gonadotrofina coriónica humana

HDL: Lipoproteína de alta densidad

IGF-1: Factor de crecimiento similar a la insulina tipo I

IHQ: inmunohistoquímica

IF: inmuno fluorescencia

Ip: intraperitoneal

kDa: kilo Dalton

LH: Hormona luteinizante

MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos 1

ml: mililitro

NaFlu: fluoresceína de sodio

ng: nanogramo

OHSS: Síndrome de hiperestimulación ovárica

PCNA: Antígeno nuclear de células en proliferación

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

Perf: Perfosfamida

PMSG:

RIA: Radioinmunoensayo

S1P: esfingosina-1-fosfato

Sc: subcutáneo

SDS: Dodecilsulfato sódico

SR-BI: Receptor scavenger clase B, tipo I

TGF: factor de crecimiento transformante

UI: unidades internacionales

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

VSMCs: células de músculo liso vasculares

## **INTRODUCCIÓN**

### **EL OVARIO**

El ovario de mamíferos es un órgano que tiene como principal función la de generar, almacenar, desarrollar y liberar los ovocitos, formados durante la vida embrionaria o fetal, como gametas completamente competentes para ser fertilizadas y para permitir el desarrollo embrionario (función gametogénica). Es además el principal portador de las células secretoras de hormonas femeninas que desarrollan y mantienen los caracteres sexuales secundarios de la hembra y preparan a los órganos reproductivos accesorios para la preñez y el nacimiento de la cría, generando un ambiente propicio para la implantación y desarrollo del cigoto (función endócrina)[1]. La función final del ovario es la de permitir la propagación de la especie [2].

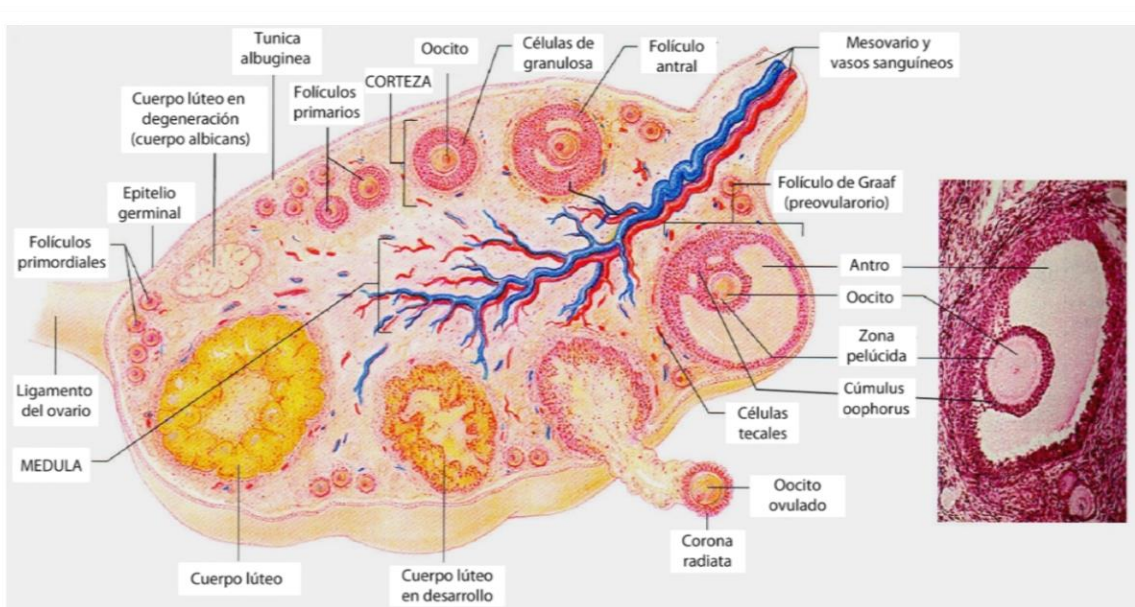
Durante la adultez, la superficie del ovario es nodular y se encuentra cubierta por una capa monoestratificada de células cúbicas o poliédricas, llamada epitelio germinal [3]. Esta cubierta epitelial está frecuentemente invaginada hacia el tejido conectivo subyacente llamado túnica albugínea, formando pequeños pliegues, hoyos o criptas. Por debajo se encuentran dos zonas: la llamada zona cortical y la zona medular, y el límite entre ambas no se encuentra bien definido. La primera comprende al estroma ovárico (formado por tejido conectivo laxo, fibroblastos y precursores de células tecales), y folículos en distintos estadios de maduración, atrésicos y cuerpos lúteos. La zona medular que se encuentra muy vascularizada e inervada, contiene células de tipo muscular y tejido conectivo laxo [4] (Fig. 1).

El ovario de mamíferos es, por lo tanto, un órgano heterogéneo en cuanto a la población celular presente en un momento dado, y también lo es en el tiempo, a lo largo de la vida del individuo. A partir de la pubertad, se producen variaciones hormonales

cíclicas que afectarán tanto al ovario como al cuerpo lúteo y al útero, preparándolos para la expulsión del ovocito y la potencial implantación del blastocisto.

## FOLICULOGÉNESIS

El proceso de foliculogénesis comprende el crecimiento del folículo y su pasaje a través de los distintos estadios de desarrollo, desde el momento en que emerge del pool de folículos formado durante la ovogénesis, hasta el momento en el cual es ovulado o entra en atresia (regresión o muerte del folículo), como se detalla en las Figs. 1 y 2.



**Figura 1: Estructura del ovario, desarrollo folicular, ovulación y formación del cuerpo lúteo.** Adaptado de Pearson Education.

Debido al continuo crecimiento y a la regresión de los folículos, la relación volumen/contenido del ovario, se encuentra en constante cambio [1]. Los ovarios de los mamíferos contienen a los folículos como unidades funcionales. Hasta ahora, se creía que el número total de folículos ováricos era determinado en forma temprana en la vida del individuo, y la depleción de este pool, llevaba a la senescencia de la vida reproductiva [2]. Esta doctrina, que sostenía que los mamíferos perdían su capacidad de generar células germinales durante su vida adulta, se encuentra en amplio debate en

la actualidad [5,6]. Johnson y col. mostraron la existencia de células germinales mitóticamente activas en ovarios de ratones juveniles y adultos, sugiriendo la presencia de estas células capaces de proliferar en el ovario del mamífero postnatal. Sin embargo, estos estudios aún no han sido confirmados y existen trabajos que plantean controversias respecto a esta nueva posibilidad [6-8].

Para cada especie se encuentran diferencias en el número de folículos formados durante la ovogénesis. Al nacimiento, el ovario contiene alrededor de 20.000, 160.000, y 1.000.000 folículos en ratas, ovejas y humanos respectivamente [1]. En la mayoría de los mamíferos, las ovogonias son transformadas en ovocitos primarios antes o después del nacimiento. Esta transición de ovogonia a ovocito está determinada por el cese del proceso de mitosis que sufren las células primordiales germinales y la entrada en la profase meiótica, etapa en la cual los ovocitos quedan arrestados. Luego de este proceso, los ovocitos se rodean de una capa única de células foliculares aplanadas, llamadas pregranulosa. En esta fase, las superficies del ovocito y de las células foliculares envolventes son lisas y están en estrecho contacto. Las células de la pregranulosa se encuentran envueltas en la lámina basal, que separa a este tipo celular de todo elemento que la rodea, como por ejemplo vasos sanguíneos, capilares y nervios [9].

Los folículos primordiales (Fig. 2), se encuentran principalmente en la periferia de la corteza, inmediatamente por debajo de la túnica albugínea y constituyen la reserva de folículos en reposo, los cuales serán progresivamente eliminados durante la vida reproductiva. Aparecen en el humano aproximadamente en la semana 16 de embarazo y su formación terminaría aproximadamente en la semana sexta luego del nacimiento [10]. Para que estos folículos primordiales inicien su crecimiento, es necesaria una compleja interacción entre factores estimulatorios e inhibitorios.

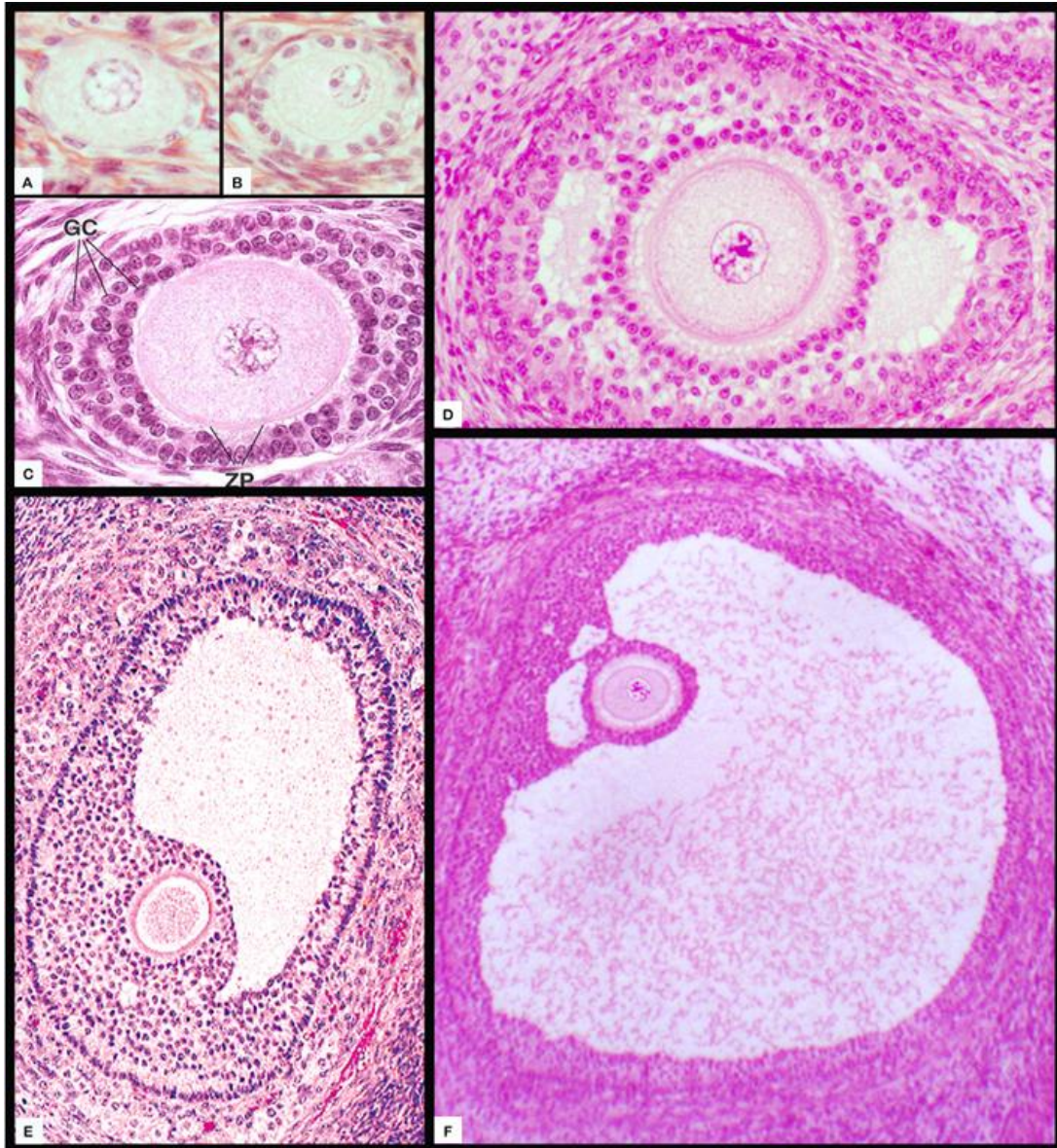
Estos folículos continuamente abandonan el reservorio para convertirse en folículos primarios (Fig. 2). Esta transición implica ciertas modificaciones citológicas



en el ovocito, en las células foliculares y en el tejido conjuntivo adyacente. A medida que el ovocito aumenta de tamaño, la capa única de células aplanadas se convierte inicialmente en una capa de células cúbicas y cilíndricas la cual, mediante el proceso de mitosis, origina las células de granulosa que formarán posteriormente un epitelio estratificado. Entre el ovocito y las células de granulosa circundantes, se originan espacios donde se deposita una sustancia que representa el inicio de la zona pelúcida, mucopolisacáridos secretados por las células de la granulosa, que más tarde originarán un halo translúcido que rodea al ovocito. La zona pelúcida está formada por tres glicoproteínas y su adquisición es una característica del folículo preantral. Se sabe que ratones knock out de proteínas que componen la zona pelúcida son infértiles o subfértiles [11].

A medida que los folículos aumentan de tamaño, van desplazándose gradualmente hacia el interior de la corteza. A través de sucesivas divisiones mitóticas de las células de granulosa, el folículo primario unilaminar pasa a un estadio preantral, multilaminado (con dos o más capas de células de la granulosa rodeando al ovocito), denominado folículo secundario o folículo preantral (Fig. 2). Estos folículos poseen una o dos arteriolas que terminan en una red vascular fuera de la lámina basal, y por lo tanto, el folículo entra en contacto directo con factores que se encuentran en la circulación [12]. En este estadio las células de la granulosa conforman una población homogénea y adquieren receptores de alta afinidad para la hormona folículo estimulante (FSH) y hormonas esteroideas [13]. Se ha reportado también la importancia de un factor derivado del ovocito llamado GDF-9 (Factor Diferenciador del Crecimiento-9), el cual, junto con la hormona FSH regularían el desarrollo folicular y la atresia durante la transición del estadio preantral a antral temprano [14]. Por lo tanto, la presencia del receptor de FSH en este estadio folicular sería necesaria para su posterior desarrollo.

Simultáneamente con la proliferación de estas células, se desarrolla alrededor del folículo otra capa de células originadas del estroma que forma la teca folicular. La aparición del estrato tecal se asocia con la adquisición de la vascularización del folículo.



**Figura 2: Clasificación de los estadios del desarrollo folicular en ovario.** A. Folículo primordial. B. Folículo primario. C. Folículo preantral. D. Folículo antral temprano. E. Folículo antral maduro. F. Folículo preovulatorio o de Graaf. GC: Células de la granulosa. ZP: Zona pelúcida.

A medida que se forman los capilares, las células teca-intersticiales parecen comenzar la diferenciación con la adquisición de los receptores de LH (Hormona Luteinizante) y la capacidad de biosíntesis de esteroides. La capa tecal se diferencia en

una interna y otra externa, la cual está compuesta por una mayor proporción de tejido conectivo. Numerosos vasos pequeños penetran en la teca externa para proporcionar un rico plexo capilar a la teca interna y dado que los capilares no penetran la membrana basal, la capa de células de granulosa permanece avascular durante todo el crecimiento del folículo. Como consecuencia de este aumento de la vascularidad, el folículo aumenta su exposición a factores que circulan por la sangre [15]

Es interesante destacar que el establecimiento de la red de capilares coincide con un periodo de crecimiento y diferenciación del folículo. Al aumentar el folículo de tamaño, se termina de formar la zona pelúcida. Las células de la granulosa mantienen contacto con el ovocito a través de proyecciones citoplasmáticas que penetran en la zona pelúcida y establecen contacto con la membrana celular del ovocito. Al final de esta fase, denominada preantral, el ovocito detiene su crecimiento y se vuelve competente para reanudar la meiosis.

Cuando el folículo alcanza un diámetro aproximado de 0,2 mm y posee de seis a doce capas de células (en humanos), aparecen unos espacios irregulares, llenos de un líquido claro entre las células de la granulosa. Este líquido aumenta en cantidad a medida que crece el folículo y los espacios irregulares que se forman entre las células de la granulosa confluyen para constituir una sola cavidad denominada antro, lo que marca el comienzo de la denominada fase antral. Acompañando el crecimiento folicular, se forma entonces una cavidad central, que contiene en el interior el fluido folicular, rodeado de células de la granulosa peri-endoteliales, localizadas en la periferia. El epitelio estratificado de células granulosas del folículo antral presenta un engrosamiento localizado en uno de sus lados llamado células del cúmulus oophorus, que se encuentran unidas entre sí y al ovocito mediante uniones estrechas (Fig. 1). La relación con estas células se vuelve más laxa ante la gradual aparición del líquido que llena los espacios intercelulares. Al desprenderse el ovocito, una o más capas de las

células del cumulus permanecen unidas a él, formando la corona radiata, envoltura celular laxa que persiste alrededor del ovocito aún después de la ovulación.

La aparición de los receptores de LH en las células de la granulosa ocurre durante la transición del folículo antral hacia el folículo preovulatorio, debido a la estimulación de FSH [16]. Este paso es fundamental para que el folículo progrese hacia el paso final, la ovulación.

Los folículos preovulatorios (Figs. 1 y 2) son aquellos que han alcanzado los estadios finales de crecimiento y maduración del folículo antral y han adquirido la habilidad para ovular ante los adecuados niveles de gonadotropina LH o la administración de gonadotropina coriónica humana (hCG). Es interesante destacar que los receptores a LH no se encuentran expresados de forma homogénea en estos folículos, sino que los mismos presentan un gradiente de expresión que disminuye desde las capas externas de la granulosa hacia la células del cúmulus [16,17]. El caso más extremo es el de las células del cúmulus de ratón, donde los receptores para LH son indetectables [18]. Por esta razón, el reinicio de la meiosis inducida por LH y la expansión de las células del cúmulus requeridas para la ovulación, serían eventos mediados por las células de la granulosa murales [19,20].

Por otra parte, los folículos preovulatorios se caracterizan por una baja tasa mitótica de las células foliculares y una alta relación estrógenos/andrógenos y estrógenos/progesterona en el fluido folicular.

Desde el momento en que el folículo ha sido seleccionado para la ovulación, el mismo comienza a crecer notablemente en tamaño. Las células de la granulosa sufren transformaciones morfológicas, tales como el aumento de su volumen [21]. Al folículo cuyo destino es la ovulación, se lo denomina folículo dominante [22].

## **SELECCIÓN DEL FOLÍCULO DOMINANTE**

El reclutamiento cíclico y selección de los folículos representa un proceso continuo, que eventualmente llega a la formación de uno o más folículos preovulatorios, cuyo número varía en cada especie. En los primeros días del ciclo menstrual en la mujer, aumentan los niveles circulantes de FSH, como consecuencia, una cohorte de folículos antrales escapa de la apoptosis que los llevaría a la atresia folicular. Dentro de este grupo, alrededor de 10 folículos antrales crecen más rápido y producen altos niveles de estrógenos e inhibina, seleccionándose entre éstos el folículo dominante.

A pesar de que no se conoce exactamente por qué un folículo emerge como dominante, se postula que éste posee una mayor sensibilidad a FSH, debido a una mayor expresión de receptores de FSH y/o LH. Asociado a este proceso, el estradiol (E2) y los factores de crecimiento locales ejercen un efecto permisivo, amplificando la acción de la FSH en los folículos que están madurando. Sin embargo, el aumento de E2 e inhibina, también ejerce una retroalimentación negativa sobre la liberación de FSH a nivel hipotálamo-hipófisis, lo cual evita que otros folículos sigan desarrollándose [2,23].

Además, la disminución de FSH provoca un descenso de la actividad de la aromatasas dependiente de FSH (enzima que transforma andrógenos a estrógenos). En consecuencia, se halla limitada la disponibilidad de estrógenos en los folículos menos maduros. Esto llevaría a la disminución de la proliferación de las células de granulosa y al aumento de andrógenos, provocando así una atresia irreversible.

El folículo dominante debe retener una sensibilidad única a la FSH y, de esa manera, aumentar la proliferación de sus células de granulosa, lo que permitiría obtener una mayor cantidad de receptores para esta gonadotropina. Los folículos seleccionados tendrán de esta manera un aumento de estrógenos mucho mayor que los folículos restantes. Además, al tener estos folículos seleccionados una mayor cantidad de células de granulosa y una mayor vasculatura en el compartimento tecal, permiten

una entrada preferencial de FSH. Por lo tanto, los folículos dominantes no sólo tienen la ventaja de tener mayor número de receptores para FSH, sino que además poseen una gran vasculatura que permite un fácil acceso para esta hormona.

En la rata, bajo el estímulo de FSH y en presencia de estrógenos, las células expresan receptores para LH y prolactina, los cuales van aumentando hasta llegar a valores máximos antes de la ovulación [24,25]. El aumento de estrógenos provoca, por un mecanismo de retroalimentación positiva, la estimulación del pico preovulatorio de LH. Estos procesos, actuando en forma sincronizada, permiten la selección de los folículos dominantes hasta llegar a la ovulación [2].

Por otro lado, se ha postulado, que el folículo dominante produce factores atretogénicos que inhiben el desarrollo de los folículos vecinos o subordinados [2,26].

## **ATRESIA FOLICULAR**

La atresia folicular es uno de los mecanismos característicos en vertebrados mamíferos y no mamíferos. En humanos, se calcula que más del 99% de los folículos sufren cambios degenerativos durante el normal funcionamiento ovárico. El proceso por el cual los folículos son eliminados se denomina atresia. Este fenómeno ocurre por la apoptosis de las células de granulosa y del ovocito. La atresia folicular podría significar una ventaja evolutiva, siendo seleccionados aquellos folículos que contengan ovocitos saludables para que puedan llegar exitosamente a ser ovulados. Esta selección será posible durante un ciclo reproductivo si los folículos son expuestos a FSH en un estadio crítico de desarrollo, como fue mencionado anteriormente.

El tipo celular que evidencia el proceso de apoptosis más claramente es el de las células de granulosa. Sin embargo, en algunas especies como cerdos, pollo y rata, se ha observado la ocurrencia de este proceso en las células de la teca, aunque de forma más tardía [27,28].

Existen diversos factores atretogénicos en ovario y también factores que favorecen la supervivencia celular. Dentro de los primeros podemos mencionar la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), IL-6, andrógenos, TNF- $\alpha$ , FasL, etc [29-31]. Como factores citoprotectores ováricos encontramos el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 (IGF-1) y el Factor de crecimiento transformante tipo  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). También las hormonas esteroideas son factores supresores o estimulantes de la apoptosis dependiendo del tejido en el que actúen. Por ejemplo, los glucocorticoides estimulan la apoptosis en el timo pero no en testículo [32] y, en ovario, los estrógenos inhiben la apoptosis mientras que los andrógenos antagonizan su efecto [33]. Cabe destacar que la relación andrógenos/estrógenos es elevada en fluido folicular de folículos atrésicos [34].

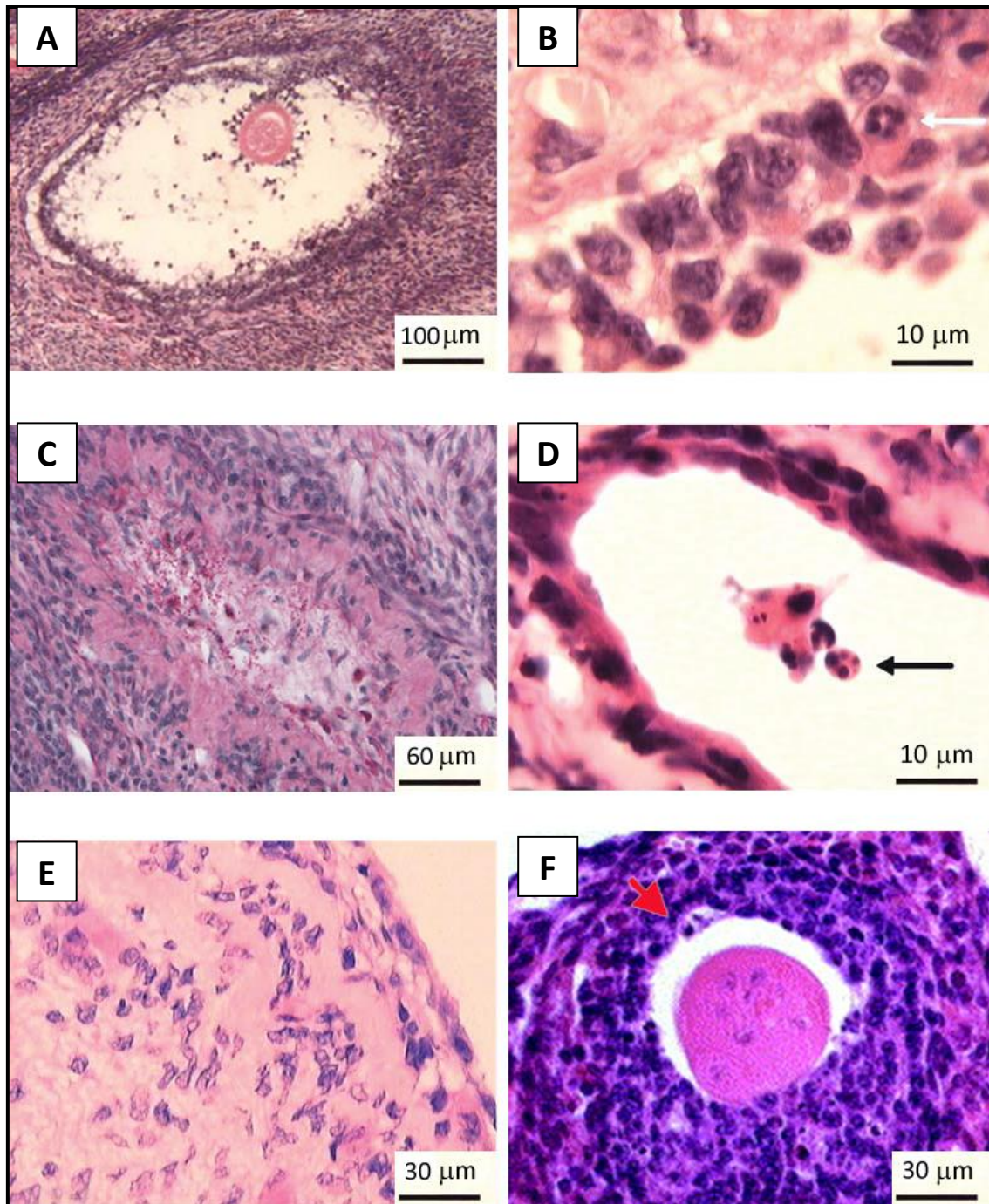
Las gonadotrofinas son consideradas como los principales factores de supervivencia folicular. Se ha demostrado que los folículos atrésicos tempranos son rescatados por la administración exógena de gonadotrofinas [35] y que la administración de FSH en ratas hipofisectomizadas inmaduras disminuye la apoptosis folicular en células de la granulosa [36].

Éstos son solamente algunos ejemplos de los múltiples factores que regulan el proceso de atresia folicular. El destino final de los folículos (crecimiento/ovulación o atresia) depende del delicado balance entre la expresión y acción de factores que promueven la proliferación, el desarrollo y la diferenciación de las células del folículo ovárico y de aquellos que promueven la apoptosis de estas, llevando al folículo a la atresia.

La atresia puede ocurrir en cualquier estadio del desarrollo folicular: es perfectamente posible que un folículo llegue a un estadio antral avanzado y que su desarrollo cese de manera repentina y nunca llegue a la ovulación. Sin embargo, la mayoría de los folículos se tornan atrésicos en la ventana entre los estadios preantral tardío y antral temprano. [12,37]

La apariencia de un folículo atrésico depende de qué grado de madurez había alcanzado dicho folículo cuando comenzó la atresia. También se observan diferencias morfológicas de acuerdo al grado de avance del proceso de atresia, en las que se basan diversos criterios de clasificación propuestos [38-41]. Todos ellos coinciden en que los estadios atrésicos tempranos presentan: células de granulosa con cromatina nuclear condensada (núcleos picnóticos) que se desprenden del folículo, reducción y lisis del citoplasma del ovocito y de la granulosa folicular, y engrosamiento de la membrana basal localizada entre granulosa y teca (membrana vítrea). Las alteraciones subsiguientes incluyen: aparición de numerosos cuerpos apoptóticos, degeneración del ovocito e hipertrofia de la capa tecal. Al avanzar la atresia incluso puede observarse invasión de células fagocíticas en el antro del folículo, que luego son reemplazadas por tejido conectivo laxo. Una de las estructuras más resistentes a la degradación es la zona pelúcida colapsada, que permanece en el centro del folículo formando una masa amorfa acidófila (Fig. 3).





**Figura 3: Microfotografías de folículos en estado atrésico coloreados con hematoxilina-eosina.** A. Folículo atrésico B. Células de granulosa de un folículo atrésico. Nótese la condensación de la cromatina (flecha blanca). C. Folículo en estado de atresia avanzada, con restos de proteínas de la zona pelúcida en la zona central. D. Células de la granulosa desprendidas de un folículo atrésico, se pueden observar cuerpos apoptóticos y núcleos picnóticos (flecha negra). E. Células tecales de un folículo atrésico avanzado, algunas han adquirido característica de tejido conectivo. F. Folículo atrésico, con ovocito en degeneración. Obsérvese la retracción del citoplasma del oocito (flecha roja). Modificado de Pedersen y col. (2003) [42].

## **OVULACIÓN**

A medida que se acerca la mitad del ciclo, hay un ascenso notable de estrógenos por sobre el umbral, el cual estimula, por un mecanismo de retroalimentación positiva, un pico de gonadotrofinas (principalmente de LH y en menor medida de FSH). Junto a circunstancias únicas del microambiente, el pico de LH es el gatillo para que el folículo dominante ovule y origine un cuerpo lúteo en cada ciclo menstrual en humanos (éste no es único en el ciclo estral de roedores y otros mamíferos).

Luego del pico preovulatorio de LH, la síntesis de E2 declina considerablemente, mientras que se produce un aumento notable en la producción de progesterona estimulada por la misma LH [43]. Las células de la granulosa cercanas a la lámina basal, comienzan a soltarse debido a la desaparición de las uniones estrechas (gap) que las mantenían unidas. El único sitio donde estas uniones no se ven alteradas, es en aquellas células que están formando parte de la corona radiata.

También en este proceso existe un componente mecánico dado por el rápido aumento del tamaño folicular, luego del cual el folículo ovárico emerge desde la corteza ovárica. Otro prerequisite para la ruptura folicular es la digestión proteolítica de la pared folicular, y se sabe que se activan colagenasas para la disolución de la membrana basal y el tejido techal asociado a la ovulación. Las prostaglandinas de la serie E y F (PGE y PGF<sub>2α</sub>) son algunos de los componentes involucrados en la degradación de la pared folicular [44].

Luego de la ovulación, el folículo ovárico se transforma en cuerpo lúteo y en este proceso se encuentran involucrados una gran cantidad de genes. Además, el ovocito que estaba detenido en profase I, reanuda la meiosis y es ovulado en el estadio de metafase II.

## LUTEINIZACIÓN

El cuerpo lúteo es un órgano endócrino transitorio formado por las células foliculares remanentes del folículo que ha sido ovulado y su principal función es la secreción de progesterona. Algunas de las principales funciones a nivel fisiológico de esta hormona son la preparación del útero para el período de preñez o embarazo y la regulación de las contracciones del oviducto para el transporte del óvulo al útero. Por lo tanto, la formación del cuerpo lúteo en mamíferos es un evento esencial para la supervivencia e implantación del embrión. Este proceso se inicia mediante numerosos cambios bioquímicos y morfológicos que sufren las células de la teca interna y las células de la granulosa de los folículos preovulatorios. Estos cambios que determinan el proceso de *luteinización*, se producen como consecuencia del incremento en los niveles séricos de LH (Hormona Luteinizante), asociado al pico preovulatorio de esta hormona.

No todas las células se diferencian sincrónicamente luego de la ovulación. Es decir que las células del cuerpo lúteo derivan de los dos tipos de células foliculares secretoras de esteroides, de la granulosa y tecales. Por lo tanto, en primates, esta glándula consiste en al menos, dos tipos de *células luteales*: las *células granulosa-luteínicas* y las *células teca-luteínicas* (llamadas grandes o pequeñas en roedores). Las primeras derivan de la granulosa y contienen todos los elementos de las células secretoras de esteroides como numerosas mitocondrias y abundante retículo endoplasmático liso. Por el contrario, las células teca-luteínicas o pequeñas provienen de la teca y tienen moderada cantidad de mitocondrias, pero abundante retículo endoplasmático liso. Ambos tipos celulares constituyen el 50 % del cuerpo lúteo, ya que éste contiene además abundantes elementos del tejido conectivo.

El establecimiento de un cuerpo lúteo funcional, en los días siguientes a la ovulación, implica cambios morfológicos como los que ya hemos descripto, y además una rápida vascularización de las capas celulares que se originan de la granulosa y de

la teca, fenómeno inducido probablemente por la ruptura de la membrana basal que separa a los dos tipos celulares. Estudios recientes, han demostrado que el factor VEGF cumple un rol importante en el desarrollo y mantenimiento de un cuerpo lúteo funcional [45].

El control de la secreción de progesterona en roedores es llevado a cabo por las hormonas LH, prolactina (ambas luteotróficas) y la sustancia luteolítica, prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ). En la mujer, son la LH y la hCG (durante el embarazo) las principales hormonas reguladoras del cuerpo lúteo. En ausencia de embarazo o preñez al final de cada ciclo ovárico, o cuando ya no es requerido para el mantenimiento de la placenta, el cuerpo lúteo deja de producir progesterona y regresa en un proceso denominado “luteólisis”. Se ha demostrado que la apoptosis y la autofagia están involucradas en este proceso [46-48].

## **CICLO OVÁRICO EN ROEDORES**

Tanto el ratón como la rata de laboratorio son mamíferos no estacionales, de ovulación espontánea y poliéstricos. Es decir, el ciclo ovárico ocurre durante todo el año y la ovulación no depende del estímulo de la cópula. Por dichas características, sumadas a su fácil reproducción y mantenimiento en el bioterio, podemos afirmar que representan un modelo excelente para el estudio de la fisiología ovárica gonadal.

El término *estro* fue utilizado por primera vez por Heape en el año 1900 para describir el período durante el cual la hembra está dispuesta a recibir al macho en coito fecundante. El período anterior al *estro*, lo denominó *proestro* y se caracteriza por el momento en el cual el animal entra en celo. En ausencia de concepción, el *estro* es seguido por el *metaestro*, también conocido como *diestro I*. El período siguiente, *diestro II*, constituye el tiempo durante el cual la secreción ovárica prepara a los tejidos

reproductivos para la recepción del óvulo fertilizado luego del coito en el estro y su duración es variable entre especies.

En los roedores, el ciclo estral completo (proestro, estro, metaestro y diestro) dura de 4 a 6 días con un estro (o celo) de aproximadamente 8-15 horas. Si la fertilización no ocurre, el animal vuelve al período de proestro y un nuevo ciclo se inicia. Durante el estro, las hembras están receptivas para la cópula. Otro rasgo particular de los roedores es la capacidad de entrar en estro dentro de las 24 horas posteriores al parto. Este fenómeno se conoce como estro post-parto y permite a la hembra quedar preñada inmediatamente, aumentando su alta prolificidad.

## **APOPTOSIS**

El ovario es un órgano en el que fisiológicamente hay una gran cantidad de muerte celular, proceso que ocurre mayormente por apoptosis. La apoptosis consiste en una serie de eventos ordenados que ocurren en tejidos que sufren cambios como consecuencia de su desarrollo o debido a respuestas frente a estímulos fisiológicos alterados. Este suicidio celular ocurre en células con niveles anormales de ATP, requiere síntesis de ARNm y proteínas, afecta a células individuales, involucra pérdida de tamaño celular, condensación de la cromatina y la formación de cuerpos apoptóticos que consisten en fragmentos nucleares o de organelas rodeados de membrana plasmática. Estos cuerpos apoptóticos son eliminados por fagocitosis y de esta forma no se liberan los componentes citoplasmáticos al medio extracelular, impidiéndose un proceso inflamatorio.

En este proceso de muerte celular, intervienen una serie de proteasas que están presentes en la mayoría de los tipos celulares en forma de zimógenos, las caspasas. Las caspasas son cisteín- proteasas que clivan en residuos de aspartato y pueden tener cientos de sustratos celulares [49]. Han sido descritos dos mecanismos

de activación de las caspasas. Uno de ellos se dispara al activarse los llamados “receptores de muerte”, que están situados en la superficie celular [50]. El otro es provocado por diversas formas de estrés, como ser una inadecuada provisión de citoquinas o daño intracelular, e involucra principalmente a la mitocondria. Durante el estrés, la decisión de la célula de provocar o no su suicidio, depende principalmente de las proteínas de familia de BCL-2. Los miembros de esta familia, con funciones contrapuestas, pro o anti apoptóticas, integran señales que reciben de otras células y censan el daño intracelular para determinar si disparan la activación de las caspasas [51]. La caspasa-3 es la principal caspasa efectora [52].

### **Apoptosis como mecanismo de atresia folicular**

Durante el desarrollo del ovario ocurren tres procesos relacionados con la apoptosis: degeneración de la ovogonia y del ovocito, luteólisis y atresia folicular.

Estudios *in vivo* demuestran que la degeneración de la ovogonia y de ovocitos fetales de ratón está dada por apoptosis [53]. También, se confirmó por estudios de microscopía electrónica que cultivos de células germinales primordiales de ratón en ausencia de factores tróficos mostraban rasgos morfológicos característicos de la apoptosis [54]. Asimismo, varios trabajos han demostrado que la degeneración del cuerpo lúteo está dada por apoptosis [55,56]. Se encontró fragmentación del DNA en folículos atrésicos, pero no en los saludables, confirmando el rol de la apoptosis en la atresia folicular [28]. Similares estudios mostraron la presencia de actividad de endonucleasa en ovarios de ratas tratadas con gonadotrofina de suero de yegua preñada (PMSG) y hCG; indicando que la atresia dada por apoptosis involucra la activación de endonucleasa [57]. Recientemente, se han caracterizado a las células de granulosa como la primera población celular que entra en apoptosis en folículos atrésicos, antes

que las células tecales o los oocitos, lo que sugiere que serían las responsables de iniciar la atresia folicular [58].

## **ANGIOGÉNESIS**

Los procesos mediante los cuales se forman los vasos sanguíneos pueden dividirse en dos: vasculogénesis y angiogénesis. La vasculogénesis ocurre durante el desarrollo embrionario y consiste en la diferenciación de células precursoras en células endoteliales [59]. La angiogénesis es el proceso por el cual se forman vasos sanguíneos nuevos a partir de vasculatura preexistente [60]. Esta vasculatura es modificada mediante el brote y el crecimiento de nuevos vasos para formar finalmente patrones de vasos interconectados característicos de los vasos sanguíneos maduros. La vasculatura previamente formada, debe primero desestabilizarse para permitir la formación de nuevos vasos sanguíneos que irrigen tejidos previamente avasculares. Luego, las células endoteliales proliferan y forman estructuras tubulares inmaduras que terminan siendo redes vasculares interconectadas. Esta vasculatura nueva debe madurar para ser completamente funcional. Durante este proceso, las nuevas células endoteliales se integran y se unen fuertemente a células de soporte (células peri-endoteliales), como pericitos y células musculares lisas, y a la matriz que rodea el vaso [61]. El desenlace de este proceso en una elaborada red vascular permite cubrir las demandas nutricionales y funcionales de su respectivo órgano [62].

La angiogénesis ha sido ampliamente estudiada en condiciones patológicas, principalmente debido a que está aumentada en cáncer y otras enfermedades [63]. En el adulto, la angiogénesis es infrecuente en condiciones fisiológicas y el endotelio de la mayoría de los tejidos es una población estable y de baja tasa mitótica [64]. Se observa angiogénesis principalmente en procesos de reparación de tejidos, como cicatrización de heridas y fracturas. Diversas patologías se asocian tanto a una excesiva tasa

mitogénica de las células endoteliales (crecimiento tumoral, retinopatías, hemangiomas, artritis reumatoidea, fibrosis, etc.) [64,65], como a una disminución en la angiogénesis normal (retraso en cicatrización de heridas, úlceras varicosas crónicas, falta de cicatrización de fracturas) [65].

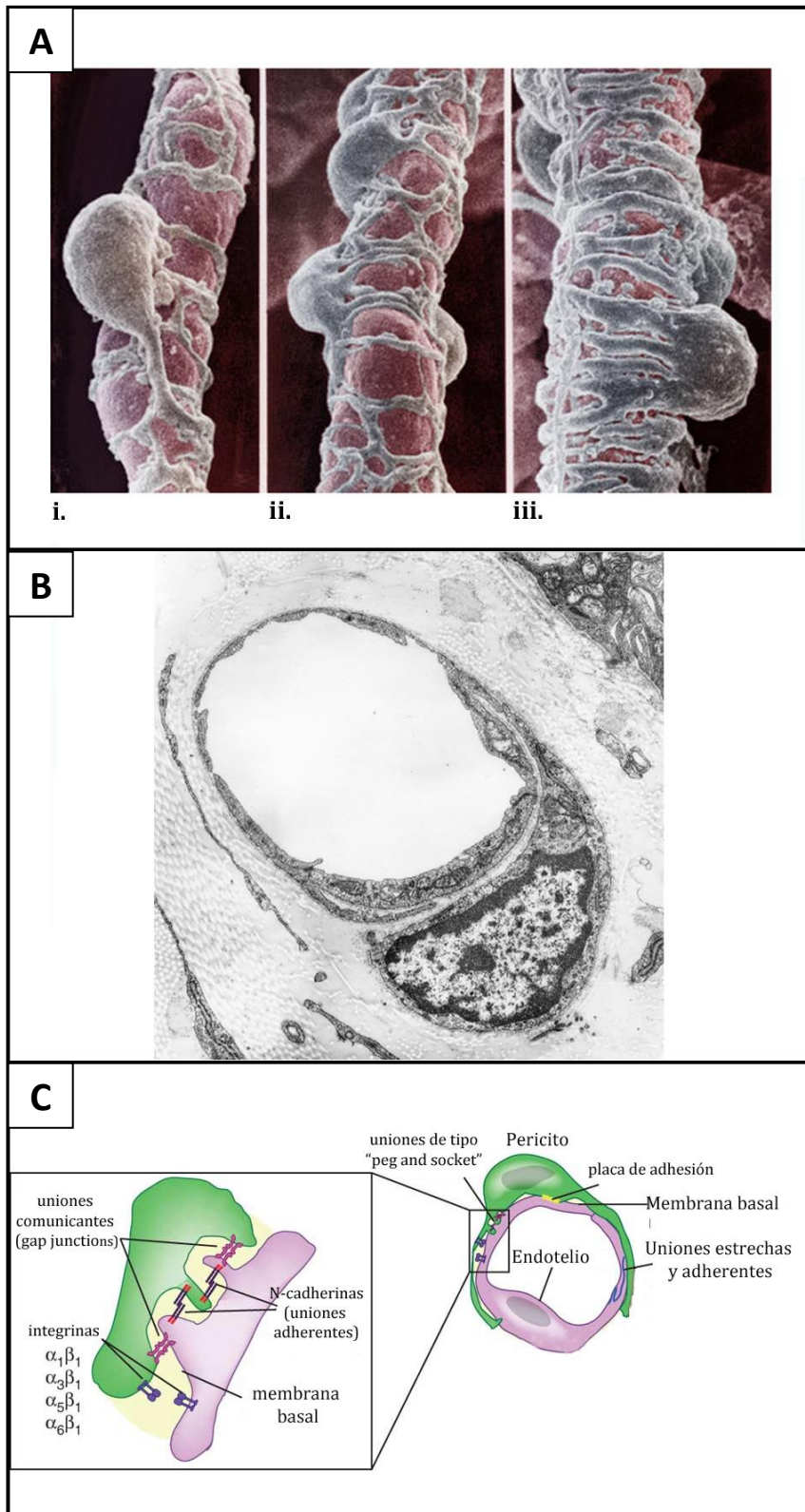
Sin embargo, se observa una angiogénesis fisiológica activa **en el tracto reproductor femenino**, como por ejemplo en la placenta, la implantación y los cambios cíclicos que ocurren en ovario y endometrio [66]. Los tejidos del sistema reproductor femenino adulto presentan una alta tasa mitogénica sólo comparable al crecimiento tumoral [67]. Sin embargo, a diferencia de los procesos tumorales, el crecimiento de estos tejidos ocurre en forma limitada y altamente ordenada. Esta alta tasa de crecimiento es sostenida por el rápido desarrollo de una red vascular de modo que los tejidos con mayor grado de desarrollo se caracterizan por estar altamente irrigados [67].

Las células peri-endoteliales, que incluyen células de músculo liso vasculares (VSMC) y pericitos, residen en la interfase entre el endotelio y el tejido circundante, lo que les da una posición estratégica para ser activos participantes del proceso angiogénico. Las VSMCs proveen soporte a vasos de gran calibre, como las arteriolas, y regulan el flujo sanguíneo a través de su actividad contráctil, a pesar de no estar en contacto directo con el endotelio. Por su parte, los pericitos son células perivasculares que se asocian a las células endoteliales de la vasculatura. Estructuralmente, son células individuales distribuidas a lo largo de los vasos capilares que se caracterizan por tener un cuerpo celular que se inserta en la membrana basal y que protruye por sobre la pared del capilar [68]. Éstas células se contactan con el endotelio a través de zonas en las que la membrana basal está interrumpida y que son ricas en uniones comunicantes, uniones estrechas y zónulas adherentes [62]. También puede haber interdigitaciones entre células endoteliales y pericitos, tal que una célula puede formar una extensión citoplasmática dentro de la otra. Este tipo de uniones se denominan complejos “*peg and socket*” (Fig. 4).



Se han propuesto diversas funciones para las células peri-endoteliales. Por ejemplo, pueden sensor los requerimientos fisiológicos del tejido, la presencia de estímulos angiogénicos y las fuerzas hemodinámicas dentro del vaso; pueden controlar de manera parácrina o por contacto célula-célula la proliferación y diferenciación del endotelio; y por último, al contactar numerosas células endoteliales en simultáneo, pueden integrar señales a lo largo del vaso sanguíneo [69].

**Página siguiente - Figura 4: Interacción entre endotelio y células peri-endoteliales.** A. Fotografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido y posteriormente coloreadas digitalmente. i. Pericito rodeando un capilar. Pueden observarse los procesos primarios en dirección longitudinal y los procesos secundarios orientados de forma circunferencial. ii. Capilar arterial con numerosos pericitos asociados. iii. Arteriola terminal rodeada por pericitos y algunas células de músculo liso vasculares. B. Micrografía electrónica de un capilar fenestrado y su pericito en corte transversal. Obsérvese que las células endoteliales del capilar y el pericito comparten la misma lámina basal. Tomado de Sato y col. [70] C. Esquema de los complejos de unión entre pericitos y células endoteliales. Adaptado de Winkler y col. [71].



Las VSMCs pueden cumplir funciones tanto contráctiles como sintéticas, las cuales están caracterizadas por cambios en la morfología, proliferación y migración celular. Debido a la plasticidad de las VSMCs, los vasos sanguíneos adquieren la flexibilidad necesaria para llevar a cabo eficientemente sus funciones, tanto en situaciones fisiológicas como patológicas. Sus múltiples procesos citoplasmáticos, sus distintivos elementos del citoesqueleto y su recubrimiento del endotelio vascular los convierte en estabilizadores de las paredes vasculares, controlando así el crecimiento angiogénico.

Hasta el momento, se conocen varios marcadores de células endoteliales, como PECAM, Factor de Von Willenbrand (VW) y CD34. También se han hallado marcadores de células peri-endoteliales, como  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), desmina y antígeno de melanoma de alto peso molecular (RGS-5). Cabe resaltar que ninguno de estos marcadores es “universal”, ya que su expresión varía dependiendo de la especie, del tipo de tejido y del estado de desarrollo [72].

## **FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS (PDGF)**

### **ESTRUCTURA DEL PDGF**

PDGF juega un papel crítico en la proliferación y desarrollo celular [73-75]. Fue aislado por primera vez a partir de plaquetas [76] durante la degranulación, y se sabe hoy en día que también es producto de un amplio rango de tipos celulares dentro de los cuales se incluyen fibroblastos, músculo, hueso/cartílago, y células del tejido conectivo [77]. La forma biológicamente activa de PDGF es un dímero formado por dos cadenas polipeptídicas, unidas por puentes disulfuro [78]. Puede estar presente como homodímero o como heterodímero y dependiendo del tipo de dímero formado muestra actividad diferencial. PDGF es el producto de cuatro diferentes genes que son ensamblados en cinco isoformas distintas conocidas como: AA, AB, BB, CC y DD, siendo

las cadenas C y D las más recientemente identificadas (Figura 5) [78-80]. La principal característica de estas dos nuevas cadenas es la presencia de un dominio CUB, localizado en el extremo N-terminal que le confiere latencia o inactividad a PDGF y es necesario que sea clivado antes que PDGF se una al receptor y éste último sea biológicamente activo [80,81].

Las isoformas de PDGF más conocidas son el producto de asociaciones de las cadenas A y B con aproximadamente 100 residuos de aminoácidos cada una, de los cuales el 60% son conservados entre sí. Antes de ser secretadas de la célula, las cadenas A y B deben sufrir modificaciones en sus secuencias de aminoácidos [82].

Mientras que las cadenas A son clivadas una única vez en el complejo de Golgi para generar, predominantemente, el producto secretado PDGF-A de 30 kDa, se han reportado como mínimo tres formas distintas de PDGF-B [83]. Pro-PDGF-B es sintetizado como un monómero de 31 kDa, que rápidamente dimeriza en el retículo endoplasmático a través de puentes disulfuro. De esta forma, se origina un proPDGF-BB de 56 a 60 kDa que transita hacia el complejo de Golgi, donde es procesado proteolíticamente y así se produce un intermediario de 40 kDa. Este intermediario es el que se cliva por una segunda vez, lo que da como resultado el producto final de 27 kDa. El mismo sufre glicosilaciones y es remodelado hasta convertirse en la forma madura de 32 kDa.

## **ESTRUCTURA DEL RECEPTOR DE PDGF (PDGFR)**

PDGFR es también un dímero que puede formarse de la combinación de las cadenas llamadas alpha ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ) en cualquier orden ( $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$ ,  $\beta\beta$ ) (Fig. 5). El receptor dimérico se forma solamente luego de la unión del ligando y se une con distinta afinidad a las diferentes isoformas de PDGF. Los estudios de rayos X sobre la estructura de PDGFR muestran que es una proteína con tres dominios: uno extracelular, uno

transmembranal y uno citosólico. En secuencias específicas del dominio citosólico recae la actividad tirosina kinasa del receptor [84,85]. En esta porción intracelular del receptor se encuentra un loop que se une mediante puentes de hidrógeno al sitio catalítico y que es desplazado causando un cambio conformacional en la proteína como evento posterior de la unión del ligando al receptor.

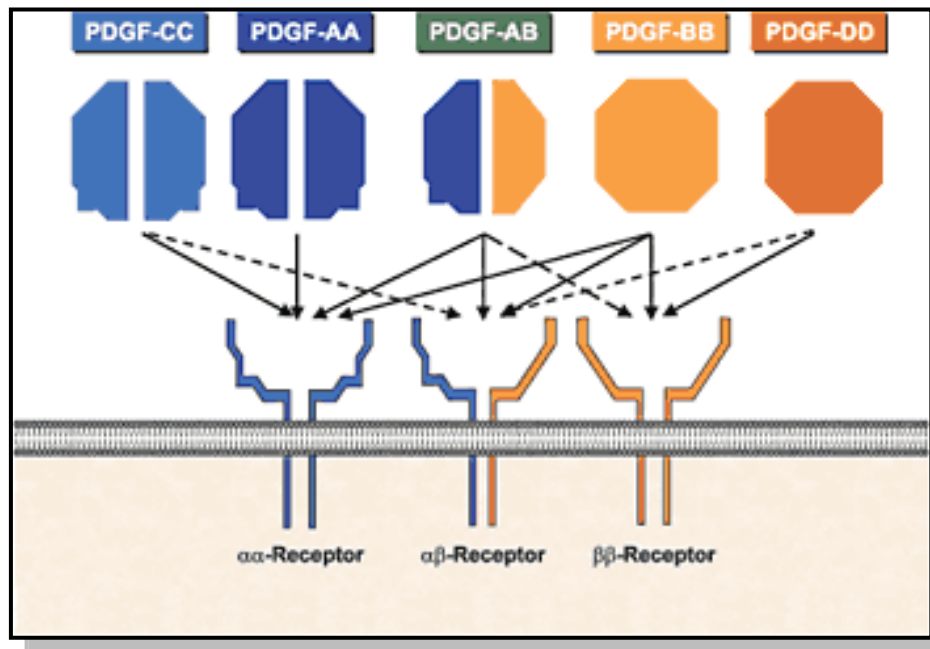


Figura 5: Ligandos y receptores del sistema de PDGF y sus interacciones.

## ACTIVACIÓN DE PDGFR

En el proceso de activación del receptor, la isoforma correspondiente de PDGF se une de manera específica a dos monómeros en la membrana plasmática, cercanos uno del otro atrayéndolos y provocando su dimerización. Como consecuencia, el loop que obstruye el sitio catalítico del dominio kinasa es desplazado y causa de la autofosforilación de estos residuos de tirosina [86,87]. Dicho cambio conformacional

provoca la creación de sitios “*docking*” para proteínas involucradas con la transducción de señales, que conducen a la expresión de genes y a la síntesis de proteínas.

## VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ASOCIADAS A PDGF

Debido a las diferencias en cantidad de expresión de PDGFR y a la variabilidad en isoformas de PDGF que se pueden unir a los receptores, los diferentes tipos celulares pueden mostrar un rango amplio de posibilidades para desencadenar respuestas biológicas diversas. Esto se refleja en numerosos sistemas experimentales en donde las diferentes isoformas de PDGF producen diferentes resultados: Se sabe que las células musculares lisas y los fibroblastos expresan ambos tipos de receptor,  $\alpha$  y  $\beta$ . Sobre CML, PDGF-A inicia hipertrofia celular, mientras que PDGF-B induce hiperplasia [88]. Sobre fibroblastos, la isoforma PDGF-B inicia quimiotaxis, mientras que PDGF-A la inhibe [89]. Sobre neuronas dopaminérgicas, PDGF-A promueve el desarrollo de la fibra neuronal embrionaria, mientras que la isoforma -BB sirve sólo como un factor de mantenimiento de la supervivencia [90]. Es así que, claramente se ve que la interpretación de cualquier estudio experimental depende del tipo celular empleado y de la isoforma de PDGF aplicada [91]. En general se puede decir que las isoformas de PDGF son mitógenos potentes para las células del tejido conectivo, incluyendo fibroblastos cutáneos, células arteriales del músculo liso, condrocitos y algunas células epiteliales y endoteliales [92-94]. Además de su actividad mitogénica, PDGF es quimiotáctico para fibroblastos y células musculares lisas [89,93]. Otras actividades reportadas para PDGF incluyen: la estimulación de la liberación de granulocitos por neutrófilos y monocitos [95] e inducción transitoria de secreción de IL-2 por células T [96]. También se ha demostrado que PDGF juega un papel en el sistema nervioso central, particularmente en la supervivencia y regeneración neuronal y en la mediación de la proliferación de células gliales, diferenciación y migración [90,97]. Estas

respuestas son el producto de la amplificación de señales a través de cascadas intracelulares en las cuales intervienen diversas proteínas. Como ya se mencionó, la mayor parte de las fosforilaciones de tirosinas dentro de los receptores de PDGF culmina en la creación de sitios para el “*docking*” de numerosas proteínas, que a su vez son fosforiladas al asociarse a los receptores [86]. Estas proteínas incluyen: enzimas (como por ejemplo, PI3-kinasa, fosfolipasa C $\gamma$ 1, SHP-2, RasGAP y kinasas de la familia Src); proteínas adaptadoras que conectan al receptor con proteínas de señalización río abajo (como Grb2, Grb7, Shc, Shb, Nck, or Crk) o bien con factores de transcripción (entre ellos, los miembros de la familia STAT). No está claro aún si PDGFR es el único responsable de la fosforilación sobre sus propias tirosinas y sobre sus sustratos.

El ensamblaje del complejo de receptores de PDGF da comienzo a diversas vías de señalización. Algunas de ellas son redundantes y convergen en el mismo efecto celular. Por ejemplo, la quimiotaxis puede ser promovida por PI3-K via Rac y diferentes isoformas de PKC [87], así como por Grb2/Sos1/Ras via p38 y posiblemente Rac. Hay evidencias de “cross-talk” entre estas vías, ya que Ras y PI3-K son capaces de interactuar y activarse uno al otro [98]. La activación de esfingosina kinasa y de PKC dependiente de PLC $\gamma$  también es importante para la respuesta quimiotáctica.

Otras respuestas inducidas por la activación de PDGFR incluyen: proliferación, diferenciación y protección de la apoptosis; también flujos rápidos de Ca<sup>2+</sup> y rearreglos a nivel del citoesqueleto [86]. Es necesario aclarar que los homodímeros  $\alpha\alpha$  y  $\beta\beta$  del receptor de PDGF desencadenan respuestas celulares distintas, aunque parcialmente superpuestas, debido a sus diferencias en la capacidad de unir proteínas de señalización [91]. Se cree que el heterodímero  $\alpha/\beta$  tiene propiedades particulares en cuanto a la señalización porque presenta el patrón de fosforilación de ambas subunidades [99,100].

La información conocida hasta el momento permite afirmar que las señales producidas por el complejo de PDGFR son producto de la interacción de diversos

factores. Tanto las condiciones intracelulares como las extracelulares contribuyen a la activación selectiva de algunas vías y a la supresión de otras. Algunos de los factores más relevantes en esta regulación son: la influencia de las interacciones con la matrix extracelular, especialmente a través de integrinas [101]; el efecto de las especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares [102]; y la preponderancia de ciertas vías según la etapa del ciclo celular [103].

## **ROL DE PDGF EN ANGIOGÉNESIS**

PDGF cumple un papel vital en la angiogénesis: la señalización via PDGFR- $\beta$  es crítica para el reclutamiento de *pericitos*. Durante la remodelación angiogénica, PDGF-B es expresado por las células endoteliales ubicadas los ápices de los vasos sanguíneos nacientes, lo cual conduce a la proliferación de pericitos y células de músculo liso vasculares que expresen PDGFR $\beta$  (Fig. 6). PDGF-B determina también la migración y/o la supervivencia de estas células peri-endoteliales a lo largo del endotelio incipiente. Una vez que llegaron a destino, los pericitos y células de músculo liso vasculares rodean al endotelio y se asocian estrechamente con él. Los factores de supervivencia y anti-proliferativos producidos por las células peri-endoteliales estabilizan los vasos nacientes [73-75,104].

El rol de PDGF es de gran relevancia porque la gran mayoría de los vasos sanguíneos, sino todos, comienzan como tubos endoteliales que luego adquieren un recubrimiento de pericitos o células de músculo liso vasculares. Está demostrado que el reclutamiento de células peri-endoteliales es vital para una completa funcionalidad del vaso sanguíneo, y tanto PDGF-B como PDGFR $\beta$  son indispensables [105-107]. La ablación genética de PDGF-B o PDGFR $\beta$  en roedores conduce a fenotipos casi idénticos: letalidad perinatal causada por un “filtrado” microvascular generalizado y hemorragias [73,108]. La causa de la disfunción microvascular en estos animales es el déficit severo



de pericitos [109]. La falla no está en la inducción de los pericitos, sino en la subsiguiente expansión y dispersión. De esta manera, podría afirmarse que el bloqueo de la señalización entre PDGF-B y PDGFR $\beta$  genera una deficiente proliferación de pericitos e impide la adecuada migración de estas células a lo largo de nuevos vasos sanguíneos [107].

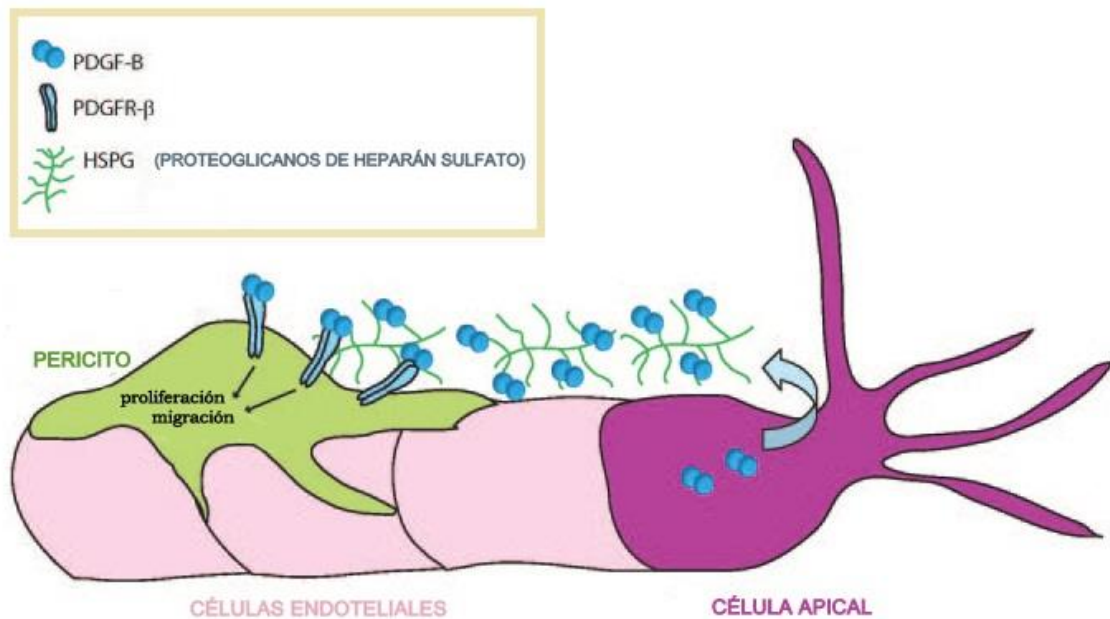


Figura 6: Proliferación, supervivencia y migración de células vasculares peri-endoteliales por acción de PDGF-B. Adaptada de Hoch y col. (2003) [104].

## ESFINGOSINA-1-FOSFATO (S1P)

El esfingolípido S1P es un derivado de la ceramida que actúa a través de cinco receptores acoplados a proteína G (denominados S1P1-5) [110], induciendo distintas respuestas celulares como la regulación de la proliferación, el crecimiento, la supervivencia y la migración celular, la inflamación, la angiogénesis, la vasculogénesis y la resistencia a la apoptosis [111]. La diversidad de las funciones de S1P reside en los

repertorios de receptores disponibles, combinado con patrones de expresión de receptores específicos para cada tipo celular y para cada tejido.

S1P se forma por la fosforilación de la esfingosina por acción de las esfingosina kinasas (SK1 y SK2) y puede ser desfosforilada para regenerar esfingosina por la esfingosina fosfato fosfatasa (SPPasa) o ser escindida por la S1P liasa de forma irreversible. Gracias a su estructura simple de una única cadena y a su grupo fosfato, es uno de los esfingolípidos más solubles, lo que permite que pueda moverse fácilmente entre membranas equilibrándose rápidamente su concentración. En plasma, S1P se encuentra presente a una concentración de  $10^{-7}$  mol/L aproximadamente, principalmente unida a proteínas plasmáticas como la albúmina [112]. En las células se encuentra en concentraciones bajas, del orden nanomolar, lo que permite que modificaciones en su concentración sirvan de señalización para activar distintos procesos, como ocurre con otros segundos mensajeros [113].

Las células endoteliales y peri-endoteliales tienen distintos patrones de expresión de receptores de S1P. Varios trabajos han demostrado que las células endoteliales expresan mayormente S1P1 y S1P3, mientras que S1P2 parece estar reservado para solo cierto tipo de lechos vasculares [114,115]. Además, está reportado que S1P estimula la proliferación, supervivencia, migración y formación de túbulos en células endoteliales *in vitro*, lo que indica que posee una alta actividad angiogénica. [115-117]. S1P también mantiene estable la barrera endotelial a través de su receptor S1P1 [118].

Además de su acción sobre el endotelio, S1P está involucrado en la regulación de la angiogénesis y del reclutamiento de células peri-endoteliales en el adulto (Fig. 7). Estas acciones las induce a través de su receptor S1P1 y, en menor medida, S1P3 [119]. Se ha observado que la ablación del gen para S1P1 en ratón, bloquea el reclutamiento de pericitos y VSMCs hacia los vasos sanguíneos, impidiendo su maduración y estabilización [120]. Sumado a eso, Hla y col. han demostrado que el receptor S1P1 en

las células endoteliales dirige el transporte de la molécula de adhesión N-cadherina hacia los sitios de contacto entre células endoteliales y VSMCs, lo cual fortalece el contacto célula-célula dependiente de N-cadherina a través de la vía de señalización Gi-Rac [121].

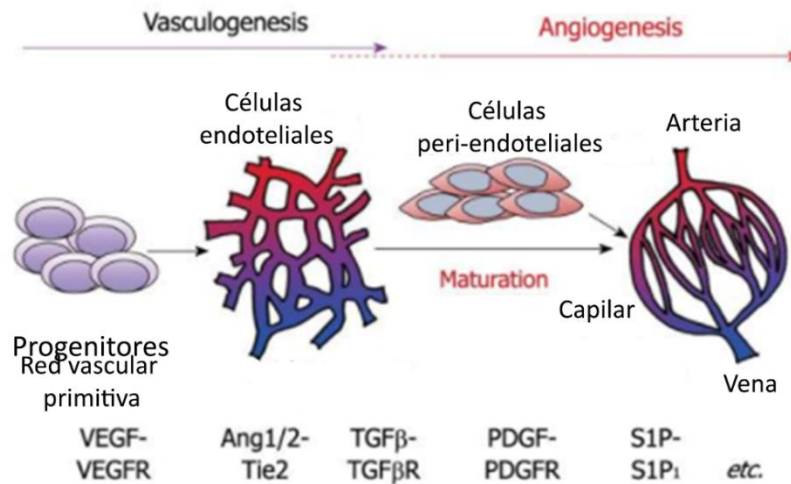


Fig. 7: Esquemización de la formación de vasos sanguíneos y los principales factores involucrados.

## ANGIOGÉNESIS FISIOLÓGICA EN EL OVARIO

Se sabe que el ovario es uno de los pocos órganos en el adulto en donde ocurre una intensa angiogénesis fisiológica y se observa además un aumento en la permeabilidad vascular durante el desarrollo folicular, la ovulación y la posterior formación del cuerpo lúteo. La angiogénesis se encuentra regulada independientemente en cada uno de los folículos individuales y, dependiendo de la extensión del plexo vascular y de la permeabilidad de sus vasos, se puede controlar el suministro de factores tróficos de alto peso molecular, precursores y lípidos. Esto indicaría que los vasos sanguíneos foliculares estarían directamente involucrados en los procesos de selección, dominancia y atresia [122].

En el ovario, el aporte vascular se produce en forma cíclica. Los folículos primordiales no poseen una red capilar propia y dependen de los vasos sanguíneos provenientes del estroma. Los folículos primarios desarrollan un aporte vascular inicial que consiste en una o dos arteriolas que luego irán aumentando a medida que el folículo continúa creciendo. Poco después de la aparición del antro, el folículo adquiere una corona vascular en la capa de células tecales, que cuando está completamente establecida, consiste en dos redes concéntricas en la teca interna y externa respectivamente. Los capilares no penetran la membrana basal y, por lo tanto, la capa de células de granulosa se mantiene avascular [123]. La selección del folículo dominante dependería de la formación de estas redes vasculares y del aumento de la permeabilidad capilar [66].

A pesar de que la angiogénesis ocurre en la capa de células de la teca, las células de la granulosa juegan un papel muy importante en este proceso, ya que sintetizan y secretan diversos factores angiogénicos que actúan luego en forma parácrina en las células endoteliales del compartimento tecal. Estos factores producidos por las células de granulosa controlan el desarrollo y crecimiento de la vasculatura folicular [124]. El aumento de la vasculatura del folículo lleva a un suministro preferencial de gonadotrofinas y, por lo tanto, jugaría un rol en la selección del folículo dominante [23]. Por otro lado, la degeneración del lecho capilar es un factor relevante causante de atresia en folículos que no logran desarrollarse correctamente.

## **TRANSPORTE DE COLESTEROL EN EL OVARIO**

Las lipoproteínas transportan numerosos tipos de lípidos (por ejemplo: colesterol, hormonas esteroideas y vitamina E) entre distintos tejidos del organismo y de esa manera, ya sea directa o indirectamente, cumplen roles esenciales en la fertilidad [125,126]. Las alteraciones en el metabolismo de lipoproteínas y su influencia

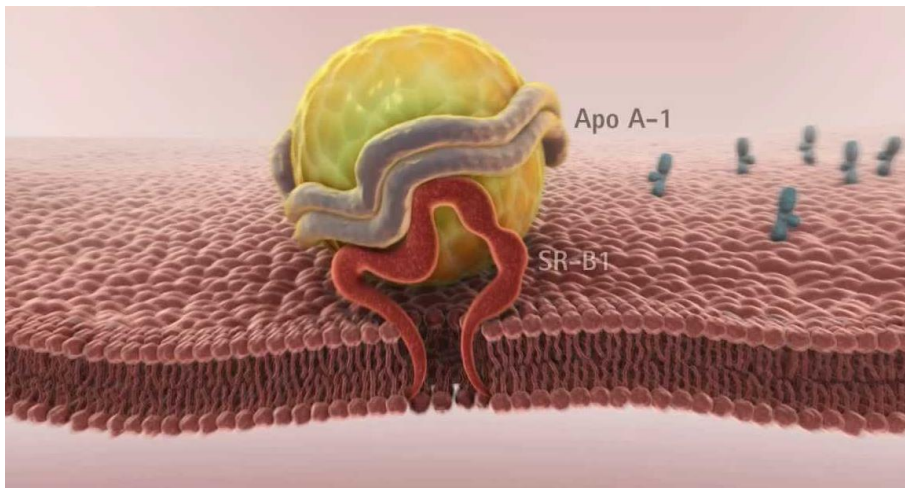
sobre la fertilidad femenina es un campo que no ha sido aún estudiado en profundidad. No obstante, existen varios reportes que indican que las lipoproteínas, en especial las lipoproteínas de alta densidad (HDL, en inglés), tienen un rol potencial en la infertilidad femenina [127,128].

Las HDL son las únicas lipoproteínas detectadas en niveles significativos en FF, probablemente debido a que la porosidad de la membrana basal entre granulosa y teca sólo permite el paso de proteínas séricas de hasta 300 kDa, característica que ocurre también en muchas otras especies. [125,129,130]. Las HDL pueden transportar nutrientes críticos a las células foliculares y a los ovocitos para la síntesis de membranas, la producción local de hormonas esteroideas y para la maduración ovocitaria, así como también participar del eflujo de lípidos desde las células ováricas y ovocitos, manteniendo el balance celular de colesterol [131,132]. En consecuencia, las anomalías en el metabolismo de HDL-colesterol, ya sea que afecten su abundancia, estructura o funcionalidad, podrían comprometer la fertilidad femenina.

Las partículas de HDL están compuestas por una bicapa lipídica y un centro (“core”) hidrofóbico, sumado a componentes proteicos que incluyen apolipoproteínas y enzimas lipolíticas y antioxidantes (Fig. 8) [133]. A diferencia de HDL séricas, las HDL de FF son: pobres en colesterol, tienen mayores cantidades de fosfolípidos y sus principales componentes proteicos son las apolipoproteínas A-I y A-IV (ApoA-I y apoA-IV, respectivamente)[134,135]. Cabe destacar que, si bien las partículas HDL-colesterol han sido reconocidas clásicamente como las responsables de proveer colesterol a los folículos ováricos como sustrato para la síntesis de esteroides *de novo*, [125,135,136] en los últimos años se les han atribuido propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y citoprotectoras [137,138]. También se han reportado que las HDL de FF humano presentan funciones angiogénicas y son un potente mitógeno para células endoteliales [134], y que además podrían estar involucradas en la capacitación espermática [139].

El receptor scavenger de clase B tipo 1 (SR-BI) es un receptor de HDL fisiológicamente relevante en un gran número de tejidos, incluyendo las células foliculares y luteales [140,141], las células endoteliales [142,143], las VSMCs [144] y los macrófagos [145]. Se ha encontrado que los tejidos con niveles de expresión más altos de SR-BI son el ovario, la glándula adrenal, el bazo y la placenta [146-148].

Aunque las hembras knock-out para SR-BI presentan ciclos estrales normales y ovulación normal, resulta interesante que varios reportes describen diversas anomalías en el sistema reproductivo. Por ejemplo, las hembras KO para SR-BI presentan HDLs anormales, ovocitos disfuncionales e infertilidad [149,150].



**Figura 8:** Esquema de una partícula de HDL cargada de colesterol, con ApoA-I como apolipoproteína principal. La partícula está en contacto con una molécula del receptor SR-BI localizada en la membrana plasmática celular.

## **PATOLOGIAS ASOCIADAS A DISFUNCIÓN OVÁRICA**

### **SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA (OHSS)**

Es una complicación iatrogénica severa del crecimiento y maduración folicular ocasionada por la inducción de la ovulación en tratamientos de fertilización asistida en los cuales se realiza estimulación ovárica con altas dosis de gonadotrofinas. Afecta entre el 5 y 10% de las pacientes que se encuentran bajo tratamientos de fertilización asistida [151,152].

El síndrome se conoce desde 1943 cuando se utilizaban, para la estimulación o inducción de la ovulación, preparados de gonadotrofinas de suero de yegua preñada, preparaciones hipofisarias de oveja o gonadotrofinas coriónica humana de origen urinario. El primer caso fatal de OHSS fue descrito en 1951 por Gotzsche con oliguria y falla renal llevando a la paciente a la muerte [153].

En los tratamientos de fertilización asistida, el éxito depende en gran medida de los protocolos de estimulación ovárica empleados, con los que se pretenden obtener ovocitos que puedan derivar en embriones de buena calidad, con capacidad de implantación y, de esa forma, generar un embarazo evolutivo. La estimulación ovárica se realiza con gonadotrofinas (generalmente FSH recombinante), seguida de la administración de hCG para inducir la ovulación y permitir el soporte de la fase lútea. La hCG tiene estructura y actividad biológica similar a LH, pero con mayor vida media, que resulta en un efecto luteotrófico sostenido y por lo tanto en el desarrollo de múltiples cuerpos lúteos funcionales. A su vez, OHSS no solamente puede ocurrir durante la fase lútea, sino también durante la primer parte del embarazo a causa de la hCG endógena [154].

## **Rasgos clínicos de OHSS**

En la forma inicial de OHSS ocurre aumento del tamaño de los ovarios acompañado por malestar abdominal. En casos más avanzados, los ovarios se vuelven quísticos y esto puede resultar en distensión y dolor abdominal, náuseas, vómitos y a veces diarrea.

Los signos subsiguientes son probablemente el resultado de una disfunción circulatoria correspondiente a un aumento en la permeabilidad vascular y una marcada dilatación arterial. Estos síntomas pueden ser seguidos de presencia de ascitis la cual puede ser sólo visualizada a través de ecografía intravaginal, mientras que en casos más severos la ascitis es clínicamente detectable. La ascitis se caracteriza por una alta concentración de proteínas, un bajo recuento leucocitario, y presencia de alto número de glóbulos rojos. El exudado extravascular, rico en proteínas, acumulado en el peritoneo, en el plasma y a veces en el espacio pericárdico, es asociado con depleción del volumen intravascular, hemoconcentración y activación de vasoconstrictores.

Los efectos cardiovasculares incluyen hipotensión arterial, volumen de fluido reducido, baja presión de la vena central, taquicardia, hemoconcentración, e hipercoagulación. Por otro lado, la disminución de la perfusión renal induce estimulación de los túbulos renales y reabsorción de sodio y agua que resulta en manifestaciones clínicas de oliguria [155].

Asociada a la ascitis, la ileus peristáltica, puede dañar el movimiento diafragmático originándose problemas respiratorios. Si la efusión pleural también se desarrolla, la función pulmonar se ve afectada seriamente y lleva al síndrome de diestrés respiratorio agudo (ARDS). Los fenómenos tromboembólicos son la última complicación de OHSS, y en algunos casos resultan fatales a pesar de la aplicación de un tratamiento adecuado [153].



## **Etiología de OHSS**

Aunque la causa de OHSS es compleja y en algunos aspectos aún permanece sin estar dilucidada, se sabe que la administración de hCG induce la liberación de un mediador que tiene efecto sobre el sistema vascular, el cual es el responsable de las consecuencias clínicas de OHSS y juega un rol en el desarrollo de este síndrome. Se ha observado que los niveles séricos de VEGF aumentan luego de la administración de hCG en mujeres hiperestimuladas con riesgo a desarrollar OHSS [156-158]. Además, que las concentraciones de VEGF en suero, fluido peritoneal y folicular en pacientes con riesgo a OHSS se encuentran correlacionadas positivamente con el desarrollo del síndrome [159-161].

Por otra parte, el OHSS, no solo puede ocurrir durante la fase lútea, sino también durante la primer parte del embarazo a causa de la hCG endógena [154]. Además, si bien la mayoría de los casos de OHSS son causas iatrogénicas, existe una forma de OHSS espontánea dada por una mutación en el gen del receptor de FSH (FSHR) que genera una hiperrespuesta a la FSH circulante y además reacciona con moléculas de estructura similar como la hCG o la tirotropina (TSH) [162].

Hasta ahora, la fisiopatología de este síndrome no ha sido completamente descrita y tampoco existen tratamientos preventivos óptimos. Sin embargo, sumado a la alta permeabilidad vascular en respuesta a la estimulación con hCG en las pacientes que desarrollan OHSS [163], se ha comprobado que esta hormona es capaz de inducir la producción de factores angiogénicos. En particular, los sistemas angiogénicos de VEGF, angiopoyetinas (ANGPTs), TGFs y esfingolípidos, como el S1P, han sido implicados en el desarrollo de OHSS. Varios autores y nosotros hemos demostrado la participación de estos factores en la etiología de este síndrome [164-170]. Además, se han descrito factores adicionales que estarían involucrados en este síndrome, como el sistema renina-angiotensina, las prostaglandinas y diversas citoquinas proinflamatorias [171].

Sin embargo, ningún estudio ha demostrado hasta el momento la contribución del sistema angiogénico de PDGF, cuya función es regular la estabilidad y la permeabilidad vascular. En base a estos antecedentes, uno de los objetivos de esta tesis es evaluar la participación de PDGF-B en el desarrollo de OHSS.

### **FALLA PREMATURA OVÁRICA (POF)**

La falla ovárica prematura (FOP) es un desorden multicausal que se caracteriza por la desaparición o disfunción de los folículos ováricos en mujeres menores de 40 años. La FOP afecta alrededor del 1-2% de mujeres menores de 40 años y al 0,1% de mujeres menores de 30 años [172]. Estas pacientes presentan amenorrea, hipostrogenismo y elevados niveles de gonadotrofinas. Las causas que provocan FOP se pueden agrupar en: causas genéticas, causas inmunes, causas infecciosas y causas iatrogénicas (quimioterapia, radioterapia)[173].

Las drogas quimioterapéuticas (ciclofosfamida, procarbacin, busulfan, cisplatino, doxorubicina entre otras) poseen un fuerte efecto tóxico sobre el ovario, afectando la reserva ovárica (folículos primordiales y primarios) [174,175]. Está reportado que el tratamiento con estos agentes producen FOP en la mayoría de las pacientes [173,176]. Hasta ahora, se han sugerido varios posibles mecanismos que explican el daño severo en el ovario por la quimioterapia. Uno de ellos involucra el aumento de la apoptosis en folículos de distintos estadios [177]. El otro mecanismo involucra el daño sobre el estroma ovárico y la vasculatura que causan la disminución de los folículos más pequeños [178]. El tercer mecanismo es la activación desregulada de folículos quiescentes, causando depleción de la reserva folicular [179,180]. Actualmente, se utilizan distintas opciones para preservar la fertilidad (supresión de FSH/LH por agonistas de GnRH, criopreservación de ovocitos, embriones y material ovárico), pero las mismas son de alto costo o su efectividad es muy baja.

Uno de los tratamientos farmacológicos más utilizados actualmente para proteger la reserva ovárica en pacientes antes de iniciar y durante la quimioterapia es la administración de análogos de GnRH. Estos análogos suprimen la función gonadal en forma transitoria durante la quimioterapia, evitando supuestamente la destrucción de los folículos. Sin embargo, el pool de folículos primordiales y primarios carecen de receptores para FSH y el reclutamiento inicial es independiente de gonadotrofinas lo que indicaría que los análogos de GnRH no son tan efectivos en la preservación del ovario [174,181,182].

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Las **hipótesis** que postulamos son:

- ❖ **La desregulación de los sistemas de PDGF y S1P está involucrada en la patogenia de OHSS, afectando en parte a la angiogénesis ovárica y aumentando la permeabilidad vascular que conduce a la presencia de ascitis observada en este síndrome.**
- ❖ **El esfingolípidio ceramida 1 fosfato (C1P) protege al ovario y previene la infertilidad en la falla ovárica prematura (POF) inducida por quimioterapia a través de la modulación de la función ovárica y la angiogénesis.**

Debido a que en la actualidad es escasa la información que se dispone acerca de estas patologías y de sus posibles tratamientos, se plantearon los siguientes *objetivos generales*:

### **I) Modelo OHSS:**

1. Estudiar el efecto *in vivo* intraovárico que produce el agregado de PDGF-B sobre la permeabilidad vascular y la angiogénesis ovárica, y su relación con la dinámica folicular y luteal, y con la esteroidogénesis **en un modelo de OHSS.**
2. Estudiar el transporte de colesterol en **FF de pacientes** sometidas a técnicas de reproducción asistida (ART) con **alto riesgo de desarrollar OHSS y pacientes controles.**
3. Evaluar el efecto *in vitro* que produce el agregado del esfingolípidio S1P al FF proveniente de pacientes con alto riesgo de desarrollar OHSS sobre un cultivo primario de **células vasculares de músculo liso.**

## **II) Modelo de FOP inducida por quimioterapia:**

1. Estudiar el efecto *in vivo* intraovárico que produce el tratamiento con el esfingolípido C1P sobre el desarrollo folicular, la apoptosis, la angiogénesis ovárica y la fertilidad **en un modelo de FOP inducida por quimioterapia.**
2. Analizar el efecto *in vitro* que produce el agregado de C1P sobre la viabilidad y la funcionalidad celular en una línea celular de macrófagos expuestos a quimioterapia.

De acuerdo con los objetivos generales, se plantearon los siguientes *objetivos específicos*:

## **I) Modelo OHSS:**

1. Estudiar el efecto *in vivo* intraovárico que produce la administración del factor angiogénico PDGF-B en un modelo de OHSS desarrollado en rata sobre:
  - 1.1. El peso ovárico
  - 1.2. El desarrollo folicular y la formación del cuerpo lúteo (CL).
  - 1.3. La proliferación celular
  - 1.4. La esteroidogénesis ovárica.
  - 1.5. La estabilidad de la vasculatura ovárica.
  - 1.6 La permeabilidad vascular.
  - 1.7. La formación de la membrana basal endotelial
  - 1.8 La expresión ovárica de proteínas de unión intercelular.
2. Caracterizar el transporte de HDL-colesterol en FF de pacientes control y con riesgo a desarrollar OHSS

2.1 Estudiar los niveles de colesterol total, el perfil lipídico y la composición de las lipoproteínas en FF provenientes de pacientes sometidas a ART con alta probabilidad de desarrollar OHSS y pacientes control.

2.2. Evaluar los niveles de expresión proteica del receptor de la lipoproteína HDL, SR-BI, en un cultivo de células de granulosa-luteínica humanas en presencia de FF de este tipo de pacientes.

3. Evaluar el efecto *in vitro* que produce el agregado de S1P en cultivos de células de músculo liso vascular de rata estimuladas con FF provenientes de este tipo de pacientes sobre los siguientes parámetros:

- 3.1. La distribución de los filamentos de actina
- 3.2. La expresión de proteínas de unión intercelular
- 3.3. La expresión de los receptores de S1P (S1P1 y S1P3).

## **II) Modelo de FOP inducida por quimioterapia:**

1. Analizar el efecto *in vivo* intraovárico del esfingolípido C1P en ovarios provenientes del modelo de FOP inducida por ciclofosfamida desarrollado en ratón hembra adulta sobre:

- 1.1 El desarrollo folicular y la atresia.
- 1.2 La morfología uterina
- 1.3 La expresión de la hormona anti-mülleriana (AMH, marcador de reserva ovárica)
- 1.4 Los niveles de hormonas (estradiol, FSH) tisulares y séricos.
- 1.5 La apoptosis ovárica
- 1.6 El desarrollo y estabilidad vascular del ovario.

1.7 La fertilidad de la hembra (índice de fertilidad, número de crías nacidas vivas y peso promedio de las crías)

1.8 La funcionalidad ovocitaria (maduración, fertilización y desarrollo embrionario)

2. Evaluar el efecto *in vitro* que produce el esfingolípido C1P en presencia de ciclofosfamida en una línea de macrófagos sobre:

1.1 La viabilidad celular

1.2 La apoptosis celular

1.3 Los niveles de citoquinas (MCP-1, IL-6)

## **METODOLOGÍA GENERAL**

### **MATERIALES Y REACTIVOS**

La PMSG fue obtenida de Syntex S.A. (Buenos Aires, Argentina), y la hCG fue obtenida de Elea (Buenos Aires, Argentina).

Los reactivos: acrilamida, bis-acrilamida, dodecil sulfato sódico (SDS), 3,3'-diaminobenzidina (DAB), glicina, albúmina de suero bovino (BSA), persulfato de amonio (PSA), N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina (TEMED), Tris, fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), N-tosil-L-fenilalanina-clorometil cetona (TPCK) y N-CBZ-L-fenilalanina clorometil cetona (ZPCK) fueron obtenidos en Sigma Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A). El peróxido de hidrógeno 30% provino de Merck Millipore (Darmstadt, Alemania). El marcador de peso molecular preteñido fue adquirido en Amersham Life Science. El suero fetal bovino (SFB) fue obtenido de Natocor (Argentina). La fluoresceína de sodio (C.I. 45350) fue obtenida de Biopack (Argentina).

El PDGF-B recombinante fue una generosa donación de la Dra. Mercedes Goin (Laboratorios Beta, Argentina). La esfingosina-1-fosfato fue obtenida de Sigma-Aldrich y la ceramida-1-fosfato (#860532P) de Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). La ciclofosfamida (CAS no. 6055-19-2) fue obtenida de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) y la perfosfamida (4-hidroperoxiciclofosfamida, #D-18864) fue obtenida de Niomech - IIT GmbH (Bielefeld, Alemania).

### **ANTICUERPOS**

Los anticuerpos primarios anti BAX (sc-493), BCLX(sc-634), N-cadherina (sc-7939), PDGFR $\beta$  (sc-432), AMH (sc-6886), 3 $\beta$ -HSD (sc-30820), nectina-2 (sc-373715), S1P3 (sc-30024), Sphk1 (sc-48825), desmina (sc-27167), VE-cadherina (sc-9989), Colágeno IV



(sc-70246) y  $\beta$ -actina (sc-1616-R) fueron adquiridos en Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Los anticuerpos primarios anti  $\alpha$ -SMA (ab18147), DDX4 (ab27591), A-SMase (ab83354), S1P1 (ab125074), occludina (71-1500) y PDGF-B (ab16829) fueron obtenidos de Abcam (Cambridge, Massachusetts, USA). El anticuerpo primario anti Von Willebrand (A0082) fue adquirido de DAKO (DAKO, Glostrup, Denmark). Los anticuerpos anti occludina: (71-1500) y claudina-5: (35-2500) provinieron de Invitrogen (Invitrogen Corp., CA, USA). Los anticuerpos anti GADPH (# 2118) (Cell Signaling (Danvers, MA, USA). El anticuerpo anti P450scc fue obtenido de Dr. Anita Payne. Stanford University Medical Center, Stanford, CA, USA. Los anticuerpos anti ApoAI y SR-BI fueron una donación del Lab. de la Dra. Busso, Pontificia Universidad Católica de Chile, Chile.

Los anticuerpos IgG secundarios anti-conejo, anti-ratón y anti- cabra conjugados a peroxidasa y a biotina fueron obtenidos en Sigma Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A). El anticuerpo secundario anti-conejo unido a FITC (#65-6111) fue adquirido en Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). El anticuerpo anti-ratón unido a DYlight549 (DI-2549) fue obtenido de Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA).

## **MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS**

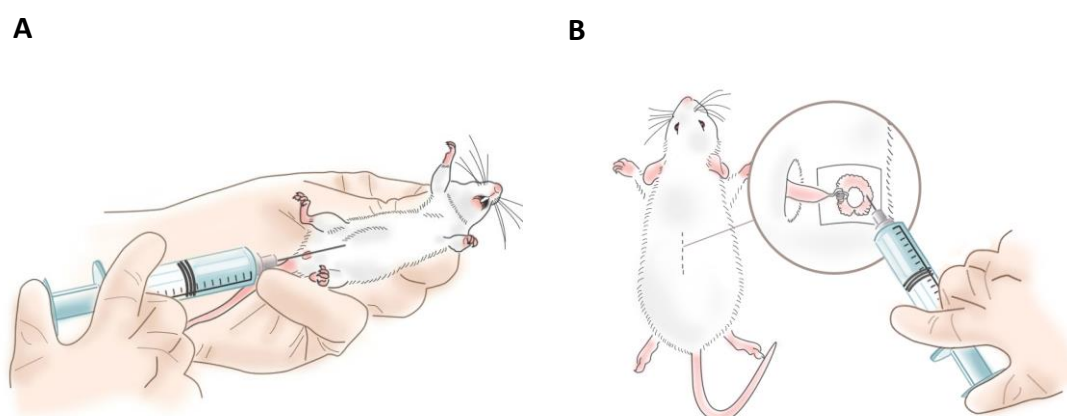
### **CIRUGÍA E INYECCIÓN INTRABURSA**

Los animales fueron anestesiados previamente via intraperitoneal (ip) con un cóctel de ketamina y xilacina, de acuerdo a su peso (Fig 9A). Se les realizó una única incisión dorsal en la línea media del cuerpo, y luego dos pequeñas incisiones para acceder al peritoneo, ubicadas directamente sobre la grasa que recubre el ovario derecho y el izquierdo. Se externalizó cada ovario a través de su respectiva incisión y se realizó la inyección intrabursa de los tratamientos mediante una jeringa Hamilton, que

se insertó dentro de la bursa ovárica (Fig. 9B). Cada animal recibió entre 5 y 10  $\mu$ l de solución o de vehículo en ambos ovarios, dependiendo del modelo animal y del grupo experimental. Los ovarios fueron reubicados en la cavidad peritoneal y las heridas fueron selladas o cosidas para prevenir infecciones.

Luego de la intervención, los animales fueron colocados en cajas separadas bajo una fuente de calor suave, hasta recuperar su conducta normal. Finalmente, los animales permanecieron en sus jaulas en condiciones normales hasta el día del sacrificio o del cruzamiento.

Se describirá detalladamente la metodología específica de los modelos experimentales de OHSS y FOP desarrollados en roedores más adelante, en sus respectivos capítulos.



**Figura 9:** Esquema de las vías de administración utilizadas para los modelos experimentales en roedor. A: Vía intraperitoneal (utilizada para administrar anestesia) B: Vía intrabursa (utilizada para administrar los tratamientos en estudio).

## COLORACIÓN CON HEMATOXILINA - EOSINA

Los cortes histológicos de 5  $\mu$ m de espesor de distintos tejidos fueron montados en portaobjetos con carga positiva, desparafinados con xileno y deshidratados en diluciones decrecientes de etanol (96%, 90% y 75%). Los cortes fueron lavados en agua

destilada y sumergidos en hematoxilina durante 1 minuto. Luego de dos lavados en agua corriente, se realizó una rápida inmersión en eosina (10 segundos) y lavados con alcohol 96% hasta obtener el color deseado. Los portaobjetos se dejaron secar al aire y luego se cubrieron con bálsamo de Canadá sintético (Biopack, Argentina) y con cubreobjetos para su montaje.

## **TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) E HISTOQUÍMICA**

La localización inmunohistoquímica se realizó utilizando la técnica de estraptavidina – biotina – peroxidasa. Los cortes histológicos se desparafinaron en xileno e hidrataron en concentraciones decrecientes de etanol (100%, 96% y 70%). Se bloqueó la peroxidasa endógena en 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 30 minutos. Los cortes se lavaron en buffer PBS (NaCl 0,58 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhidro 41,56 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15,8 mM, pH 7,5). En el caso de PCNA (marcador de proliferación celular); lectina biotinilada de *Bandeiraea simplicifolia* (lectina-BS, marcador de endotelio);  $\alpha$ -actina (marcador de células murales); hormona anti-mülleriana (AMH, marcador de reserva ovárica); DDX4 (marcador de células germinales) y caspasa 3 clivada, se realizó una exposición antigénica sometiendo las muestras a microondas en buffer citrato 0,01 M (pH 6) dos veces durante cinco minutos a 600 W de potencia. Para la detección de Factor Von Willenbrand (marcador de endotelio) se utilizó proteinasa K (concentración: 15  $\mu$ g/ml, tiempo: 10 minutos) como método de desenmascaramiento del antígeno.

En todos los casos, se bloquearon las proteínas con 2% de BSA por 20 minutos y se incubaron con el primer anticuerpo correspondiente (PCNA 1/100,  $\alpha$ -actina 1/100, AMH 1/400; DDX4 1/100, caspasa-3 clivada 1/100, Factor Von Willenbrand 1/100 en PBS) o con la lectina-BS (20 mg/ml) a 4° C en cámara húmeda durante toda la noche. Al día siguiente se lavó con PBS y se incubó con el correspondiente anticuerpo secundario anti – ratón o anti – conejo 1/400 en PBS durante una hora en cámara húmeda a temperatura

ambiente (excepto en el caso de la lectina BS-1). Se lavó con PBS, se agregó el complejo ABC: avidina-peroxidasa biotinilada (Vectastain ABC system, Vector Laboratories, Burlingame, CA) y se incubó durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Se lavó con PBS y se reveló con DAB (3',3-diamino bencidina) 0,5 mg/ml durante 3 minutos. Se detuvo la reacción con H<sub>2</sub>O y se realizó un contraste con hematoxilina. En el caso de AMH, no se realizó ninguna tinción de contraste para visualizar los folículos de manera óptima.

Por último, se deshidrataron los cortes sumergiéndolos en una serie ascendente de concentraciones de etanol, se aclaró con xileno y se montaron los cortes con bálsamo de Canadá sintético (Biopack, Argentina). Los controles negativos se obtuvieron en ausencia del anticuerpo primario o de la lectina.

Las imágenes se digitalizaron mediante una cámara de fotos (Nikon, Melville, NY, USA) montada sobre un microscopio de luz convencional (Nikon), utilizando un aumento de 400X. Finalmente las imágenes se transformaron al formato Tiff ("bi-level scale") para ser analizadas a través del programa Image J (Image Processing and Análisis in Java, Nacional Institute of Health, USA).

## **EXTRACCIÓN Y MEDICIÓN DE PROTEÍNAS**

Los ovarios provenientes de los distintos grupos experimentales que fueron sometidos a una extracción de proteínas, fueron homogeneizados mediante un equipo Ultra-Turrax (IKA Werk, Breisgau) en 350 µl de buffer de lisis (Nonidet P (NP-40) 1%, Tris 20 mM pH 8, NaCl 137 mM y glicerol 10%), suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas, según correspondiese. Luego, las muestras fueron centrifugadas a 4°C durante 10 min a 10.000 x g y el pellet resultante se descartó.

Para la extracción proteica de células, las placas de 24 wells fueron congeladas a -20° C y luego se les agregó a cada well 50 µl de buffer lisis. Se las dejó reposar en

hielo durante 30 minutos y se procedió a disgregar las células. El lisado se centrifugó a 4° C a 13.000 rpm durante 10 minutos. En todos los casos, la medición de proteínas se realizó en el sobrenadante por el método de Bradford.

## **WESTERN BLOT**

Para la determinación de los niveles de distintas proteínas, se sembraron 20 o 30 µg de extracto proteico en un gel de poliacrilamida (10%, 12% o 15%) con SDS (SDS-PAGE). Las muestras fueron previamente hervidas durante 5 minutos en buffer (SDS 6%, β-mercaptoetanol 15%, glicerol 60%, azul de bromofenol 0,006%, Tris-base 0,18M, pH=6,8). Las proteínas fueron separadas por electroforesis a 25 mA durante 1,5 horas y luego fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa durante 2 horas a 80 V en buffer Tris-base 0,025M (pH=8,3), glicina 0,192 M y metanol 20%. Los sitios de unión remanentes sobre las membranas fueron bloqueados con una solución de TBS y detergente Tween (TTNBS 0,05%) y leche descremada en una concentración de 0,05 g/ml durante 1 hora a temperatura ambiente o por incubación durante toda la noche a 4°C. Luego las membranas fueron incubadas con las correspondientes diluciones de anticuerpos primarios policlonales durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente y luego de sucesivos lavados con TTNBS, las membranas fueron incubadas con sus correspondientes anticuerpos secundarios acoplados a la enzima peroxidasa (IgG anti conejo acoplado a peroxidasa 1:1000 o IgG anti ratón acoplado a peroxidasa 1:1000 diluidos en TTNBS 0,1%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las membranas fueron incubadas con el reactivo de quimioluminiscencia (Amersham Pharmacia) durante 1 minuto. Se detectó la marca por autorradiografía utilizando una película radiográfica. Los controles negativos se obtuvieron en ausencia del primer anticuerpo. El contenido proteico de cada muestra se analizó mediante la realización de una densitometría de las bandas obtenidas para la proteína de interés. La densidad

de cada banda fue normalizada respecto a la densidad obtenida en la misma muestra para las proteínas  $\beta$ -actina o GADPH, según correspondiera. En el caso del análisis proteico en FF se normalizó respecto a las bandas invariable obtenidas de las membranas de nitrocelulosa teñidas con S-Ponceau. Los datos de la densidad relativa se expresaron como unidades arbitrarias  $\pm$  ESM.

## **EXTRACCIÓN DE ESTEROIDES DE OVARIO**

Los ovarios enteros fueron disgregados mecánicamente y luego homogeneizados en acetona (1:10 peso/vol). Se realizó una centrifugación a 1600 xg durante 10 minutos y los sobrenadantes fueron trasvasados a tubos cónicos y evaporados a sequedad. El remanente se resuspendió en 1 ml de agua destilada y se incubó a 50 °C durante 10 minutos en agitación. De esta resuspensión se realizaron dos extracciones con éter dietílico (1:2,5 vol/vol) mediante agitación de cada muestra durante dos minutos luego del agregado de éter. Mediante congelamiento durante 20 minutos a -70 °C fueron separadas las fracciones etéreas, las que fueron trasvasadas, evaporadas y resuspendidas en 1,4 ml de metanol, al que se le agregó 1,4 ml de agua destilada. Se realizó una nueva partición con n-hexano para lo cual se homogeneizó durante 2 minutos y se descartó la fase superior. Finalmente se agregó a la fase inferior 2 ml de diclorometano y luego de su homogeneización se descartó la fase superior acuosa y se dejó evaporar la inferior. Los residuos se resuspendieron en buffer RIA y fueron conservados a -20 °C hasta realizar las correspondientes mediciones [183].

## **RADIOINMUNOENSAYO (RIA)**

Se determinó el contenido de estradiol ( $E_2$ ) y progesterona ( $P_4$ ) en ovarios mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA). En ambos casos se utilizaron

anticuerpos policlonales en una dilución adecuada para ligar el 36% del correspondiente <sup>3</sup>H-esteroide utilizado como trazador. En el procedimiento se incubó una alícuota de la muestra, una cantidad de trazador correspondiente a 10.000 cpm y un volumen determinado de anticuerpo durante 16 horas a 4° C. Finalizada la incubación, se separó la hormona libre de la unida al anticuerpo con 0.2 ml de una solución de carbón activado 0,5%, en el buffer de ensayo: (Buffer RIA: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 40 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 39,5 mM; NaCl 155 mM; azida sódica 0,1%; gelatina 1%; pH= 7,0) y posterior centrifugación durante 15 minutos a 3000 rpm. Los sobrenadantes fueron transferidos a viales de conteo en los cuales se agregó 2 ml de solución de centellante Optiphase Hisafe 3. La radiactividad se determinó en un contador de centelleo líquido Beckman LS 1801, con una eficiencia del 62%. El rango de utilidad del ensayo para la P<sub>4</sub> fue de 12,5 a 800 pg y para el E<sub>2</sub> de 6,25 a 800 pg en un volumen final de 0,5 ml. Los valores se relativizaron al peso ovárico correspondiente y se expresaron como ngr. de hormona/gr. de ovario.

En cuanto a la FSH, se determinó la concentración de la misma en suero de ratón. Para ello, se recolectó sangre mediante una punción cardíaca terminal en animals previamente anestesiados con una mezcla de ketamina y xilacina (4:1). Se permitió la coagulación de la sangre a T amb por 45 minutos, y de allí se obtuvieron los sueros mediante centrifugación a 3000g. La concentración de FSH se evaluó por RIA con kits provenientes del NHPP (National Hormone and Peptide Program), NIDDK (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases) y del Dr. Parlow. Los resultados fueron expresados en términos de los estándares RP3 de FSH de rata, ya que estos sistemas reconocen muestras de ambas especies. La sensibilidad del ensayo fue de: FSH 0.1175 ng/ml y los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron 8,0 y 13,2%, respectivamente. Los valores fueron expresados como ng por ml de suero.

## CAPÍTULO I: SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA (OHSS)

Como ya se mencionó previamente, se define al OHSS como una complicación iatrogénica severa del crecimiento y maduración folicular ocasionada por la inducción de la ovulación en tratamientos de fertilización asistida en los cuales se realiza estimulación ovárica con altas dosis de gonadotrofinas [151,184].

Los síntomas más predominantes de OHSS en respuesta a los tratamientos de fertilización asistida son el aumento del tamaño ovárico, acompañado por dolores abdominales y un gran aumento en la permeabilidad vascular que conduce a la aparición de ascitis, que puede ser de leve a severa. En base a estos rasgos clínicos, tradicionalmente, OHSS ha sido clasificado en tres estadios, y en cinco grados según su intensidad (Tabla 1.1)[184].

| Estadio  |                | Características                                                                                                                                                 |
|----------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Leve     | <b>Grado 1</b> | Distensión e incomodidad abdominal.                                                                                                                             |
|          | <b>Grado 2</b> | Grado 1, más vómitos, diarrea y aumento del tamaño de los ovarios de (5-12 cm)                                                                                  |
| Moderado | <b>Grado 3</b> | Grado leve, más presencia ecográfica de ascitis.                                                                                                                |
| Severo   | <b>Grado 4</b> | Grado moderado, más signos de ascitis/hidrotórax o dificultad respiratoria.                                                                                     |
|          | <b>Grado 5</b> | Grado 4, más cambios en el volumen sanguíneo, aumento de la viscosidad sanguínea por hemoconcentración, trastornos de la coagulación y eventos tromboembólicos. |

Tabla 1.1: Clasificación del Síndrome de Hiperestimulación ovárica (OHSS).

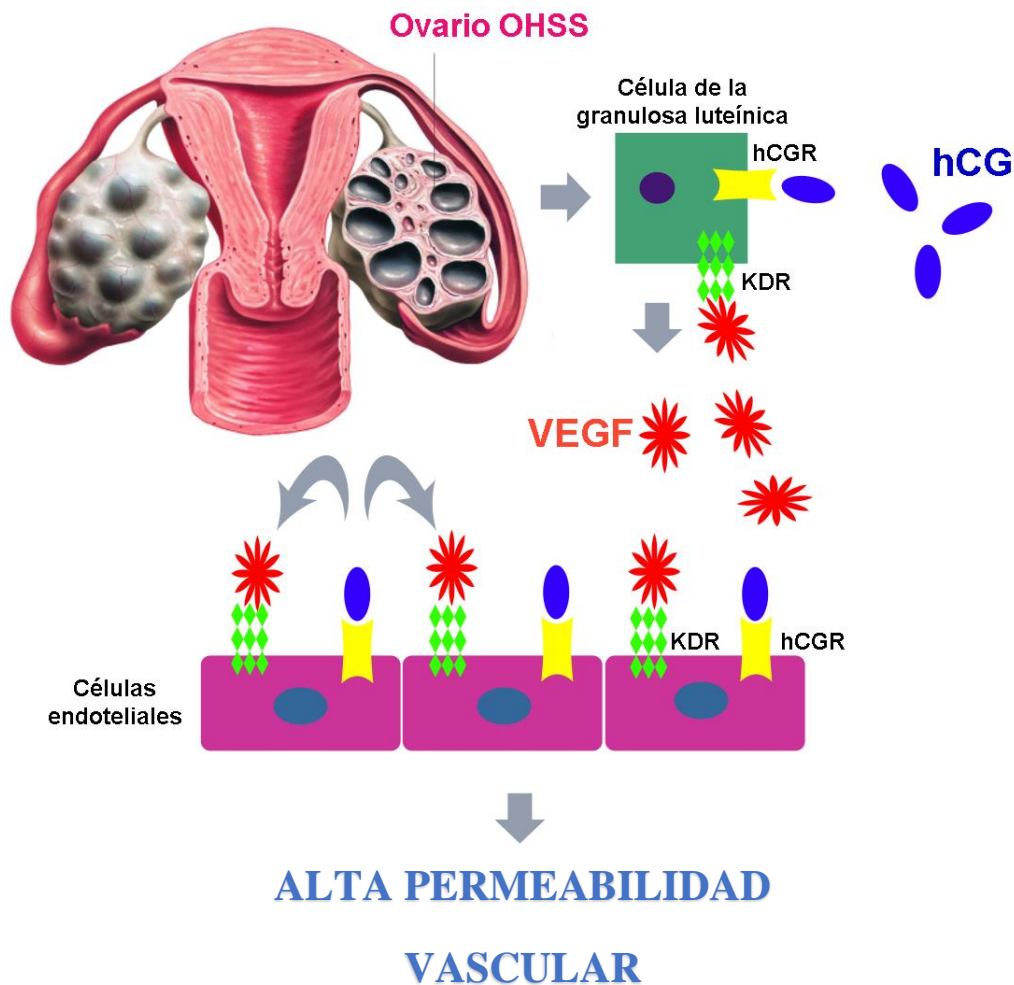


## ETIOLOGÍA DE OHSS

Como ya se ha mencionado, el factor angiogénico VEGF es uno de los actores más implicados en la patogenia de este síndrome. Se ha encontrado que los niveles séricos de VEGF aumentan luego de la administración de hCG en mujeres hiperestimuladas con riesgo a desarrollar OHSS [155,185]. Además, las concentraciones de VEGF en suero, fluido peritoneal y folicular en pacientes con riesgo a OHSS se encuentran correlacionadas positivamente con el desarrollo del síndrome [159-161].

Varios autores han mostrado que el VEGF de pacientes con OHSS proviene del ovario hiperestimulado debido a que la concentración de VEGF en fluido folicular es 100 veces mayor comparado al del suero [160,161]. Asimismo, se ha observado en mujeres que desarrollan la enfermedad OHSS, que el VEGF se expresa en células de granulosa-luteínicas y se libera al fluido folicular en respuesta a hCG, aumentando la permeabilidad vascular (Fig. 1.1) [186]. Por otro lado, estudios *in vitro*, han demostrado que la administración de hCG en células de la granulosa luteínicas humanas aumenta los niveles del ARNm de VEGF de manera dosis y tiempo dependiente [187]. Por lo tanto, se considera que el VEGF es el principal mediador en el desarrollo de OHSS.

Sin embargo, además del VEGF se han descriptos factores adicionales que estarían involucrados en la patogénesis de este síndrome. Rizk y col. en 1997 demostraron que las citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$ ) se encontraban aumentadas en suero, fluido folicular y ascítico de pacientes con OHSS severo [171]. A su vez, otras moléculas, como la histamina, la prolactina, la IL-6, la IL-1 $\beta$  y el sistema renina – angiotensina también han sido propuestas como relevantes en el desarrollo de OHSS [157,188,189]. Además, hay trabajos que demuestran que el aumento en la permeabilidad vascular depende de otras moléculas, como la proteína de uniones adherentes VE-cadherina que juegan un rol en el desarrollo y progresión de OHSS severo [187].



**Figura 1.1: Fisiopatología de Síndrome de Hiperestimulación Ovárica.** La hormona hCG estimula en las células de la granulosa-luteínicas a sintetizar y liberar grandes cantidades de VEGF. El receptor KDR también es estimulado en células de la granulosa-luteínicas y células endoteliales en respuesta a hCG. El VEGF liberado por las células de la granulosa-lueínicas se une a los receptores KDR en células endoteliales aumentando la permeabilidad vascular. Adaptado de Soares y col., 2008 [187].

En nuestro laboratorio, hemos demostrado en el modelo de OHSS desarrollado en rata, que la administración *in vivo* de un agonista de GnRH afectaba la estabilidad vascular y la proliferación de células del cuerpo lúteo conduciéndolo a la regresión. En base a estos resultados, se sugirieron a los agonistas de GnRH como posible tratamiento para prevenir la patología de OHSS [190].

Otra estrategia propuesta fue la utilización de un inhibidor de VEGF sobre el desarrollo de OHSS, ya que las pacientes presentan niveles elevados de este factor angiogénico en suero, líquido peritoneal y fluido folicular. Nuestros resultados han mostrado que el inhibidor de VEGF (TRAP) disminuye el número de cuerpos lúteos y aumenta el número de folículos atrésicos en ovarios de ratas OHSS. Estos resultados son relevantes considerando que en este síndrome existe un alto número de folículos desarrollados y CLs asociados a una angiogénesis excesiva [191,192]

Asimismo, existe otro sistema vasoactivo, el sistema de ANGPTs, que es también indispensable para el desarrollo de los vasos sanguíneos y ha sido relacionado con la patología de OHSS [193]. Estos autores reportaron que los niveles de ANGPT2 aumentan luego de 30 días post hCG en pacientes con OHSS que se embarazaron. Además, en nuestro laboratorio hemos encontrado un aumento en la expresión proteica de ANGPT1 y de su receptor Tie-2 en ovarios provenientes de un modelo de OHSS desarrollado en rata [190]. También, en FF humanos hemos observado un aumento en los niveles proteicos de esta ANGPT en pacientes con alto riesgo a desarrollar OHSS.

Además, en nuestro laboratorio se evaluaron los niveles proteicos de dos ligandos del sistema de PDGF: PDGF-B y -D en FF de pacientes con alto riesgo a desarrollar OHSS. Los resultados mostraron que estas isoformas, implicadas en el reclutamiento de células peri-endoteliales (células de músculo liso y pericitos), se encontraban disminuidas en los FF de este tipo de pacientes, comparado a los FF de pacientes control (*datos no publicados*). Por otra parte, observamos que los niveles proteicos ováricos de PDGF-B y PDGF-D, así como de su receptor PDGFR $\beta$ , se encontraban disminuidos en el modelo de OHSS comparado a ratas normales [170].

Por último, hemos encontrado una disminución significativa en los niveles del esfingolípidido S1P en FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS respecto de FF de pacientes control, siendo éste un factor clave para la integridad vascular y para la

interacción entre células endoteliales y peri-endoteliales [168]. Además, demostramos que la administración local de S1P restaura la estabilidad vascular y disminuye a severidad en el modelo de OHSS desarrollado en roedor [167].

Todos estos antecedentes sugieren que hay muchos factores que intervienen en la patogenia de OHSS, y que podrían existir alteraciones en otros sistemas menos estudiados, como los de PDGF y S1P. Estos sistemas cobran especial importancia porque regulan la madurez y la funcionalidad vascular, afectando el reclutamiento y la estabilidad de células peri-endoteliales, y por ende, modulando la permeabilidad en la microvasculatura.

## **INCIDENCIA DE OHSS**

En Argentina, se ha observado que 3 de cada 10 mujeres poseen problemas para concebir. En la actualidad, debido al aumento en el número de mujeres que se someten a tratamientos de fertilización asistida se ha visto un incremento en el desarrollo de OHSS. La incidencia actual de OHSS es del 0.5-5% en forma grave, 3-6% para la forma media y 20-33% para la forma leve, que normalmente no requiere tratamiento [151]. Estos porcentajes están determinados sobre el total de ciclos de estimulación ovárica. Aunque estos datos indican que la prevalencia de la forma severa es baja, es importante destacar que este síndrome es una complicación causada por procedimientos de fertilización asistida que en algunos casos pueden requerir cuidados intensivos inmediatos.

## **Factores de riesgo que influyen en la incidencia de OHSS**

El conocimiento de los factores de riesgo y la observación de las condiciones clínicas son útiles para predecir qué pacientes son susceptibles de

presentar una hiperestimulación ovárica severa. Los factores que se deben considerar son:

- *Edad*: Existe una correlación inversa entre la edad de la mujer y el desarrollo del síndrome. Esto puede deberse a que los ovarios de mujeres jóvenes (<35 años) tienen mayor densidad de receptores para gonadotrofinas, siendo sus ovarios más sensibles o bien porque poseen un mayor número de folículos que son capaces de responder a las gonadotrofinas [153].
- *Síndrome de ovario poliquístico (PCOS)*: Esta patología cursa con hiperandrogenismo, oligomenorrea, altos niveles de LH y más de 10 quistes ováricos de tamaño <10mm. En estas pacientes se han detectado niveles bajos de proteínas de unión IGF-1BP, especulándose que los niveles excesivamente altos de IGF-1 libres podrían incrementar la sensibilidad ovárica a la estimulación con gonadotrofinas, incrementado el riesgo de hiperestimulación [153]. Además las pacientes con PCOS tienen alta expresión de VEGF en ovario [194,195]. Luego de la estimulación con hCG en estas pacientes, los valores de VEGF aumentan considerablemente, los cuales pueden influir en el desarrollo de OHSS severo [157,195].
- *Alergias*: Las respuestas inflamatorias con presencia de citoquinas inmunomoduladoras están asociadas al desarrollo del síndrome [151].

## **MÉTODOS ACTUALES DE PREVENCIÓN DE OHSS**

La prevención y la detección temprana de OHSS son importantes para asegurar la salud de la paciente. El primer paso es la identificación de los factores de riesgo con el fin de individualizar el régimen de estimulación y, en segundo lugar, es necesario un

estricto monitoreo de la respuesta a la estimulación que permitirán tomar medidas preventivas ante una respuesta ovárica exagerada.

Los criterios de selección de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS son: presencia de concentraciones séricas de E2 mayores a 3000 pg/ml, más de 18 folículos de entre 10 y 14 mm de diámetro, el número de ovocitos recuperados en la aspiración y/o presencia de ovario políquístico [153]. Estos parámetros se controlan por medio de una ecografía transvaginal combinada con la medición de la concentración de E2 en suero durante la estimulación. A pesar del monitoreo de la ovulación por ultrasonido y de la medición de los niveles de E2, estas medidas son aún insuficientes para detectar los casos de OHSS. Debido a ello, se aplican además otras medidas para evitar una respuesta ovárica exagerada.

Las posibles soluciones para evitar o reducir OHSS son las siguientes:

- *Cancelación del ciclo*: Está establecido que no administrar hCG cuando los niveles de E2 son demasiados altos previene el riesgo a desarrollar OHSS severa [151]. Si bien, este método previene la aparición de OHSS, tiene un costo emocional y económico elevado.
- *“Coasting”*: Este método se basa en los niveles de E2 séricos durante la estimulación ovárica. Cuando hayan aumentado antes de la administración de hCG, lo cual indica riesgo de OHSS, las gonadotrofinas exógenas se dejan de administrar, mientras que un agonista de GnRH es mantenido. La administración de hCG se pospone hasta que los niveles de E2 decrezcan a un valor seguro, atestiguando atresia folicular. Las ventajas de este método es que no se cancela el ciclo; sin embargo, se le asocian varias desventajas como la disminución en la calidad y en el número de ovocitos recolectados post-coasting, especialmente cuando el período es prolongado [151].
- *Criopreservación de embriones*: La criopreservación de todos los embriones de las pacientes con riesgo a desarrollar OHSS. Con esta estrategia no se evita la aparición

de OHSS ya que se le administró hCG a la paciente, pero se realiza con el fin de evitar el desarrollo de OHSS a causa de la hCG endógena [153]. Además, la tasa de embarazo con embriones congelados es menor respecto a embriones frescos [196,197].

- *Agonistas de GnRH*: La sustitución de la hCG por agonistas de GnRH se basa en la habilidad de éstos por inducir un pico de LH endógeno que induzca la maduración folicular [198].
- *LH recombinante (LHr)*: La administración de LHr podría reducir la severidad de OHSS debido a que esta hormona tiene menor afinidad por el receptor que la hCG y a su vez, tiene menor vida media [199]. Sin embargo, este método tiene menor eficiencia.
- *Albúmina*: La administración de albúmina endovenosa en el momento de la captura de los ovocitos se emplea para prevenir la permeabilidad asociada a OHSS. La albúmina aumenta la presión oncótica intravascular para evitar la salida de líquido y unirse a proteínas vasoactivas y evitar que éstas puedan ejercer su acción [200]. Sin embargo, varios reportes contradictorios se han publicado desde su utilización para la prevención del síndrome [201-203].

El creciente número de ciclos de fertilización asistida de alta complejidad que se registra en todo el mundo se acompaña de un incremento del número de casos de OHSS. Aunque existen muchos estudios clínicos publicados que aplican las estrategias antes mencionadas, en la actualidad no existe ningún tratamiento completamente efectivo para el manejo del OHSS. Por el momento, el monitoreo clínico estricto, para reconocer rápidamente la paciente en riesgo y los signos y síntomas tempranos del síndrome, son los pilares más importantes en la prevención y el tratamiento de estas pacientes.

Por lo tanto, el estudio de la fisiopatología de este síndrome permitirá encontrar nuevas estrategias terapéuticas que permitan que mujeres con alto riesgo a desarrollar OHSS y/o mujeres que hayan sufrido OHSS en ciclos anteriores, lleguen al final del protocolo sin la cancelación del ciclo, y puedan lograr un embarazo exitoso.



## **METODOLOGÍA**

### **MODELO ANIMAL DE OHSS DESARROLLADO EN RATA**

Se utilizaron ratas prepúberes (*Rattus norvegicus*) de entre 21 y 23 días de la cepa Sprague Dawley, del Bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME-CONICET). Todos los protocolos y experimentos fueron aprobados por el comité de ética del IByME y llevados a cabo de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del NIH (National Institute of Health, USA). Los animales se mantuvieron en el bioterio en condiciones controladas de temperatura (21-23°C) y con un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (las luces se encienden a las 7.00 horas y se apagan a las 19.00 horas). Los animales recibieron agua y alimento balanceado ad libitum.

Se utilizó un modelo animal que desarrolla OHSS en ratas inmaduras Sprague Dawley (21 días, 60-80 g) [204-207]. Tal como se muestra en la Tabla 1.2, se dividieron al azar en cuatro grupos y se inyectaron en forma subcutánea con las hormonas correspondientes: a los animales del grupo control se lo inyectó con PMSG (10 UI) y luego de 48 hs con hCG (10 UI/día) para inducir la ovulación. Los animales del grupo OHSS fueron inyectados con altas dosis de PMSG (50 UI/día) durante 4 días y luego de 24 hs se les inyectó hCG (25 UI). Los grupos OHSS+PDGF recibieron las mismas dosis de hormonas que el grupo OHSS sumado a la administración de PDGF-B recombinante el día de la administración de hCG. El PDGF-B fue administrado localmente (bajo la bursa de ambos ovarios). Con esa finalidad, los animales fueron anestesiados con Ketamina HCl (70 mg/kg; Holliday-Scott S.A., Buenos Aires, Argentina) y xilacina (5 mg/Kg; König Laboratories, Buenos Aires, Argentina) y se les realizó la cirugía para inyección intrabursa descripta en la sección “Metodología general”. Los grupos OHSS + PDGF-B recibieron 0,1 µg o 0,5 µg de PDGF-B, disueltos en 5 µl en solución fisiológica bajo la bursa de ambos ovarios, mientras que los otros grupos recibieron la solución vehículo.

En general, las ratas se sacrificaron por decapitación 48 h post inyección de hCG y se extrajeron los ovarios y muestras de sangre. En el caso de los animales destinados a evaluación de la permeabilidad vascular, el sacrificio se realizó como se detalla más adelante (ver “Evaluación de permeabilidad vascular por extravasado de fluoresceína de sodio”).

|                                     | Día 1        | Día 2        | Día 3        | Día 4        | Día 5                               | Día 6 | Día 7      |
|-------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------------------------------|-------|------------|
| <b>Control</b>                      |              |              | PMSG (25 UI) |              | hCG (10 UI)                         |       | Sacrificio |
| <b>OHSS</b>                         | PMSG (50 UI) | PMSG (50 UI) | PMSG (50 UI) | PMSG (50 UI) | hCG (25 UI)                         |       | Sacrificio |
| <b>OHSS + PDGF-B (0,1µg/ovario)</b> | PMSG (50 UI) | PMSG (50 UI) | PMSG (50 UI) | PMSG (50 UI) | hCG (25 UI) + PDGF-B (0,1µg/ovario) |       | Sacrificio |
| <b>OHSS + PDGF-B (0,5µg/ovario)</b> | PMSG (50 UI) | PMSG (50 UI) | PMSG (50 UI) | PMSG (50 UI) | hCG (25 UI) + PDGF-B (0,5µg/ovario) |       | Sacrificio |

**Tabla 1.2: Protocolo de inyección para el desarrollo del modelo OHSS en rata a partir de ratas prepúberes de 21 días de la cepa Sprague Dawley.**

## PROCESAMIENTO DE TEJIDOS

Luego del sacrificio, se procedió a extraer los ovarios de cada animal y los mismos fueron limpiados y pesados. Uno de los ovarios fue destinado para realizar cortes histológicos y el contralateral para obtener extracto proteico. Los ovarios reservados para técnicas histológicas fueron fijados en solución de Bouin (Biopur S.A., Argentina) durante 18 h a 4° C, deshidratados e impregnados con parafina para la realización de cortes histológicos con micrótopo. Se utilizaron dos tipos de portaobjetos según la técnica a realizar posteriormente: para los cortes destinados a tinción con hematoxilina y eosina, se usaron portaobjetos esmerilados (Biotraza) y para las técnicas histoquímicas se usaron portaobjetos cargados positivamente (Patholab). Por otra parte, los ovarios destinados para análisis de proteínas fueron congelados a -

80° C hasta su posterior procesamiento. La sangre fue utilizada para obtener suero y realizar ensayos hormonales.

## **MORFOLOGÍA OVÁRICA**

Para estudiar la morfología ovárica, se realizaron cortes histológicos para la tinción con hematoxilina-eosina (H&E). Secciones de 5 µm de espesor fueron montadas a intervalos de 50 µm en portaobjetos para evitar contar la misma estructura dos veces, de acuerdo al método descrito por Woodruff y col. [208]. Se contó el número de folículos primordiales, primarios, preantrales, antrales, y atrésicos, cuerpos lúteos (CL) y quistes en ovarios provenientes de cada grupo experimental (control, OHSS, OHSS + PDGF-B 0,1 µg/ovario y OHSS + PDGF-B 0,5 µg/ovario). Se analizaron campos seleccionados al azar de cada sección ovárica (3 secciones/ovario, n= 6 ovarios/grupo). El número total de estructuras ováricas de cada ovario (folículos preantrales, antrales, atrésicos, CL y quistes) fue definido como el 100%. Los datos están presentados como porcentaje de cada tipo de estructura por ovario. No se tuvieron en cuenta los folículos primordiales y primarios debido a que en este modelo sus porcentajes eran despreciables. Los datos están presentados como porcentaje de cada tipo de estructura por ovario.

Los ovocitos con dos o más capas de granulosa, pero carentes de espacio entre las células de granulosa, fueron identificados como folículos preantrales. Se consideraron folículos antrales a aquellos que contenían varias capas de células de granulosa, un ovocito definido, una cavidad antral y un compartimento tecal. Los folículos fueron identificados como atrésicos cuando presentaban numerosas células picnóticas y un ovocito de aspecto degenerado. Los cuerpos lúteos fueron definidos como estructuras de gran tamaño conformadas mayormente por células polihédricas con núcleos centrales, que están repletas de gotas lipídicas. Se diferencian de los

folículos por la ruptura de la membrana basal y porque el compartimento de granulosa está invadido por fibras del tejido conectivo y vasos sanguíneos, por lo que es una estructura altamente vascularizada. Las estructuras luteales se identificaron como quistes cuando presentaban zonas compuestas por células luteinizadas y ausencia de membrana basal junto con la presencia de ovocitos aún en la cavidad antral y de zonas donde las células de granulosa no presentaban rasgos de diferenciación hacia células luteínicas.

### **EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE PROLIFERACIÓN**

Se utilizó como medida de proliferación celular la marcación positiva por IHQ del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA). Éste es una proteína nuclear no histónica de 36 kDa, indispensable para la síntesis de ADN, ya que actúa como auxiliar de la enzima ADN polimerasa delta. Las imágenes se digitalizaron mediante una cámara de fotos (Nikon, Melville, NY, USA) montada sobre un microscopio de luz convencional (Nikon), utilizando un aumento de 400X. Finalmente las imágenes fueron analizadas a través del programa Image J (Image Processing and Análisis in Java, National Institute of Health, USA). Se determinó manualmente el número de núcleos inmunopositivos para PCNA presentes en cada CL (utilizando la herramienta Cell Counter). Luego, se cuantificó de la misma manera el número de núcleos totales de cada CL en estudio y se calculó el porcentaje de núcleos inmunomarcados positivamente respecto del total.

### **CUANTIFICACIÓN DE LAS ÁREAS VASCULARES**

La evaluación se realizó mediante la detección por IHQ de un antígeno específico de células peri-endoteliales, como es el  $\alpha$ -SMA. El recubrimiento de las

células endoteliales con pericitos o células musculares lisas vasculares es un proceso tardío en la angiogénesis y refleja el grado de maduración vascular. La cuantificación se realizó en base a la siguiente técnica de análisis de imágenes: se obtuvieron las microfotografías necesarias para abarcar toda el área de la estructura en estudio (CL o quiste) utilizando un aumento de 400x (4-5 estructuras/animal, 5 animales/grupo). Luego, utilizando el programa Image J, se delimitó manualmente el área ocupada por vasos, considerando como tal las células marcadas aisladas y en grupos, con o sin luz central. No se excluyó ningún vaso del análisis. Por último, se calculó el área total del CL analizado. El área vascular relativa se definió dividiendo el área vascular absoluta (determinada por la suma de las áreas de todos los vasos correspondientes a un mismo CL) por el área total del CL.

### **EVALUACIÓN DE PERMEABILIDAD VASCULAR POR EXTRAVASADO DE FLUORESCÉINA DE SODIO (NAFLU)**

Se evaluó la permeabilidad vascular en el ovario mediante el uso de NaFlu (Biopack, Argentina), un marcador inerte de bajo peso molecular, según un protocolo modificado de Kaya y col. [209]. Se inyectó NaFlu 10% en solución fisiológica de manera intraperitoneal (100µl/100g de peso del animal) a los seis grupos experimentales. La misma se dejó circular durante 45 minutos y luego se procedió a anestesiarse al animal con una mezcla de ketamina y xilacina (7:1 respectivamente). A continuación, se realizó una perfusión transcardíaca al animal con 40 ml de solución fisiológica para lavar el excedente intravascular de NaFlu. Se extrajeron los ovarios e inmediatamente se los procesó para criopreservar el tejido en medio de inclusión (Cryoplast®, Biopack, Argentina) hasta el momento de su utilización. Por último, se realizaron cortes histológicos de 20 µm en crióstato, los cuales fueron posteriormente analizados por

microscopía confocal para evaluar el área de extravasado vascular de NaFlu como parámetro de permeabilidad vascular.

## **INMUNOFLUORESCENCIA (IF)**

La localización de colágeno IX y  $\alpha$ -SMA en cortes histológicos se realizó mediante una doble marcación por la técnica de inmunofluorescencia (IF). Los cortes histológicos se desparafinaron en xileno e hidrataron en concentraciones decrecientes de etanol (100%, 96% y 70%). Los cortes se lavaron en buffer PBS y se realizó una exposición antigénica sometiendo las muestras a microondas en buffer citrato 0,01 M (pH 6) dos veces durante cinco minutos a 600 W de potencia. Luego, se bloquearon las proteínas inespecíficas con buffer de bloqueo (5% SFB, 0,3% Triton-X-100 en PBS) por 20 minutos y se incubaron los cortes con el anticuerpo primario anti  $\alpha$ -SMA (1/300), preparado en buffer de incubación (1%BSA en PBS) a 4° C en cámara húmeda durante toda la noche. Al día siguiente, se lavaron los cortes con PBS y se incubaron con el anticuerpo primario anti colágeno IV (1/200), preparado en buffer de incubación a 4° C en cámara húmeda durante toda la noche. Al tercer día, se lavó con PBS y se incubó de forma secuencial con los anticuerpos secundarios unidos a fluoróforos: anti – ratón (1/1000 unido a Dylight) y anti – conejo (1/400) unido a FITC. Las incubaciones se realizaron durante 90 min, a temperatura ambiente y en oscuridad. Por último, se lavaron los cortes nuevamente con PBS y se montaron con el medio de montaje para fluorescencia Vectashield (H-1000, Vector Laboratories) para su observación en un microscopio confocal.

## **PACIENTES Y OBTENCIÓN DE FF HUMANO**

El material humano fue provisto por el centro de reproducción PREGNA Medicina Reproductiva, previo consentimiento informado y firmado de las pacientes. La utilización de este material biológico ha sido aprobada por el Comité de Ética del IBYME.

Se excluyeron las pacientes con patologías pélvicas tales como endometriosis, fibromas uterinos, enfermedad inflamatoria pélvica. Durante el ciclo de estimulación ovárica, cuando los folículos alcanzan 17 mm de diámetro, se les inyectó a las pacientes hCG (5000 UI/ml Pregnyl®, Organon SA). La recuperación ovocitaria se realizó vía vaginal con una guía de ultrasonido 34 h horas post inyección hCG. Durante la misma, sólo se extrajo el fluido de todos los folículos de la paciente entre 16 y 20 mm. Luego de la aplicación de las técnicas de fertilización asistida y de la aspiración folicular, se separaron los ovocitos para su fertilización y el FF, en lugar de ser descartado, fue derivado a nuestro laboratorio. Sólo los FF recibidos que son macroscópicamente claros, que no evidencian contaminación y que no presentan sangre fueron incluidos en el estudio. Los FF se centrifugaron y se almacenaron a -80° C hasta ser utilizados en los distintos ensayos.

Se utilizaron FF provenientes de pacientes con alto riesgo a desarrollar el OHSS (Grupo: FF OHSS, n=18) y pacientes controles sin riesgo a desarrollar OHSS (con ciclos menstruales regulares y sin evidencias de endocrinopatías) (Grupo: FF Control, n=20). El criterio de selección de una paciente con riesgo a desarrollar OHSS fue: > 20 ovocitos recuperados/ciclo de estimulación ovárica y niveles de E2 séricos el día de la administración de hCG > 3000 pg/ml.

## **ENSAYO ENZIMÁTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE COLESTEROL TOTAL**

La determinación de colesterol en FF se realizó usando el método enzimático que combina el uso de colesterol esterasa y colesterol oxidasa descrito por Allain CC [210]. Las muestras fueron incubadas en la solución tampón de reacción (0,5 M tris pH 7,6, 50 mM fenol, 50 mM 4-clorofenol, 1% Tritón X-100, 0,37% colato de sodio, 0,04% 4-aminoantipirina, 0,35 U/ml colesterol esterasa, 0,1 U/ml colesterol oxidasa, 1,1 U/ml peroxidasa). Estas enzimas son las responsables de convertir el colesterol en un cromógeno de máxima absorción a 500 nm aprox. Se reservó parte del buffer sin agregado de enzimas para medir el blanco de la reacción. Se preparó una curva estándar con concentraciones crecientes de colesterol a partir de un stock. Luego, se prepararon tubos conteniendo: 10 µl de muestra (FF o suero de rata) en la dilución adecuada. Todas las muestras se prepararon por triplicado: a una se le agregó buffer sin enzima y a las dos restantes, buffer con enzimas. Luego de una breve agitación, se incubaron todos los tubos en un baño térmico a 37° durante 30 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia de cada una de las muestras a 490 nm en un lector espectrofotométrico.

## **OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE PERFILES LIPOPROTEICOS**

Muestras de FF fueron fraccionadas de acuerdo con su densidad mediante el método de cromatografía líquida rápida de presión (FPLC). Para ello, se prepararon 100 µl de muestra, diluidos en igual volumen de buffer de elución (150 mM NaCl 1mM EDTA, pH 7,8). Las mismas se sometieron a la cromatografía líquida, que utiliza dos columnas Superose 6 (Pharmacia) conectadas en serie. Las proteínas se eluyeron a una velocidad de 0,25 ml/min y se colectaron 40 fracciones de 0,5 ml cada una. Se determinó el colesterol total en cada fracción utilizando el método enzimático ya descrito. A partir



de los datos obtenidos, se realizó un cromatograma que representa el análisis del contenido de colesterol en cada una de las 40 fracciones.

### **CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS DE GRANULOSA-LUTEÍNICAS HUMANAS (CGL)**

Las células de la granulosa luteínicas humanas fueron obtenidas a partir de los FF de pacientes control y de pacientes con alto riesgo a desarrollar OHSS, obtenidos como se mencionó anteriormente. Los aspirados foliculares de cada paciente se centrifugaron a 400 g durante 10 minutos. Luego de remover el sobrenadante, el pellet conteniendo CGLs y glóbulos rojos fue resuspendido en 1 ml de medio DMEM:F12 (1:1 vol/vol) conteniendo 10 mM HEPES suplementado con fungizona (250  $\mu$ g/ml) y gentamicina (10 mg/ml) (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) en tubos estériles de 50 ml y centrifugado a 180 g durante 5 minutos. El pellet resuspendido se colocó cuidadosamente sobre un colchón de Percoll (densidad= 1,085; 3 ml Percoll/ml suspensión celular) (Sigma-Aldrich, MO, USA) en un tubo estéril de 15 ml y centrifugado a 600 g durante 30 minutos. Las CGL fueron aspiradas de la interfase y resuspendidas en 5 ml de buffer lisis ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,15 M;  $\text{KHCO}_3$  10 mM;  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,1 mM) durante 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar los glóbulos rojos. A continuación, se centrifugaron las células remanentes a 180 g durante 5 minutos y se resuspendió el pellet. Las CGL se contaron en cámara de Neubauer y fueron sembradas en placas de 24 wells previamente cubiertos con colágeno, a una densidad de  $3 \times 10^5$  células/well y fueron incubadas durante 48 h en medio de cultivo con 10% de SFB. Luego, las CGL se lavaron e incubaron en medio sin suero suplementado con hCG (1 IU/ml) [211]. Después de 48 h, se añadió buffer lisis y los extractos de proteicos se almacenaron a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso en experimentos posteriores.

## **CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULARES (VSMCs)**

Las células de músculo liso vascular fueron obtenidas de explantos de aorta de ratas Sprague-Dawley de dos meses de edad, utilizando un método adaptado de Xu y col. [212]. En resumen, para cada cultivo celular se aislaron las aortas de 3-5 ratas Sprague-Dawley hembras en condiciones asépticas. Luego, se las separó del tejido adiposo y se las colocó en placas de Petri, que contenían PBS libre de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> previamente enfriado en hielo. La capa adventicia y la porción externa de la capa media se extrajeron de forma mecánica. A continuación, las aortas fueron transferidas a placas de Petri con medio de cultivo DMEM suplementado con 20% SFB y fueron cortadas longitudinalmente. Se realizó un raspado suave con bisturí de la capa endotelial y el tejido remanente fue seccionado en piezas de aproximadamente 1 mm<sup>2</sup>. Para evitar contaminación del cultivo con otros tipos celulares, los segmentos de aorta fueron sometidos a una digestión enzimática con tripsina (0,25%, pH 7,4) durante 8 min a 37°, en constante agitación. De esta manera, en el sobrenadante se forma una suspensión que contiene fibroblastos y células endoteliales, la cual fue descartada. El proceso de tripsinización se repitió nuevamente y, una vez desechada la suspensión celular, se detuvo la digestión con el agregado de DMEM suplementado con 20% de SFB. Las porciones de tejido restantes se distribuyeron en botellas de cultivo T25 sin medio y se colocaron en posición vertical en una estufa incubadora a 37° C para favorecer la adhesión a la superficie. Transcurridas 4 a 6 horas, se colocó la botella en la posición horizontal habitual y se le adicionaron 2 ml de DMEM con 20% de SFB.

Aproximadamente una semana después de la siembra de los explantos, se comenzó a evidenciar proliferación de las VSMCs y migración desde los explantos hacia los alrededores, distribuyéndose por la superficie de la botella. Las células fueron cultivadas en DMEM suplementado con 20% de SFB y antibióticos (AGREGAR), y se les reemplazó el medio cada 72 h. Los cultivos se mantuvieron a 37° C en una atmósfera controlada de 5% de CO<sub>2</sub> y siempre se amplificaron antes de llegar a confluencia. El

tiempo de duplicación estimado de las mismas es de 36-48 horas. Debido a que se trata de un cultivo primario, las VSMCs utilizadas para los ensayos fueron solamente las provenientes de los pasajes 4 a 10.

### **COLOCALIZACIÓN DE N-CADHERINA Y FILAMENTOS DE ACTINA EN VSMCs**

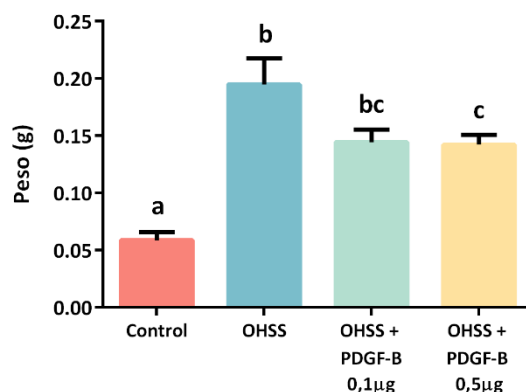
Se evaluó la expresión de N-cadherina por inmunofluorescencia con un anticuerpo específico (sc-7939, Santa Cruz Biotech, USA) junto con la organización del citoesqueleto por visualización de los filamentos de actina por medio de faloidina marcada con TRITC [186,213]. Para ello, las VSMCs crecidas a 100% de confluencia en placas p12 sobre cubreobjetos de vidrio, se incubaron durante 24 h en presencia de los siguientes estímulos: FF de pacientes control y FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS. La incubación solamente con medio fue considerada como un control de las condiciones basales. Pasado este tiempo, se fijaron con paraformaldehído 4% durante 20 min. Luego, se lavaron con PBS, se deshidrataron en acetona 10 min y se incubaron con una solución permeabilizante (0,1% Triton X-100, 10,05% Tween-20, 1%BSA en PBS) durante 30 min. Las células fueron teñidas con 50 ug/ml de faloidina-TRITC (P1951, Sigma-Aldrich) durante 40 min a temperatura ambiente. Luego se lavaron y se incubaron con anticuerpo primario anti-N-cadherina (dilución 1/200) a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con PBS y se incubaron las células con anticuerpo secundario anti-conejo unido a , durante 2 h a T° ambiente. Finalmente, se lavaron en PBS y se montaron con el medio de montaje para fluorescencia Vectashield (H-1000, Vector Laboratories) para ser observadas en un microscopio confocal.

## RESULTADOS

### Modelo de OHSS desarrollado en rata

#### **Efecto del tratamiento con PDGF-B sobre el peso ovárico en el modelo de OHSS desarrollado en rata.**

En primer lugar, se evaluó el peso de los ovarios provenientes de ratas de los distintos grupos experimentales (Fig. 1.2). Los resultados mostraron que el peso de los ovarios del grupo OHSS fue significativamente mayor en relación con los controles ( $p < 0,001$   $n > 8$ /grupo). La administración de PDGF-B en la dosis menor ( $0,1 \mu\text{g}/\text{ovario}$ ) redujo el peso de los ovarios en comparación con animales OHSS, pero esta diferencia no alcanzó la significancia. En cambio, la dosis más alta de PDGF-B ( $0,5 \mu\text{g}/\text{ovario}$ ) logró una disminución significativa del peso ovárico, comparado con el grupo OHSS ( $p < 0,05$ ).

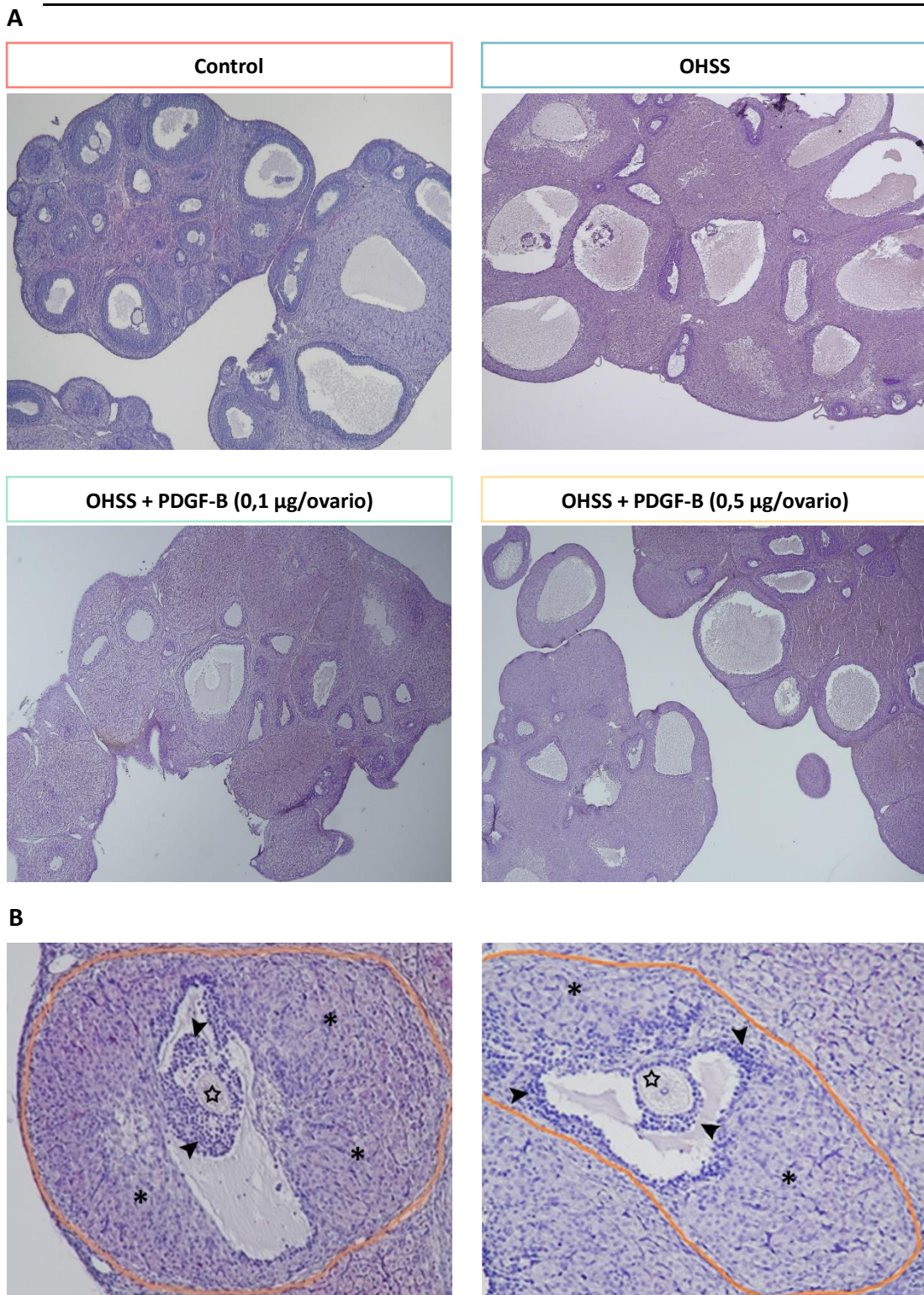


**Figura 1.2: Efecto de PDGF-B sobre el peso ovárico en el modelo de OHSS desarrollado en rata.** Los valores representan la media  $\pm$  ESM ( $N > 8$ /grupo). Las distintas letras indican las diferencias significativas entre grupos, utilizando ANOVA de una vía, seguido por el test de comparación múltiple de Tukey (a vs b, c:  $p < 0,001$ ; b vs c  $p < 0,05$ ).

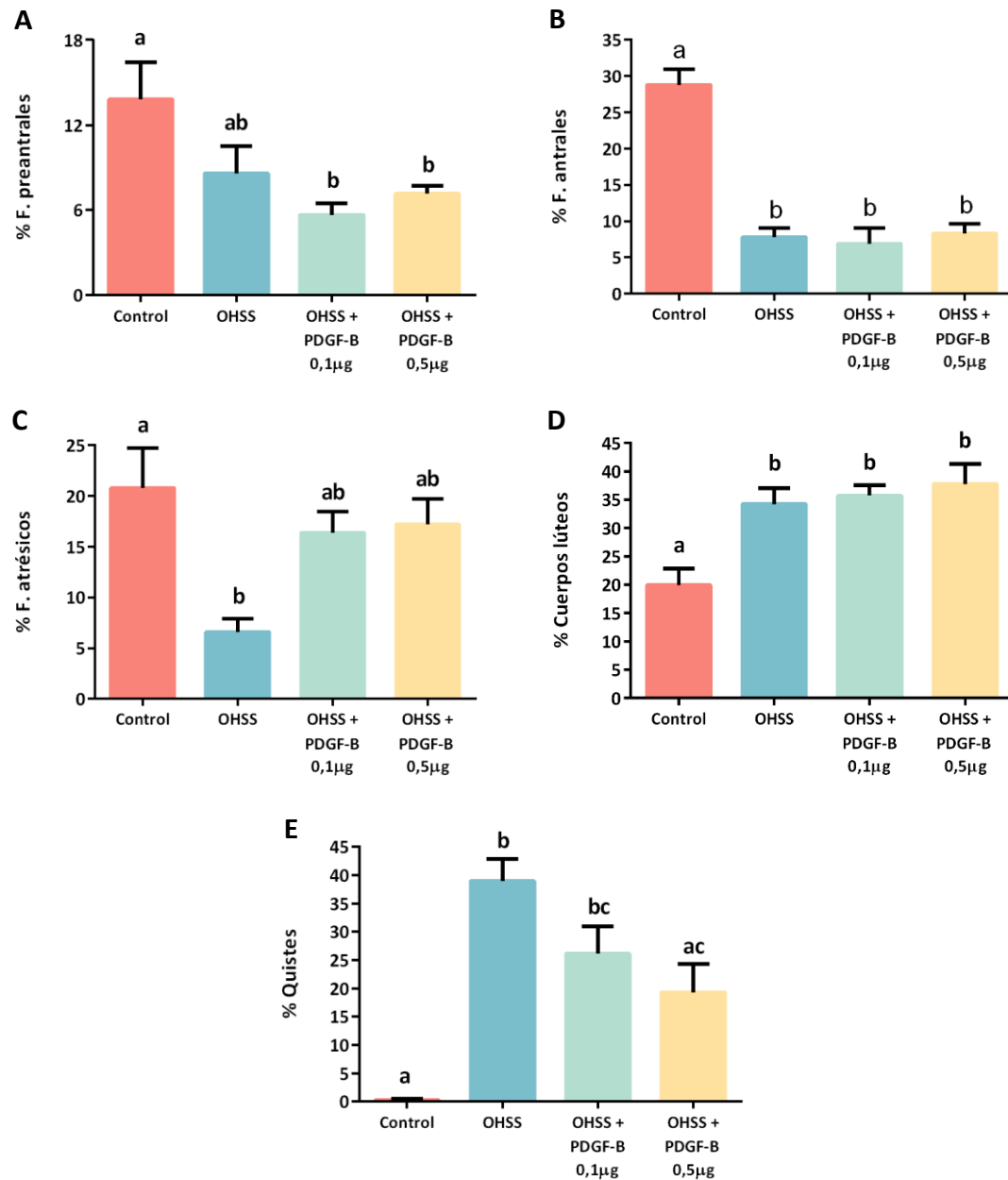
### **Efecto del tratamiento con PDGF-B sobre la dinámica folicular y luteal en ovarios provenientes del modelo de OHSS desarrollado en rata.**

Se realizó un recuento de estructuras ováricas y un análisis morfológico de los ovarios en cada grupo experimental (Figs.1.3 y 1.4). Como ya habíamos demostrado anteriormente [167,169], los animales del modelo OHSS presentan menor porcentaje de folículos antrales y folículos atrésicos respecto del grupo control ( $p<0,001$  y  $p<0,01$ , respectivamente) y un mayor porcentaje de cuerpos lúteos y quistes ( $p<0,05$  y  $p<0,001$ , respectivamente). Los quistes son estructuras anómalas, que corresponden a folículos que comenzaron a luteinizarse sin haber completado la ovulación y, por ende, todavía contienen al ovocito y un remanente de células de la granulosa (Fig. 1.3B). Estas estructuras se encuentran presentes en los animales OHSS, no así en los controles, y son capaces de sintetizar hormonas y factores angiogénicos, contribuyendo al desarrollo de OHSS.

En lo que respecta al tratamiento con PDGF-B, se observó que ninguna de las dosis (0,1 y 0,5  $\mu\text{g}/\text{ovario}$ ) alteraron el desarrollo folicular temprano (Fig. 1.4, A y B), ni la atresia folicular (Fig. 1.4C) ni la formación de cuerpos lúteos (Fig. 1.4D) comparado a OHSS sin tratar. Por otra parte, ambas dosis de PDGF-B aumentaron el porcentaje de folículos atrésicos a niveles comparables al control y la dosis más alta de PDGF-B (0,5  $\mu\text{g}/\text{ovario}$ ) redujo el porcentaje de cuerpo lúteos a valores similares al control. Además, la inyección de PDGF-B en su dosis más alta produjo una reducción significativa en el porcentaje de quistes comparado a OHSS sin tratar (Fig. 2E). Por esta razón, la dosis de 0,5  $\mu\text{g}/\text{ovario}$  de PDGF-B fue elegida para todos los experimentos subsiguientes, ya que logró disminuir de manera significativa el porcentaje de quistes.



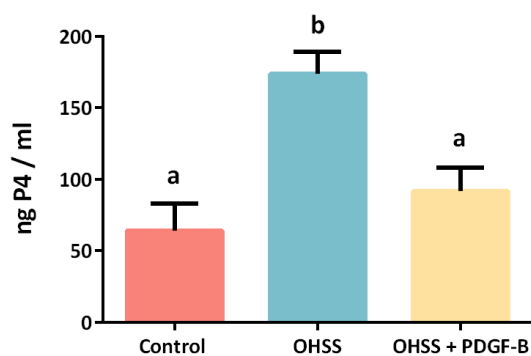
**Figura 1.3: Imágenes representativas de cortes histológicos de ovario coloreados con H&E. A:** Microfotografías de los ovarios de todos los grupos experimentales (control, OHSS, OHSS + PDGF-B (0,1 µg/ovario), en las cuales se observan distintos tipos de estructuras foliculares y luteales. Aumento 100x. **B:** Microfotografías representativas de los quistes presentes en los ovarios del modelo de OHSS desarrollado en rata. Estas estructuras contienen células luteinizadas (asterisco) junto con células de granulosa (cabeza de flecha) y el ovocito (estrella), lo que denota fallas en el proceso de ovulación/luteinización. Aumento: 400x.



**Figura 1.4: Efecto del tratamiento con PDGF-B sobre la dinámica folicular y luteal en un modelo de OHSS desarrollado en rata.** Se cuantificó el número de estructuras ováricas presentes en cada corte. A: % de folículos preantrales/ovario B: % de folículos antrales/ovario C: % de folículos atrésicos/ovario D: % de cuerpos lúteos/ovario E: % de quistes/ovario. Los valores se expresan como la media  $\pm$  ESM ( $N \geq 5$ /grupo). Las distintas letras indican las diferencias significativas entre grupos, utilizando ANOVA de una vía, seguido por el test de comparación múltiple de Tukey.

### Efecto del tratamiento con PDGF-B sobre los niveles séricos de progesterona en el modelo de OHSS desarrollado en rata

A continuación, estudiamos los niveles séricos de progesterona en estos grupos experimentales mediante RIA (Fig.1.5). Se observó un aumento en el contenido de progesterona en el grupo OHSS respecto del control ( $p < 0,01$ ), mientras que con el agregado de PDGF-B disminuyó significativamente respecto del grupo OHSS sin tratar ( $p < 0,05$ ), incluso alcanzando niveles iguales al control.



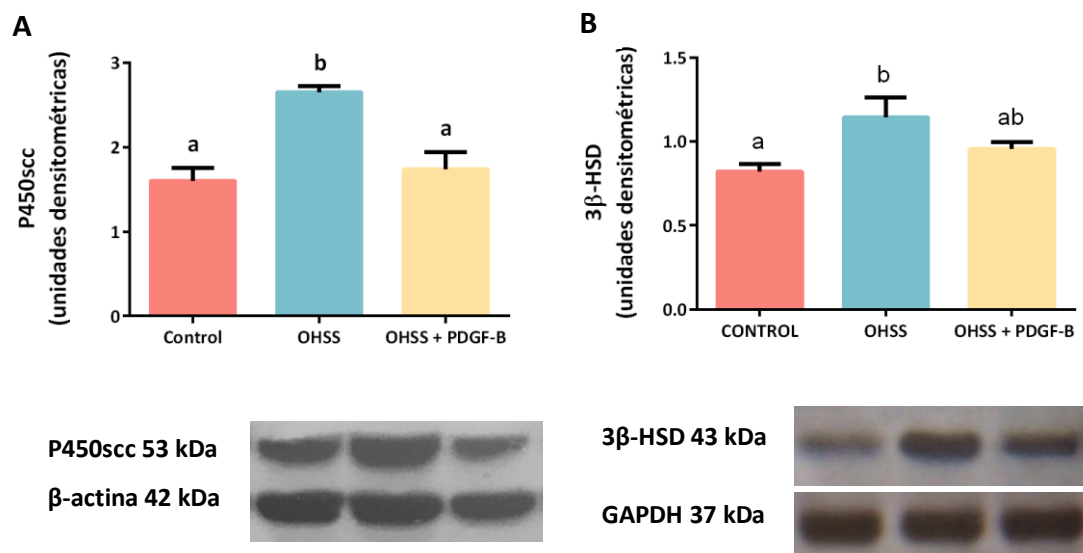
**Figura 1.5: Efecto del tratamiento con PDGF-B sobre los niveles de progesterona en un modelo de OHSS desarrollado en rata.** Los niveles ováricos de progesterona están expresados en ng/ml de suero. Los valores se expresan como la media  $\pm$  ESM ( $n \geq 5$ /grupo). Las distintas letras indican las diferencias significativas entre grupos, utilizando ANOVA de una vía, seguido por el test de comparación múltiple de Tukey (a vs b:  $p < 0,01$ )

### Efecto del tratamiento con PDGF-B sobre los niveles proteicos de P450scc y 3 $\beta$ -HSD en ovarios provenientes del modelo de OHSS desarrollado en rata.

Luego, se estudiaron dos enzimas claves en la síntesis de hormonas esteroideas, como son la P450scc (también conocida como CYP11A1) que cataliza la conversión de colesterol en pregnenolona y la 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD), que convierte la pregnenolona en progesterona (Fig. 1.6). En ambos casos, los niveles de expresión proteica de estas enzimas aumentaron en el grupo OHSS en



comparación con el grupo control (P450scc:  $p < 0,01$  y  $3\beta$ -HSD:  $p < 0,05$ ). Por otra parte, la administración de PDGF-B logró disminuir significativamente la expresión de P450scc respecto del grupo OHSS ( $p < 0,01$ ). Por otra parte, la expresión proteica de  $3\beta$ -HSD en el grupo tratado con PDGF-B disminuyó a niveles comparables al control.

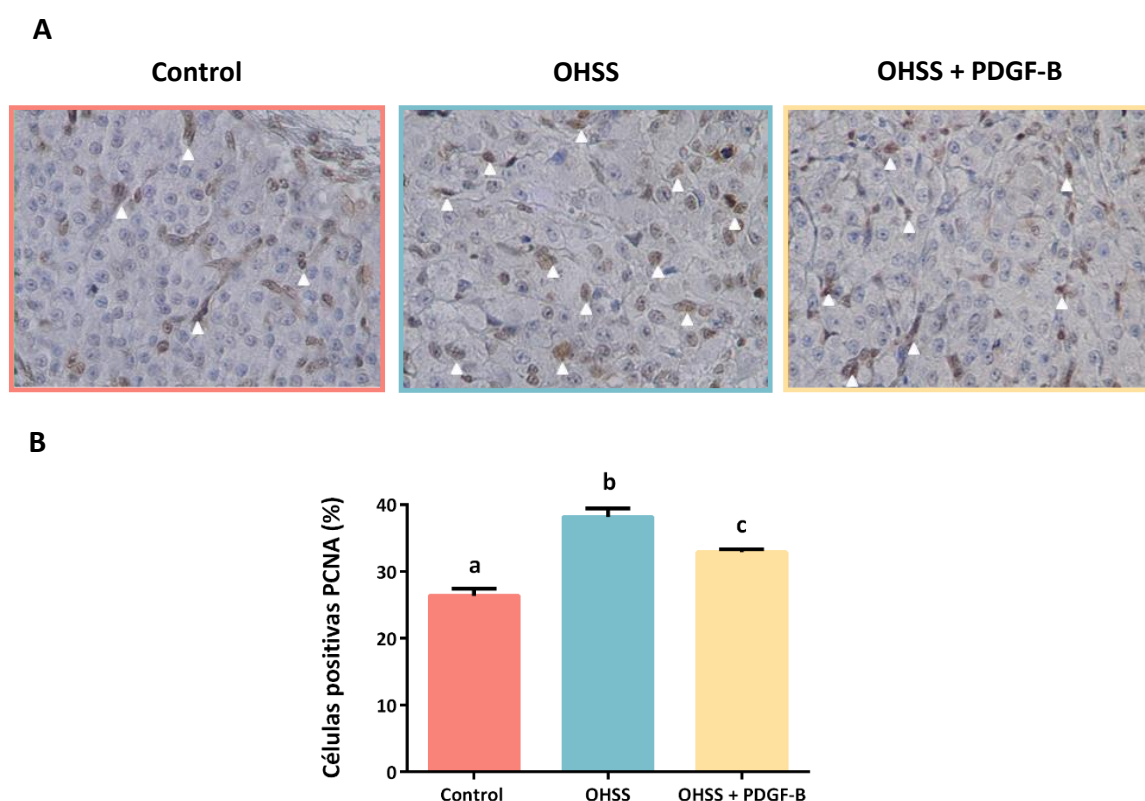


**Figura 1.6: Efecto de PDGF-B sobre la expresión ovárica de proteínas relacionadas con la síntesis de hormonas esteroideas.** El contenido proteico de P450scc,  $3\beta$ -HSD,  $\beta$ -actina y GAPDH fue analizado por Western blot en los distintos grupos experimentales (control, OHSS y OHSS + PDGF-B). Los gráficos de barra muestran la cuantificación densitométrica de cada proteína (paneles superiores), junto con imágenes de inmunoblots representativos (paneles inferiores). A: Análisis de la expresión de P450scc, relativizada a  $\beta$ -actina como control de carga. B: Análisis de la expresión de  $3\beta$ -HSD, relativizada a GAPDH como control de carga. Los valores fueron expresados en unidades densitométricas arbitrarias y corresponden a la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes,  $n=5$ /grupo. Las distintas letras indican las diferencias significativas entre grupos, utilizando ANOVA de una vía, seguido por el test de comparación múltiple de Tukey.

### **Efecto del tratamiento con PDGF-B sobre la proliferación de células luteales en el modelo de OHSS desarrollado en rata.**

Para evaluar si el tratamiento con PDGF-B posee un efecto sobre el crecimiento celular en los CL provenientes del modelo de OHSS, se realizó una inmunohistoquímica para el marcador de proliferación PCNA. Se cuantificaron los núcleos marcados positivamente en cuerpos lúteos provenientes de los tres grupos experimentales. Tal

como muestra la Fig. 1.7, se observó un aumento significativo en el porcentaje de células marcadas en el grupo OHSS respecto del grupo control ( $p < 0,01$ ), mientras que el tratamiento con PDGF-B produjo una disminución significativa en este parámetro, respecto del grupo OHSS sin tratar ( $p < 0,05$ ). Cabe mencionar que la mayoría de las células marcadas en el grupo OHSS tenían un núcleo esférico grande con numerosas gotas lipídicas en el citoplasma, lo que permite suponer que son células luteales grandes.



**Figura 1.7: Efecto del tratamiento con PDGF-B sobre la proliferación celular en CL del modelo de OHSS desarrollado en rata.** A: Microfotografías representativas de cuerpos lúteos pertenecientes a animales control (izquierda), OHSS (medio) y OHSS+PDGF-B (derecha). Las flechas blancas indican núcleos marcados positivamente. Aumento: 400x. B: Porcentaje (%) de células marcadas por IHQ para PCNA, calculado como número de núcleos marcados/número total de núcleos del cuerpo lúteo en estudio. Se analizaron 5 CL/animal, 5 animales/grupo. Los valores se expresan como la media  $\pm$  ESM. Las distintas letras indican las diferencias significativas entre grupos, utilizando ANOVA de una vía, seguido por el test de comparación múltiple de Tukey.

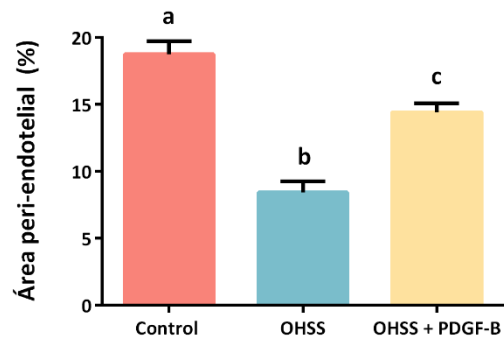
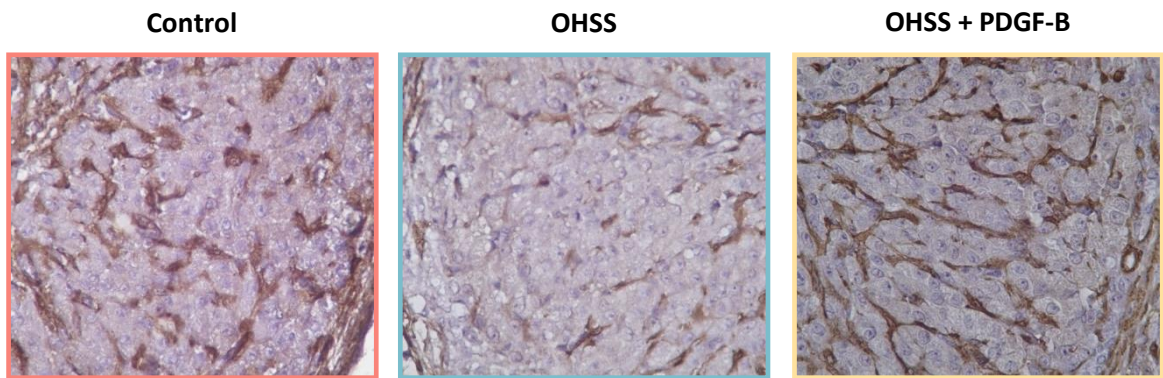
### **Efecto del tratamiento con PDGF-B sobre la estabilidad vascular en un modelo de OHSS desarrollado en rata**

Para estudiar un posible efecto del agregado de PDGF-B sobre la estabilidad de los vasos sanguíneos se realizó una inmunohistoquímica (IHQ) para detectar en cuerpos lúteos la proteína  $\alpha$ -SMA, marcador de células peri-endoteliales (Fig. 1.8A). Se observó una importante disminución en el área peri-endotelial en el grupo OHSS respecto del control ( $p < 0,001$ ), mientras que el agregado de PDGF-B aumentó significativamente el área peri-endotelial respecto del grupo OHSS sin tratar ( $p < 0,01$ ).

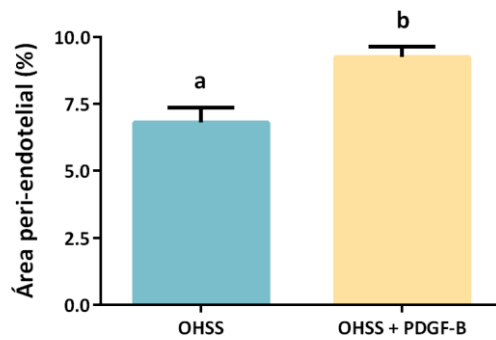
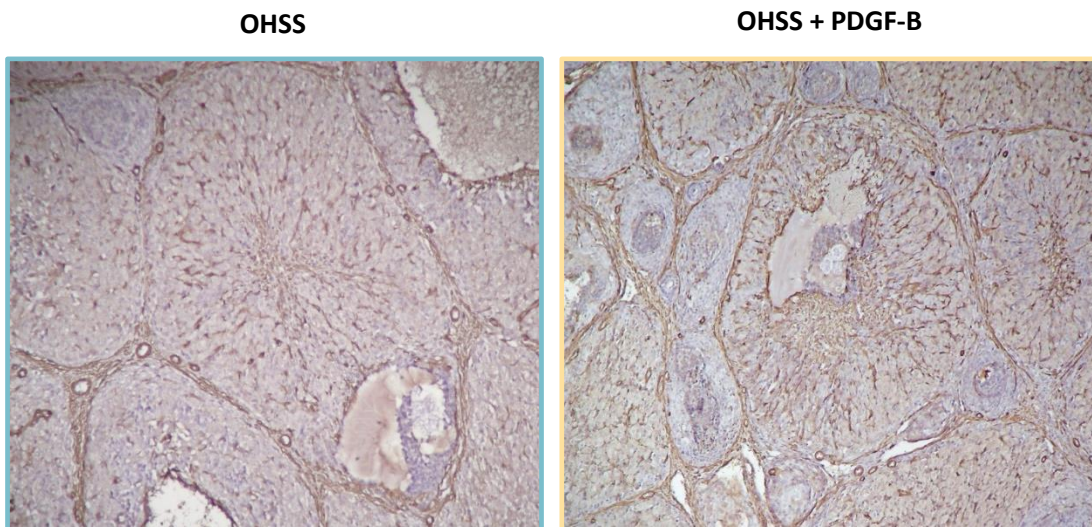
Debido a que los quistes luteales son estructuras morfológicas que también son capaces de sintetizar P4 y factores pro-angiogénicos, se decidió evaluar el área peri-endotelial en estos quistes mediante IHQ, utilizando nuevamente  $\alpha$ -SMA como marcador (Fig. 1.8B). Se observó que el área peri-endotelial era significativamente mayor en los quistes provenientes de los animales tratados con PDGF-B, respecto de los animales OHSS sin tratar. Cabe mencionar que sólo se estudiaron los quistes en estos grupos experimentales, ya que los mismos no están presentes en animales controles.

**Página siguiente - Figura 1.8: Efecto del tratamiento con PDGF-B sobre el reclutamiento de células peri-endoteliales en un modelo de OHSS desarrollado en rata.** A: Área peri-endotelial en CL. Panel superior: Microfotografías representativas de CL pertenecientes a los grupos control (izquierda), OHSS (medio) y OHSS + PDGF-B (derecha). Aumento: 400x. Panel inferior: Porcentaje (%) de área peri-endotelial, calculada como el área ocupada por vasos sanguíneos inmunopositivos/área total del CL en estudio. Se estudiaron 4 CLs/animal, 5 animales/grupo. Los valores se expresan como la media  $\pm$  ESM. Las distintas letras indican las diferencias significativas entre grupos, utilizando ANOVA de una vía, seguido por el test de comparación múltiple de Tukey. B: Área peri-endotelial en quistes. Panel superior: Microfotografías representativas de distintos quistes pertenecientes a animales de los grupos OHSS (izquierda) y OHSS + PDGF-B (derecha). Panel inferior: Porcentaje (%) de área peri-endotelial, calculada como el área ocupada por vasos sanguíneos inmunopositivos/área total del quiste en estudio. Se estudiaron 5 quistes/animal, 5 animales/grupo. Los valores se expresan como la media  $\pm$  ESM. Las distintas letras indican las diferencias significativas entre grupos, utilizando test de Student no pareado.

**A**



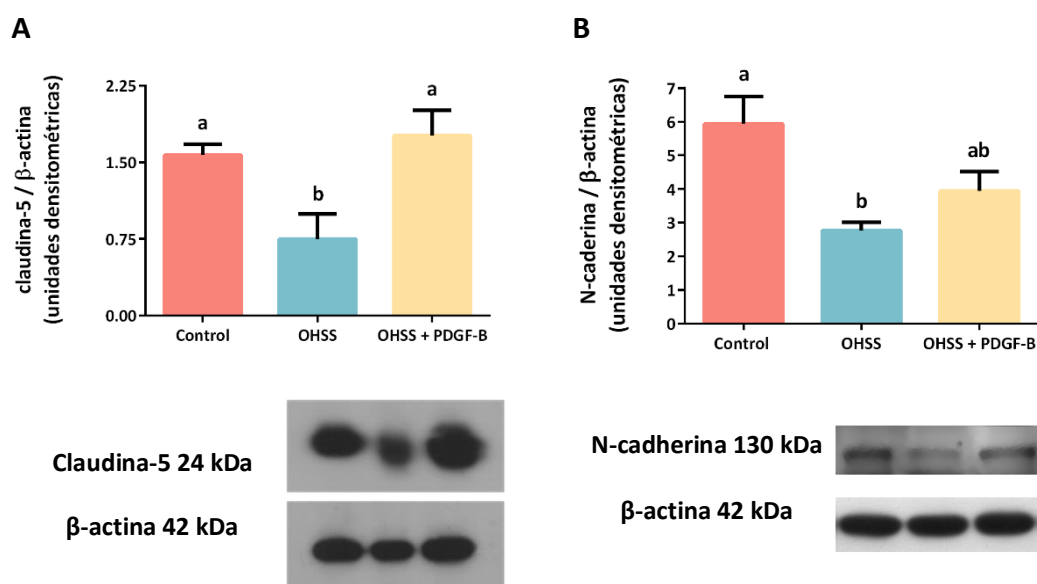
**B**



### Efecto del tratamiento con PDGF-B sobre las uniones intercelulares en ovarios prevenientes del modelo de OHSS desarrollado en rata

Se sabe que las uniones intercelulares intervienen en la adhesión, comunicación y permeabilidad entre células esteroideogénicas, células endoteliales y células peri-endoteliales [214,215]. Sobre la base de estos antecedentes, se decidió estudiar la expresión proteica de la claudina-5 (proteína endotelial clave de uniones estrechas) y de la N-cadherina (proteína clave de uniones adherentes).

Por Western blot, se observó que la expresión proteica de la claudina-5 disminuyó significativamente en el grupo OHSS respecto al control ( $p < 0,05$ ), mientras que el tratamiento con PDGF-B produjo un aumento significativo de este parámetro respecto al grupo OHSS sin tratar ( $p < 0,05$ ) incluso alcanzando niveles similares al control. (Fig.1.9). Además, se observó que la expresión proteica de N-cadherina disminuyó significativamente en el grupo de OHSS comparado al control ( $p < 0,05$ ). Por otra parte, el tratamiento con PDGF-B aumentó los niveles de esta proteína a niveles similares al control.

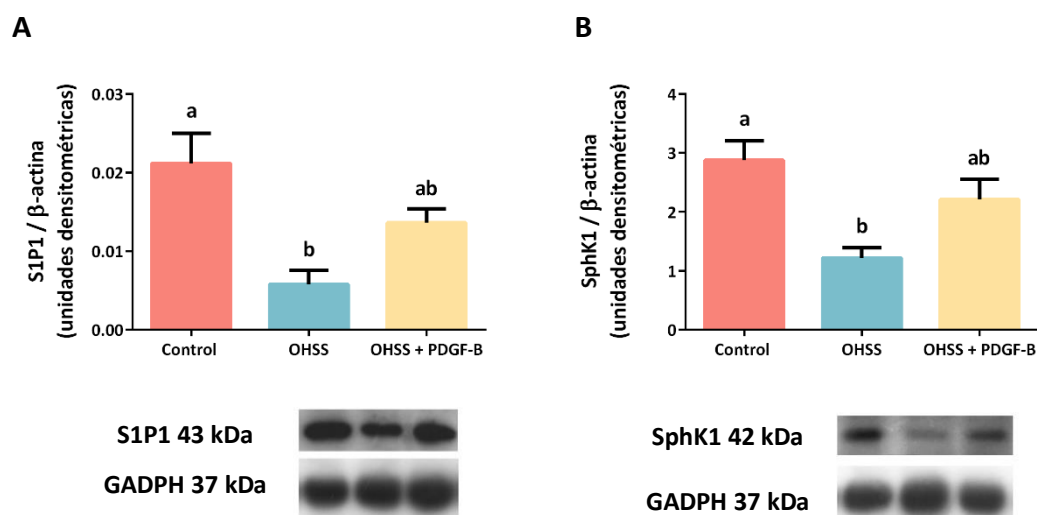


**Página anterior - Figura 1.9: Efecto del tratamiento con PDGF-B sobre la expresión ovárica de proteínas involucradas en uniones intercelulares en el modelo de OHSS desarrollado en rata.** El contenido proteico de claudina-5, N-cadherina y  $\beta$ -actina fue analizado por Western blot en los distintos grupos experimentales (control, OHSS y OHSS + PDGF-B). Los gráficos de barra muestran la cuantificación densitométrica de cada proteína (paneles superiores), junto con imágenes de inmunoblots representativos (paneles inferiores). **A:** Análisis de la expresión de Claudina-5, relativizada a  $\beta$ -actina como control de carga. **B:** Análisis de la expresión de N-cadherina, relativizada a  $\beta$ -actina como control de carga. Los valores fueron expresados en unidades densitométricas arbitrarias y corresponden a la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes, n=5/grupo. Las distintas letras indican las diferencias significativas entre grupos, utilizando ANOVA de una vía, seguido por el test de comparación múltiple de Tukey.

### **Efecto del tratamiento con PDGF-B sobre el sistema de S1P en ovarios provenientes del modelo de OHSS desarrollado en rata**

Como se mencionó anteriormente, el esfingolípido S1P es un factor angiogénico no clásico que cumple funciones fisiológicas tanto en el ovario humano como en roedor [134,167,168]. Además, la unión de S1P a sus receptores induce la interacción de la célula endotelial con el pericito mediante la expresión de N-cadherina, regulando la permeabilidad vascular. En base a estos antecedentes, se decidió estudiar la expresión proteica de uno de los principales receptores de S1P, S1P1, en ovarios provenientes del modelo de OHSS (Fig 1.10A). Los resultados mostraron que la expresión proteica de este receptor disminuye significativamente en el grupo OHSS comparado al grupo control ( $p < 0,05$ ). Por otra parte, el grupo tratado con PDGF-B tuvo una mayor expresión de este receptor, alcanzando niveles similares al control.

Debido a que se ha demostrado en otros sistemas que la activación de los receptores de PDGF modula la expresión de SphK1 (enzima responsable de sintetizar S1P a partir de su precursor, la esfingosina)[216], se decidió evaluar el efecto de PDGF-B sobre la expresión de esta enzima (Fig. 1.10B). Los resultados mostraron que en el grupo OHSS disminuyó significativamente la expresión proteica de SphK1 comparado al grupo control ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, la administración de PDGF-B aumentó la expresión de esta enzima a valores similares al control.

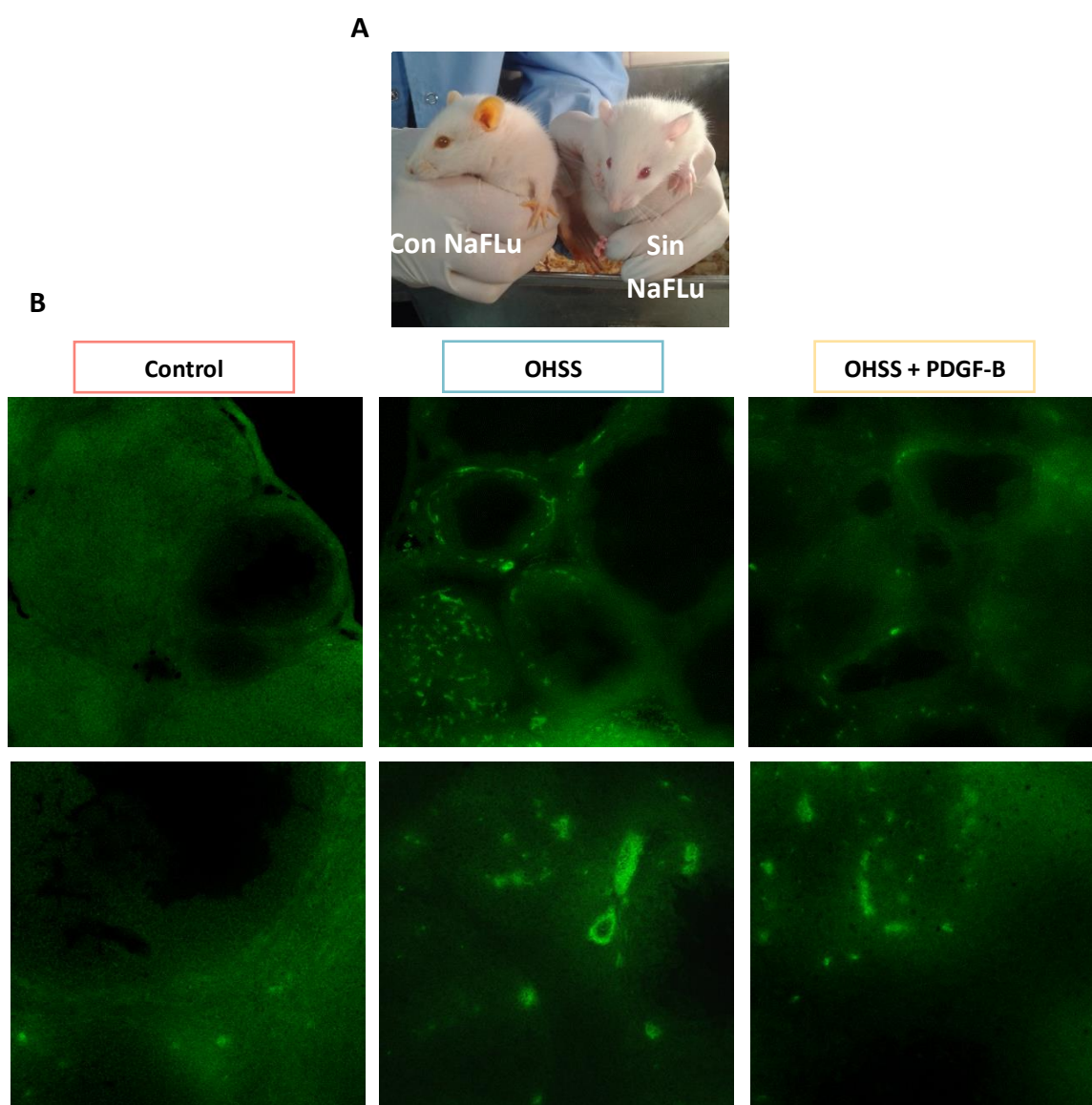


**Figura 1.10: Efecto del tratamiento con PDGF-B sobre la expresión ovárica de proteínas del sistema de SIP en el modelo de OHSS desarrollado en rata.** El contenido proteico del receptor S1P1, SphK1 y GADPH fue analizado por Western blot en los distintos grupos experimentales (control, OHSS y OHSS + PDGF-B). Los gráficos de barra muestran la cuantificación densitométrica de cada proteína (paneles superiores), junto con imágenes de inmunoblots representativos (paneles inferiores). **A:** Análisis de la expresión de S1P1, relativizada a GADPH como control de carga. **B:** Análisis de la expresión de SphK1, relativizada a GADPH como control de carga. Los valores fueron expresados en unidades densitométricas arbitrarias y corresponden a la media  $\pm$  ESM de 3 experimentos independientes,  $n=5$ /grupo. Las distintas letras indican las diferencias significativas entre grupos, utilizando ANOVA de una vía, seguido por el test de comparación múltiple de Tukey.

### **Efecto del tratamiento con PDGF-B sobre la permeabilidad vascular en ovario proveniente del modelo de OHSS desarrollado en rata**

Puesto que la excesiva permeabilidad vascular es una de las características más importantes de este síndrome, se evaluó el efecto de PDGF-B sobre la permeabilidad de los vasos sanguíneos ováricos en el modelo de OHSS utilizando un ensayo de extravasación de NaFlu. Este es un compuesto inocuo y fluorescente que es inyectado vía intraperitoneal y que pasa rápidamente al torrente sanguíneo del animal y permite evidenciar los puntos de alta permeabilidad vascular. Se analizaron las zonas de extravasación mediante microscopía confocal en cortes histológicos de ovarios provenientes de los distintos grupos experimentales (Fig. 1.11).

Los resultados mostraron que en los ovarios de animales OHSS exhibían numerosos focos de extravasación de NaFlu alrededor de los vasos sanguíneos, en las redes vasculares que rodean a los folículos, en estructuras luteales y en el estroma ovárico, en comparación con el grupo control. Por otra parte, en los ovarios que fueron tratados con PDGF-B se observaron áreas de extravasado menos extensas y de mayor similitud con el grupo control, tal como muestra la figura 1.9.



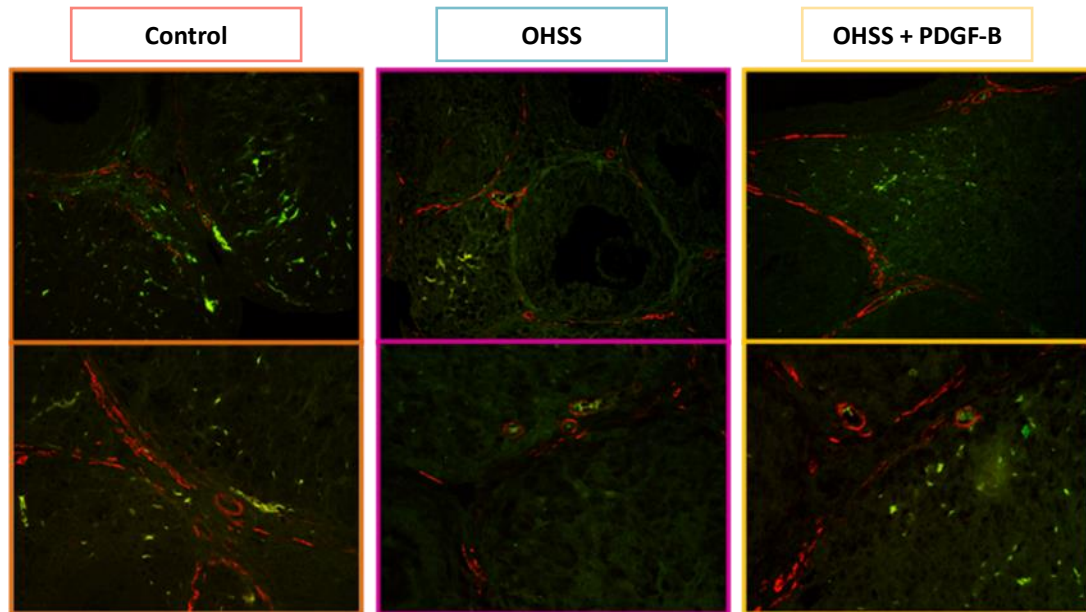


**Página anterior - Figura 1.11: Efecto del tratamiento con PDGF-B sobre la permeabilidad vascular en ovarios provenientes del modelo de OHSS en rata.** A: Fotografías representativas de dos ratas Sprague Dawley, antes (derecha) y después (izquierda) de la inyección con NaFlu. Nótese la coloración anaranjada de los tejidos irrigados y el tono verdoso de los ojos, característico de una correcta circulación sistémica de NaFlu. B: Microfotografías que muestran tanto los vasos sanguíneos (v) del estroma como cuerpos lúteos (CL). Las flechas indican los focos de extravasado de NaFlu. Se estudiaron 10 campos/animal, 5 animales/grupo. Aumento: 100x (paneles superiores) y 200x (paneles inferiores).

### **Efecto del tratamiento con PDGF-B sobre la presencia de células de músculo liso vasculares y la deposición de matriz extracelular**

Dado que la permeabilidad vascular exacerbada es característica de este síndrome que lleva a la presencia de ascitis en las pacientes, se decidió evaluar el efecto de PDGF-B no solamente sobre las células peri-endoteliales, sino también sobre la integridad de la lámina basal. Con esta finalidad, se realizó una inmunofluorescencia doble para marcar  $\alpha$ -SMA y colágeno IV (sustancia que forma parte de la membrana basal y es esencial para la interacción entre endotelio y peri-endotelio) en cortes histológicos de ovario de los diferentes grupos experimentales.

Como muestra la Fig. 1.12, en el grupo OHSS hay una fuerte disminución de la marca de  $\alpha$ -SMA, así como también de la marca de colágeno IV. Esta disminución se ve revertida (por lo menos parcialmente) por la administración de PDGF-B. Esto indicaría que PDGF-B aumenta el reclutamiento de células peri-endoteliales y la deposición de colágeno IV, ambos procesos fundamentales para la correcta interacción entre células endoteliales, peri-endoteliales y matriz extracelular, contribuyendo así a la estabilidad vascular.



**Figura 1.12: Efecto del tratamiento con PDGF-B sobre la presencia de células de músculo liso vasculares y la deposición de matriz extracelular.** Microfotografías representativas de ovarios control (izquierda), OHSS (medio) y OHSS+PDGF-B (derecha) inmunomarcados para  $\alpha$ -SMA (rojo) y colágeno IV (verde). Paneles superiores: aumento 20x; paneles inferiores: aumento 40x. Se estudiaron 4 cortes/animal, 5 animales/grupo.

## **FF humanos**

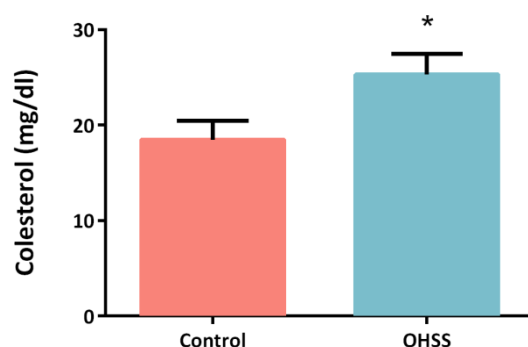
Los siguientes resultados fueron obtenidos en el Laboratorio de Investigación del Departamento de Gastroenterología, Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago de Chile, bajo la dirección de la Dra. Dolores Busso.

### **Transporte de colesterol en fluidos foliculares humanos de pacientes control y pacientes con alto riesgo a desarrollar OHSS**

Entre los numerosos factores que contribuyen a desencadenar OHSS, se encuentran los elevados niveles hormonales, tanto de estrógenos como progestágenos, que presentan las pacientes con riesgo a desarrollarlo. La mayoría de los casos de OHSS están acompañados de una elevada concentración sérica de E2, que se utiliza incluso como factor predictor [217]. Se ha reportado que el aumento en los niveles de progesterona contribuye a la patofisiología del OHSS, tanto en humanos [218] como en un modelo de OHSS en rata [205]. En este y otros trabajos de nuestro laboratorio, hemos demostrado que los niveles séricos de P4 se encuentran aumentados en el modelo de OHSS desarrollado en rata, en comparación con animales control [167,190] Además, hemos observado que los niveles de  $3\beta$ -HSD, P450scc y StAR están aumentados en este modelo [167].

Sobre la base de estos antecedentes, nuestro próximo objetivo fue evaluar el transporte de colesterol a las células foliculares, necesario para la producción de altos niveles de hormonas esteroideas en este síndrome. Para ello, analizamos el perfil lipídico en FF provenientes de pacientes controles y pacientes con riesgo a desarrollar OHSS.

Se estudiaron los FF de pacientes entre 25 y 39 años, clasificadas en pacientes control y pacientes con riesgo a desarrollar OHSS. En primer lugar, se realizó un ensayo enzimático para la determinación de los niveles de colesterol total en los FF, mediante el método enzimático que combina el uso de colesterol esterasa y colesterol oxidasa [210]. Tal y como muestra la Fig. 1.13, la concentración de colesterol en FF de pacientes OHSS resultó significativamente mayor a la de pacientes control.

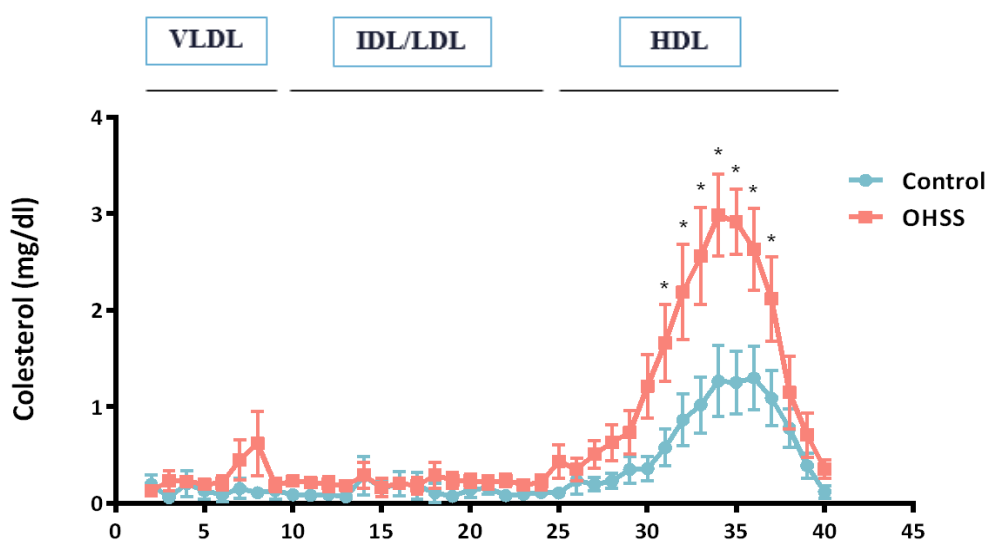


**Figura 1.13: Niveles de colesterol total en FF de pacientes control y pacientes con riesgo a desarrollar OHSS.** Los niveles de colesterol están expresados en mg/dl. Los valores se expresan como la media  $\pm$  ESM (n=18/grupo). Los asteriscos indican diferencias significativas, utilizando el test de Student no pareado (\*:  $p < 0,05$ ).

Luego, se obtuvieron y analizaron los perfiles lipoproteicos presentes en los FF en base al método de cromatografía líquida rápida de presión (FPLC) y se determinó el colesterol total en cada fracción. Se encontró que los perfiles lipoproteicos de pacientes controles difieren significativamente de aquellos de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS (Figura 1.14). El pico correspondiente a las partículas de HDL-colesterol es más alto en FF de pacientes OHSS que en pacientes controles, y además está ligeramente corrido hacia la izquierda. Esto es indicativo de partículas de mayor tamaño que contienen más colesterol, comparadas con las HDL-colesterol de pacientes control.

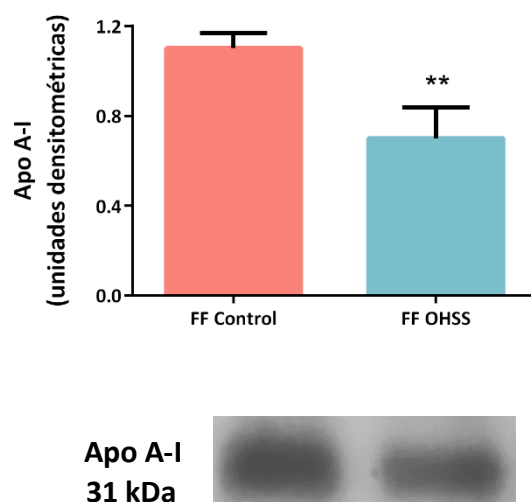
Para completar esta caracterización, se estudió además por Western blot el contenido proteico de apolipoproteína A-I (ApoAI) en estos FF, ya que esta es una de las

apolipoproteínas principales que conforman las partículas de HDL. Como puede verse en la Fig. 1.15, los niveles de ApoAI se encuentran significativamente disminuidos en los FF provenientes de pacientes OHSS, comparado a FF de pacientes controles.

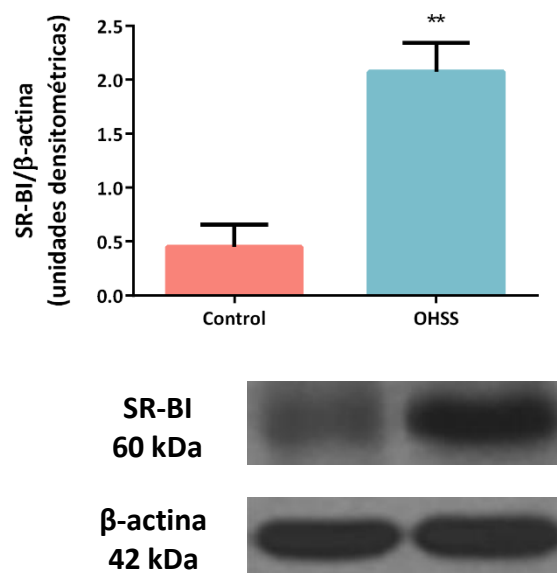


**Figura 1.14: Perfiles de contenido de lipoproteínas de FF de pacientes control y pacientes con riesgo a desarrollar OHSS.** El contenido de colesterol de las fracciones se determinó por un ensayo enzimático. Las posiciones aproximadas de las eluciones de VLDL, LDL y HDL están indicadas con líneas y fueron determinadas por análisis de estándares de lipoproteínas humanas. El cromatograma muestra valores la media de colesterol total  $\pm$  ESM en cada fracción ( $n \geq 8$ /grupo). Los asteriscos indican diferencias significativas, utilizando el test de Student no pareado (\*:  $p < 0,05$ ).

Por último, se evaluó la expresión proteica del receptor SR-BI, proteína de gran relevancia para el transporte de colesterol entre las partículas de HDL y los distintos tejidos, en CGLs aisladas de pacientes control y de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS. Los resultados mostraron que los niveles de expresión del receptor SR-BI se hallan aumentados en las CGL de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS respecto a CGL de pacientes control (Figura 1.16).



**Figura 1.15: Niveles de Apo A-I en FF provenientes de pacientes control y pacientes con riesgo a desarrollar OHSS.** Panel superior: Cuantificación densitométrica del contenido de Apo A-I en FF, analizado por Western blot. Los valores fueron expresados en unidades densitométricas arbitrarias y corresponden a la media  $\pm$  ESM, relativizada al contenido proteico de la muestra según las bandas obtenidas por tinción con S-Ponceau (n=13/grupo). Los asteriscos indican diferencias significativas, utilizando el test de Student no pareado (\*\*:  $p < 0,01$ ). Panel inferior: Inmunoblot representativo del contenido de Apo A-I.

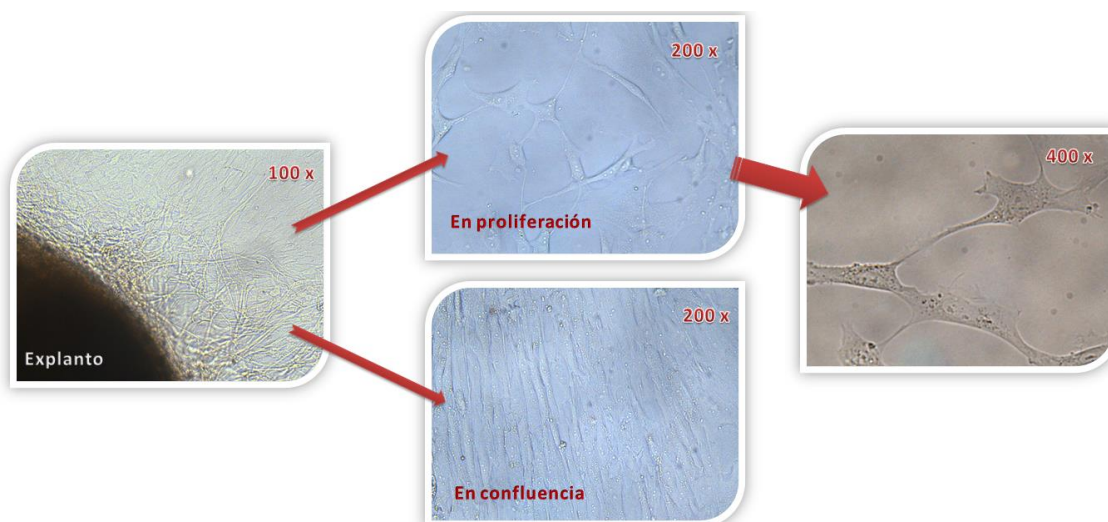


**Figura 1.16: Expresión del receptor SR-BI en células de granulosa luteínica humanas de pacientes control y de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS.** Panel superior: Cuantificación densitométrica del contenido de SR-BI analizado por Western blot. Los valores fueron expresados en unidades densitométricas arbitrarias y corresponden a la media  $\pm$  ESM, relativizada a  $\beta$ -actina como control de carga (n $\geq$ 5/grupo). Los asteriscos indican diferencias significativas, utilizando el test de Student no pareado (\*\*:  $p < 0,01$ ). Panel inferior: Inmunoblot representativo del contenido de SR-BI.

## **Cultivo primario de VSMCs de aorta de rata**

### **Caracterización del cultivo primario de VSMCs aisladas de aorta de rata**

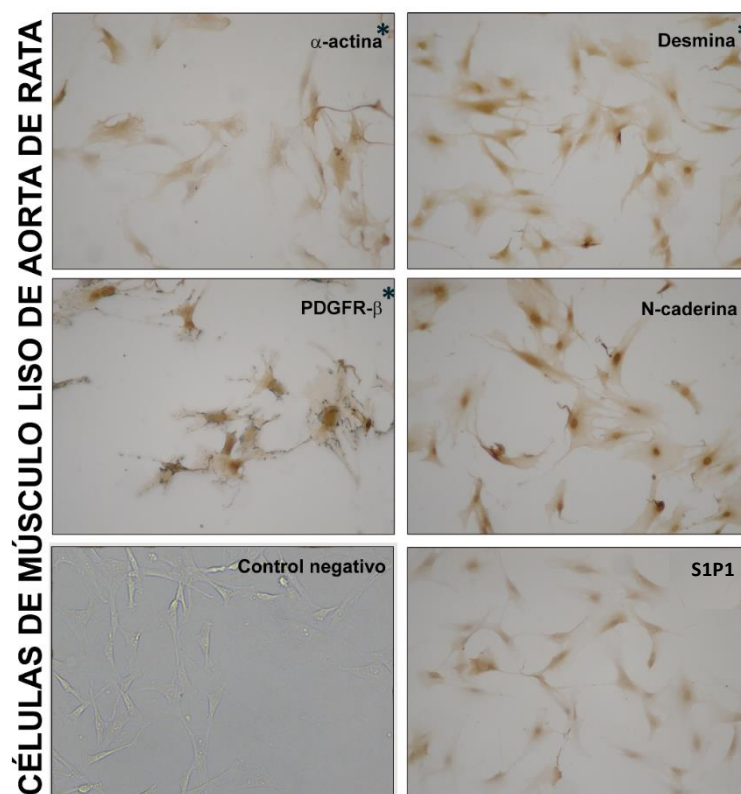
Hasta ahora no existe ningún trabajo que evalúe el efecto directo de los FF sobre la madurez e integridad vascular en VSMCs, ni se ha estudiado la posible participación del sistema de S1P en el aumento de la permeabilidad vascular característica del desarrollo de OHSS. Para poder alcanzar este objetivo y ante la dificultad que conlleva conseguir material para cultivo primario de origen humano, se buscó optimizar un cultivo primario de VSMCs a partir de explantos de aorta de rata adulta. Para el aislamiento de las mismas, se utilizaron ratas Sprague Dawley de dos meses y se empleó el protocolo descrito por Xu y col. [212], detallado en la sección de Metodología de este capítulo. Una vez aisladas, las VSMCs en cultivo mostraron la morfología característica de colinas y valles (Fig. 1.17)



**Figura 1.17:** Microfotografías del cultivo primario de VSMCs obtenidas a partir de aorta de rata. Las células presentan la morfología típica de colinas y valles esperada para este tipo celular. Las fotografías fueron obtenidas con distintos aumentos (100x, 200x y 400x).

Para caracterizar las células obtenidas y confirmar que se trataba de VSMCs, se realizaron por IHQ distintos marcadores validados para su identificación [72]. Las células resultaron positivas por IHQ para  $\alpha$ -SMA, desmina y PDGFR $\beta$ , todos ellos

marcadores específicos de VSMCs (Fig. 1.18). Además, se estudió la presencia de N-cadherina, una molécula de adhesión intercelular esencial para la interacción entre células peri-endoteliales y endoteliales, y la presencia de S1P1, uno de los receptores principales de S1P. Las células resultaron positivas para la expresión de ambas proteínas, cuya regulación fue estudiada más adelante.

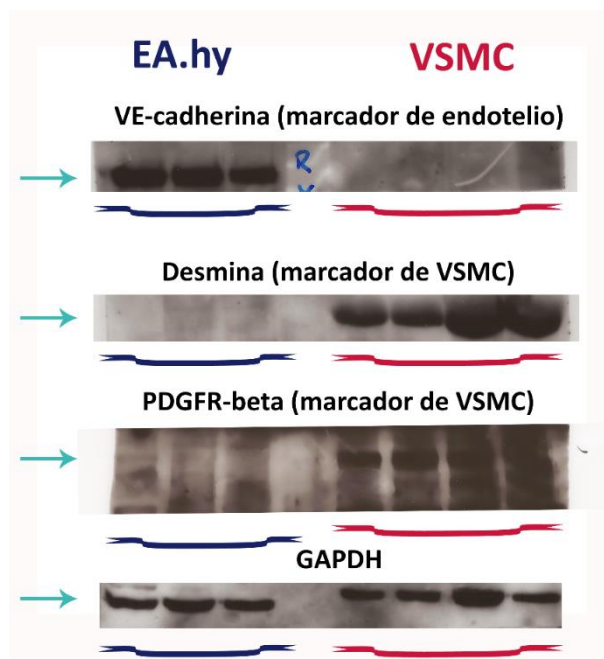


**Figura 1.18: Expresión de diferentes proteínas específicas de VSMCs aisladas a partir de aorta de rata.** Fotografías de células aisladas de aorta de rata inmunomarcadas mediante IHQ. Las células resultaron inmunopositivas para los marcadores  $\alpha$ -SMA, desmina y PDGFR- $\beta$ , así como también para N-cadherina y el receptor S1P1. Aumento: 200x.

Además, se comparó mediante Western blot la expresión de distintas proteínas respecto de una línea celular endotelial (EA.hy), tal como se muestra en la Fig. 1.19. Las células VSMCs aisladas de aorta no presentaron expresión de VE-cadherina (marcador endotelial) pero sí expresión de desmina y PDGR- $\beta$  (marcadores de células peri-endoteliales), de manera contraria a lo expresado por las células EA.hy. Todos estos



resultados, resumidos en la Tabla 1.3, confirman que el cultivo primario obtenido se encuentra altamente enriquecido de VSMCs y, por ende, se utilizó este cultivo para llevar a cabo los estudios propuestos.



**Figura 1.19: Expresión proteica de diferentes marcadores de fenotipo celular en células EA.hy y en VSMCs aisladas de aorta de rata.** Las fotografías muestran inmunoblots representativos de ambos tipos celulares para VE-cadherina, desmina y PDGFR- $\beta$ . Las primeras tres calles corresponden a extractos proteicos de la línea endotelial EA.hy, mientras que las calles restantes corresponden a extractos proteicos de VSMCs aisladas a partir de aorta de rata.

| Marcador       | EA.hy (células endoteliales) | VSCMs de rata | Técnica           |
|----------------|------------------------------|---------------|-------------------|
| VE-CADHERINA   | +                            | -             | Western Blot      |
| DESMINA        | -                            | +             | Western Blot, IHQ |
| PDGFR- $\beta$ | -                            | +             | Western Blot, IHQ |
| $\alpha$ - SMA | -                            | +             | IHQ               |

**Tabla 1.3: Descripción de los marcadores presentes en células EA.hy (línea celular endotelial) y VSMCs aisladas de rata.**

**Efecto de S1P en presencia de FF de pacientes controles y con riesgo a desarrollar OHSS sobre el citoesqueleto de actina y la localización de N-cadherina en VSMCs aisladas de aorta de rata**

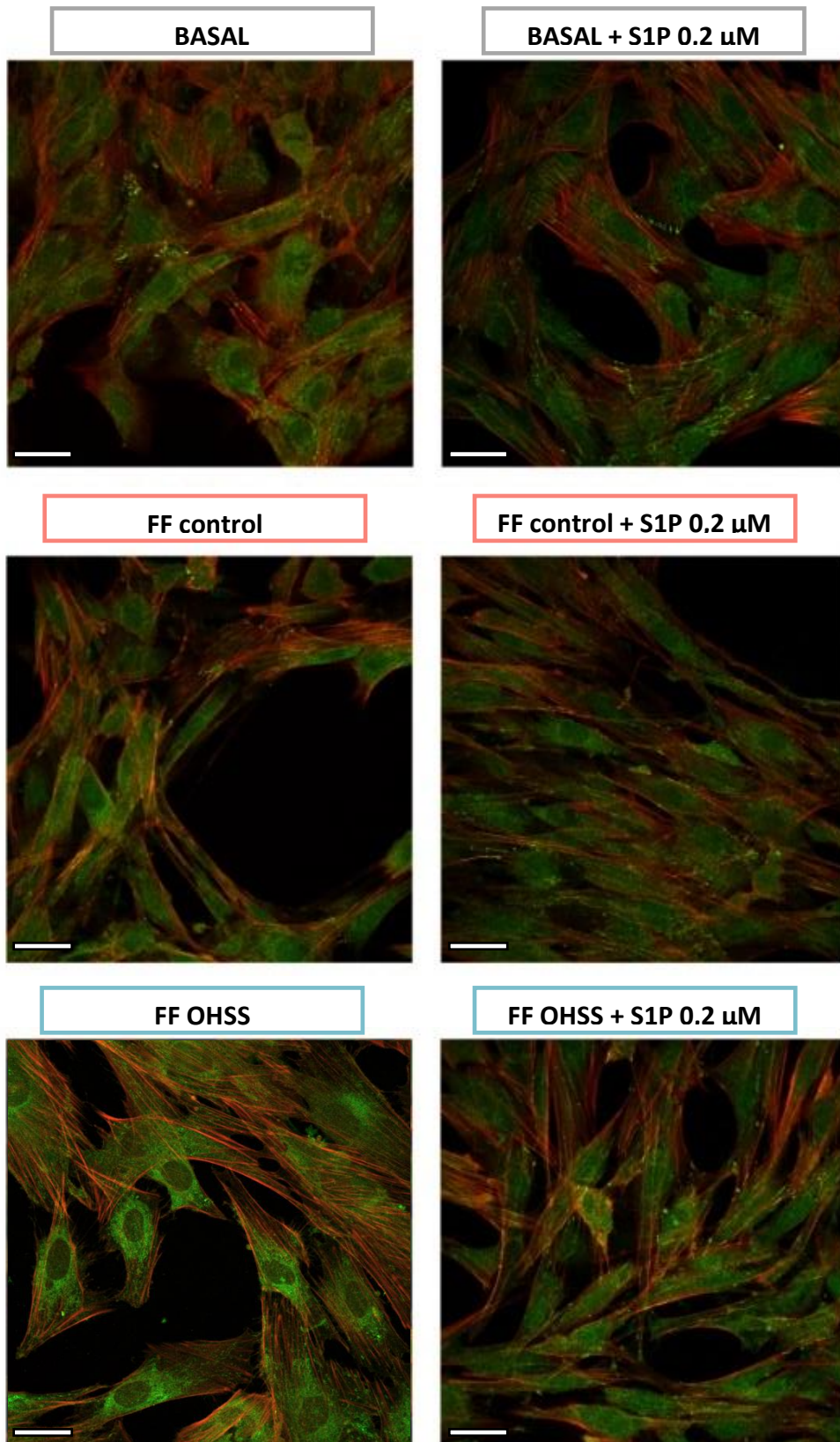
La activación del receptor S1P1 en células endoteliales lleva a cambios en el citoesqueleto de actina modulando la integridad de la barrera endotelial [219,220]. Con la finalidad de estudiar los efectos de S1P en las uniones intercelulares de las VSMCs incubadas con los FF ya mencionados, se evaluó mediante microscopía de fluorescencia la organización de los filamentos de actina de VSMC utilizando faloidina conjugada a TRITC y la localización de N-cadherina utilizando un anticuerpo secundario unido a FITC, de manera conjunta (Fig. 1.20).

Respecto de la arquitectura del citoesqueleto, los resultados mostraron que la incubación con FF de pacientes OHSS causó cambios en la forma de las células debido a un rearrreglo de los filamentos de actina. Esta observación se evidencia por la presencia de fibras de estrés entrecruzadas a lo largo de todo el citoplasma de las células comparado a células incubadas con FF de pacientes control. Además, la morfología celular se tornó más ahusada y filamentosa, y aumentó la formación de espacios paracelulares en VSMCs incubadas con FF de pacientes OHSS en comparación con aquellas incubadas con FF de pacientes control.

En cuanto a la localización de N-cadherina, se observó que la misma se sitúa en los contactos entre células, especialmente en aquellas células incubadas en condiciones basales, y en menor medida, en las incubadas con FF control. Interesantemente, no se observó localización de N-cadherina en las uniones intercelulares entre VSMCs incubadas con FF OHSS, sino que la marcación de esta proteína es perinuclear, evidencia del tráfico de esta cadherina de la membrana hacia el citoplasma.

El agregado de S1P (0,2  $\mu$ M) no produjo cambios pronunciados en el citoesqueleto en condiciones basales y en presencia de FF control. Sin embargo, en las

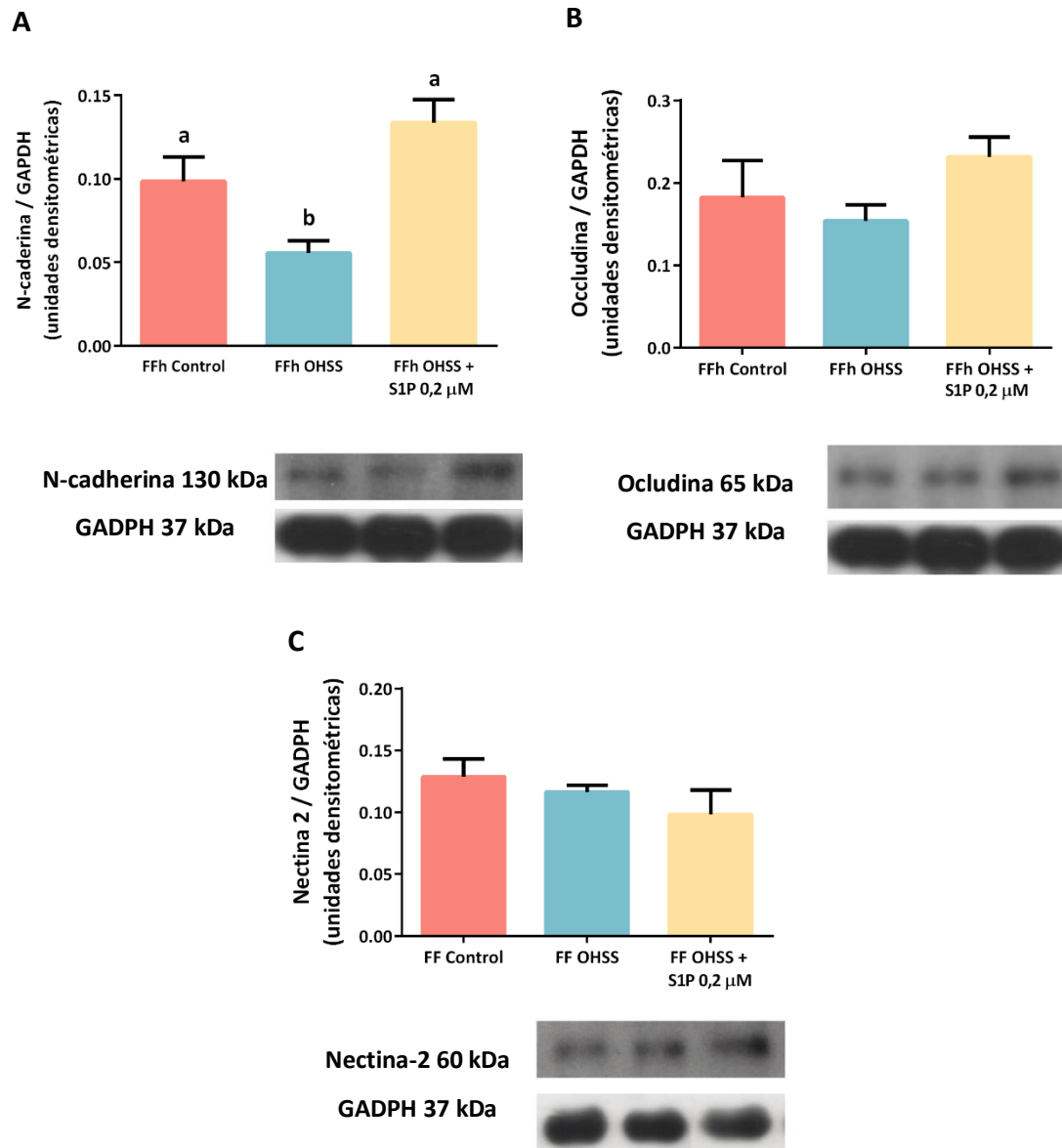
células incubadas con FF OHSS, S1P no solo revirtió parcialmente la redistribución de los filamentos de actina observada en el grupo OHSS, sino que también disminuyó los espacios paracelulares. En cuanto a la localización de N-cadherina, en condiciones basales y en presencia de FF de pacientes control se observó un enriquecimiento en N-cadherina en las uniones entre células por acción de S1P. Además, S1P restauró, al menos parcialmente, la localización de N-cadherina en las zonas de contacto intercelular, de manera tal que el aspecto de las VSMC en estas condiciones se asemeja a las incubadas con FF de pacientes control.



**Página anterior - Figura 1.20: Efecto de S1P en la organización del citoesqueleto de actina y en la localización de la N-cadherina en VSMCs en presencia de FF de pacientes control y pacientes con riesgo a OHSS.** Imágenes representativas de VSMCs incubadas en condiciones basales (arriba), con FF de pacientes control (medio), y con FF de pacientes OHSS (abajo); sin y con agregado de S1P (0,2  $\mu$ M) (derecha e izquierda, respectivamente). Las imágenes muestran la colocalización de filamentos de actina teñidos con faloidina-TRITC (rojo) y localización de N-cadherina unida a FITC (verde). Magnificación 600x. Las barras representan 30  $\mu$ m.

### **Efecto de S1P en presencia de FF de pacientes control y con riesgo a desarrollar OHSS sobre la expresión de proteínas de unión intercelular en VSMCs aisladas de aorta de rata**

Debido a que las uniones intercelulares cumplen un rol crucial en la regulación de la estabilidad vascular, decidimos analizar la expresión de distintos tipos de proteína de unión intercelular en VSMCs incubadas con FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS en presencia de S1P (Fig. 1.21). Para ello, estudiamos la expresión de N-cadherina (proteína de uniones adherentes), ocludina (proteína de uniones estrechas) y la nectina-2 (proteína que puede formar parte de complejos homo- o hetero-fílicos entre diversas moléculas de adhesión). Los niveles de expresión de N-cadherina disminuyeron significativamente en las células incubadas con FF OHSS en comparación con aquellas incubadas con FF control. El agregado de S1P restauró la expresión de esta cadherina, aumentando su expresión significativamente respecto del tratamiento con FF OHSS solamente. La expresión de ocludina y de nectina-2 no sufrió cambios en ninguno de los tratamientos estudiados.

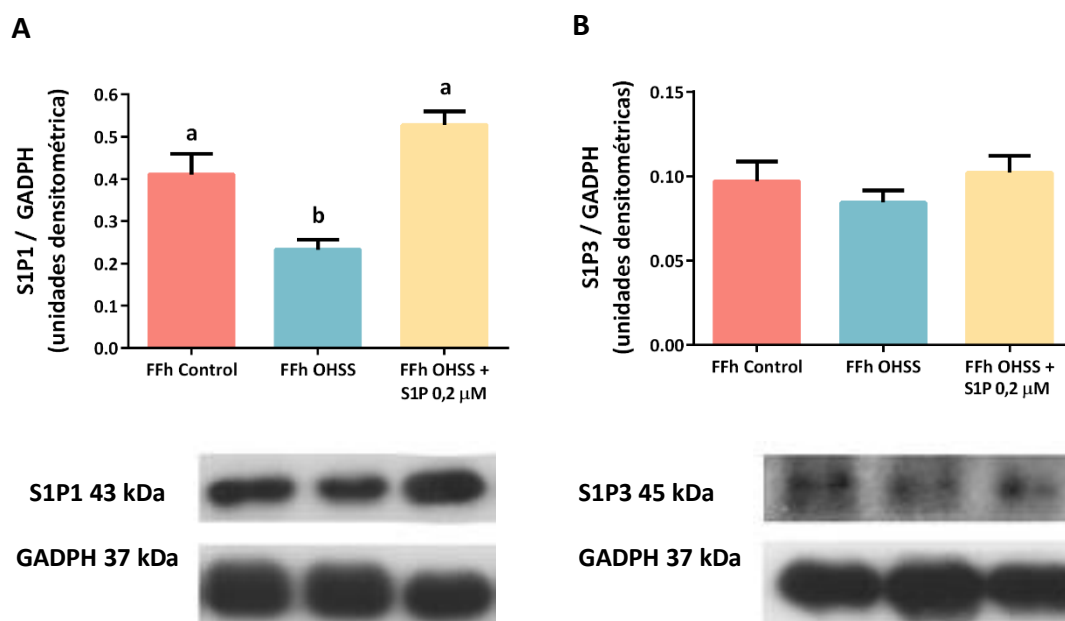


**Figura 1.21: Efecto del tratamiento con S1P sobre la expresión de proteínas involucradas en uniones intercelulares en VSMCs en presencia de FF de pacientes control y pacientes con riesgo a OHSS.** El contenido proteico de N-cadherina, occludina, nectina-2 y GAPDH fue analizado por Western blot en células incubadas con los distintos tratamientos (FF control, FF OHSS y FF OHSS + S1P 0,2 μM). Los gráficos de barra muestran la cuantificación densitométrica de cada proteína (paneles superiores), junto con imágenes de inmunoblots representativos (paneles inferiores). A: Análisis de la expresión de N-cadherina, relativizada a GAPDH como control de carga. B: Análisis de la expresión de occludina, relativizada a GAPDH como control de carga. C: Análisis de la expresión de nectina-2, relativizada a GAPDH como control de carga. Los valores fueron expresados en unidades densitométricas arbitrarias y corresponden a la media ± SEM de 3 experimentos independientes, n=6/grupo. Las distintas letras indican las diferencias significativas entre grupos, utilizando ANOVA de una vía, seguido por el test de comparación múltiple de Tukey.

**Efecto de S1P en presencia de FF de pacientes controles y con riesgo a desarrollar OHSS sobre la expresión de receptores de S1P en VSMCs aisladas de aorta de rata**

S1P induce diversas respuestas celulares, tales como migración, organización del citoesqueleto y formación de uniones intercelulares, [116,221,222] a través de sus receptores de membrana. Además, está reportado que S1P puede modular la expresión de sus propios receptores, aumentando así la señalización por esta vía. Con el objetivo de estudiar cuáles son los receptores involucrados en los efectos de S1P observados hasta el momento en las VSMCs en presencia de FF, se evaluó la expresión de dos de sus receptores: S1P1 y S1P3 (Fig. 1.22).

Los resultados mostraron que la expresión de S1P1 está disminuida significativamente en las VSMCs incubadas con FF de pacientes OHSS, mientras que el agregado de S1P genera un aumento significativo en la expresión proteica de este receptor, en comparación con las células incubadas sólo con FF OHSS, tal que alcanza valores similares al control. Por otra parte, la expresión de S1P3 en estas células no se modificó entre los distintos tratamientos.



**Página anterior - Figura 1.22: Efecto del tratamiento con S1P sobre la expresión de los receptores S1P1 y S1P3 en VSMCs en presencia de FF de pacientes control y pacientes con riesgo a OHSS.** El contenido proteico de S1P1, S1P3 y GADPH fue analizado por Western blot en células incubadas con los distintos tratamientos (FF control, FF OHSS y FF OHSS + S1P 0,2  $\mu$ M). Los gráficos de barra muestran la cuantificación densitométrica de cada proteína (paneles superiores), junto con imágenes de inmunoblots representativos (paneles inferiores). A: Análisis de la expresión de S1P1, relativizada a GADPH como control de carga. B: Análisis de la expresión de S1P3, relativizada a GADPH como control de carga. Los valores fueron expresados en unidades densitométricas arbitrarias y corresponden a la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes, n=6/grupo. Las distintas letras indican las diferencias significativas entre grupos, utilizando ANOVA de una vía, seguido por el test de comparación múltiple de Tukey.



## DISCUSIÓN

### **Modelo *in vivo* de OHSS desarrollado en rata**

El OHSS es una complicación iatrogénica severa del crecimiento y maduración folicular ocasionada por la inducción de la ovulación con gonadotrofinas en tratamientos de fertilización asistida (ART). Una de las características que poseen las pacientes con OHSS es poseer una angiogénesis alterada, con niveles elevados de sustancias vasoactivas en suero, fluido peritoneal y fluido folicular [157,223]. Debido a esto, aumenta significativamente la permeabilidad de la microvasculatura, ocasionando ascitis en las pacientes. Se ha demostrado que el VEGF es uno de los principales candidatos involucrados en la patogénesis de OHSS, induciendo la permeabilidad vascular [161,204]. En el laboratorio hemos demostrado que la inhibición del VEGF disminuye la severidad del OHSS en un modelo desarrollado en rata [169].

Junto al VEGF, colaboran otros sistemas, en forma coordinada y complementaria, como el sistema de ANGPTs, el sistema de PDGF y el sistema de S1P, para el desarrollo de una vasculatura estable, madura y, por consiguiente, funcional [224-227]. Los miembros de las familias de ANGPTs, de PDGF y S1P se encuentran involucrados tanto en el reclutamiento como en la migración de células peri-endoteliales, cruciales para la funcionalidad del vaso sanguíneo [105-107]. Las ANGPTs también han sido involucradas en la patología de OHSS [193]. Además, en nuestro laboratorio hemos encontrado un aumento en la expresión proteica de tanto de ANGPT1 como de su receptor Tie-2, y una disminución de la expresión proteica de PDGF-B y PDGF-D y de su receptor PDGFR $\beta$  en ovarios provenientes de un modelo de OHSS desarrollado en rata [228]. También hemos observado en pacientes con alto riesgo a desarrollar OHSS que no solo los niveles proteicos de ANGPT1 se encuentran elevados, sino que es parte responsable del aumento de la permeabilidad vascular en estas pacientes [170]. Por otra parte, hemos reportado que el esfingolípido S1P se encuentra aumentado en los FF de pacientes con alto riesgo a desarrollar OHSS comparado a FF de pacientes controles [168].

*Sin embargo, hasta ahora ningún estudio ha mostrado en detalle la posible participación de PDGF-B en la patología mencionada, siendo uno de los principales factores que regulan la permeabilidad y estabilidad del vaso sanguíneo.*

Para llevar a cabo los objetivos propuestos, se realizaron experimentos en ratas hembras inmaduras porque éstas no son afectadas por los cambios asociados con el ciclo estral. Además, el modelo experimental de OHSS utilizado en este estudio es útil debido a la similitud entre la rata y el humano respecto a las características observadas en dicho síndrome [229]. Levin y col. (1998) demostraron que la administración de hCG aumenta la permeabilidad vascular y ascitis en el modelo de OHSS en rata [186]. Por esta razón, este modelo ha sido utilizado por varios autores y por nuestro grupo de trabajo [204,206,207,230].

En humanos, el OHSS causa la formación de múltiples CL y quistes luteales. En concordancia, se ha observado previamente que los ovarios de ratas OHSS tienen un alto grado de edema estromal con múltiples quistes luteales [171]. En este estudio, demostramos que en ovarios de ratas OHSS, el tratamiento con PDGF-B (0,5 µg/ovario) causa una disminución en el porcentaje de quistes luteales comparado al grupo OHSS sin tratar. Además, esto se correlaciona con el menor peso ovárico y con la disminución de los niveles séricos de P4 observado en el grupo OHSS tratado con PDGF-B (0,5 µg/ovario) comparado al grupo OHSS sin tratamiento. Además, PDGF-B no altera la foliculogénesis ni la formación de CL en el grupo OHSS comparado al grupo OHSS solo. Estos resultados sugieren que PDGF-B disminuye solo el porcentaje de estas estructuras quísticas, las cuales son capaces de secretar no solo P4 sino grandes cantidades de factores angiogénicos, entre ellos VEGF y ANGPT1, los cuales estimulan el proceso de angiogénesis de manera coordinada y exacerbada y, por consiguiente, aumentan la permeabilidad vascular. Por lo tanto, el tratamiento con PDGF-B mejoraría la dinámica

folicular a través de la disminución de la formación de quistes, evitando de esta manera la aparición y/o la severidad de este síndrome.

Los ovarios no sólo son la fuente de ovocitos, sino también de hormonas esteroideas cuya regulación está dada por hormonas hipofisarias. Teniendo en cuenta que en este trabajo, hemos observado que el tratamiento con PDGF-B disminuye los niveles séricos de P4 en el grupo OHSS, se decidió evaluar la expresión proteica de dos enzimas claves en la esteroidogénesis gonadal, P450<sub>scc</sub> y 3 $\beta$ -HSD, en extractos ováricos provenientes de los distintos grupos experimentales. Los resultados mostraron que el PDGF-B fue capaz de disminuir la expresión proteica de la enzima P450<sub>scc</sub> en ovarios provenientes de ratas OHSS. Además, el agregado de PDGF-B disminuyó la expresión proteica de la enzima 3 $\beta$ -HSD a valores similares al grupo control. Los resultados sugerirían que, en el grupo OHSS, el tratamiento con PDGF-B disminuye los niveles séricos de P4 en parte a través de la disminución de la expresión proteica de dos enzimas fundamentales en la esteroidogénesis, la P450<sub>scc</sub> y la 3 $\beta$ -HSD. Cabe mencionar, que la enzima P450<sub>scc</sub> forma parte de un complejo mitocondrial que es responsable de la ruptura de la cadena lateral del colesterol, siendo este lípido el sustrato principal para la síntesis de P4. Por otra parte, Zlotkin y col. (1986) demostraron que la expresión de la enzima P450<sub>scc</sub> aumenta significativamente bajo la acción de ciertos estímulos como son las gonadotrofinas [231]. Este resultado se correlaciona con el aumento de esta enzima en el grupo OHSS comparado al grupo control, teniendo en cuenta las altas concentraciones de gonadotrofina administradas que posee el grupo con el síndrome. Una posible causa para explicar la reducción de los niveles de P4 por PDGF-B en el modelo OHSS, sería a través de la modulación de la acción de las gonadotrofinas sobre el ovario, afectando la esteroidogénesis a través de la expresión proteica de P450<sub>scc</sub>.

A pesar de que el tratamiento con PDGF-B no afecta el porcentaje de CL en forma significativa en el grupo OHSS, se decidió evaluar el efecto de este factor de crecimiento sobre el crecimiento de las células presentes en CLs de ovarios

provenientes de las ratas OHSS. Los resultados mostraron que el tratamiento con PDGF-B disminuye el porcentaje de células marcadas positivamente para PCNA en CLs provenientes del grupo OHSS. Es importante mencionar que la mayoría de las células marcadas mostraban un núcleo esférico grande con numerosas gotas lipídicas en el citoplasma, lo que indicaría a nivel morfológico que son células luteales grandes [232]. Estos resultados sugieren que el tratamiento con PDGF-B reduciría los niveles de P4 no solo disminuyendo el porcentaje de estructuras quísticas, sino también afectando la proliferación de las células luteales grandes, principales responsables de la síntesis del esteroide mencionado anteriormente. Además, se sabe que las células luteales grandes expresan grandes cantidades de P450 scc y P450 aromatasa [233], lo que explicaría la disminución de la expresión proteica de P450scc ocasionada por PDGF-B.

El CL es una glándula altamente vascularizada cuya densidad vascular supera incluso la de algunos tumores [234], teniendo un 50-70% de células endoteliales y periendoteliales [68,235]. Numerosos estudios han demostrado que el PDGF-B posee un crítico rol en el reclutamiento de pericitos (células peri-endoteliales) a los nuevos vasos sanguíneos, regulando su permeabilidad [62,107,109]. Se ha observado que la inhibición de PDGF-B o PDGFR- $\beta$  a nivel génico, causa letalidad perinatal debido a la gran permeabilidad microvascular y hemorragia [73,108]. La causa de esta disfunción microvascular en estos ratones es un severo déficit en la población de pericitos [109]. En nuestro estudio, nos planteamos si el tratamiento con PDGF-B en el grupo OHSS podría modular la función luteal mediante el reclutamiento de células periendoteliales a la vasculatura. En base a estos antecedentes en la literatura, evaluamos el efecto de PDGF-B sobre la densidad de esta población celular en el CL y los quistes provenientes de ratas con el síndrome. Los resultados mostraron que PDGF-B aumentó el porcentaje de área periendotelial en el CL y en las estructuras quísticas en el grupo OHSS. Estos resultados sugieren que PDGF-B es capaz de inducir el reclutamiento de pericitos a la vasculatura luteal, estabilizándola y, por ende, disminuyendo la permeabilidad

vascular exacerbada característica del síndrome. Además, estos resultados son consistentes con las observaciones realizadas por Kuhnert y col. (2008) donde han demostrado que la inhibición del sistema de PDGFR- $\beta$  causa una severa disminución en el reclutamiento de células peri-endoteliales en CL provenientes de roedor, causando incluso presencia de hemorragias [236].

Se sabe que las células peri-endoteliales interactúan con las células endoteliales a través de la membrana basal. Estos tipos celulares, se comunican a través de sitios de contacto llamados “*peg and socket*”. Estos sitios poseen uniones gap, estrechas y adherentes que son esenciales, entre otras funciones, para regular la permeabilidad en la vasculatura [62,237]. Esto implica que un aumento en la permeabilidad vascular es generalmente acompañado por una reorganización de las proteínas que forman parte de estas uniones intercelulares. Una de las proteínas de mayor importancia en las uniones estrechas es la claudina-5 (específica de endotelio), la cual es parte responsable de la integridad de la arquitectura vascular [166,238]. En este estudio, hemos observado que el tratamiento con PDGF-B restaura la expresión proteica de claudina-5 en el grupo OHSS, llegando a valores similares al grupo control. Este resultado sugiere que PDGF-B podría estar modulando la expresión de esta proteína, favoreciendo la estabilidad de la arquitectura endotelial en el ovario y disminuyendo la permeabilidad vascular. Por otra parte, previamente en nuestro laboratorio, hemos observado que la inyección intraovárica de PDGF-B disminuye los niveles de VEGF ováricos a valores similares al grupo control en un modelo de PCOS desarrollado en rata [239]. Teniendo en cuenta que tanto PCOS como OHSS se caracterizan por tener una angiogénesis alterada con niveles elevados de VEGF en suero y en ovario [228,240] y sabiendo, por datos de otros autores y nuestros, que el VEGF es capaz de reducir la expresión de claudina-5 en células endoteliales en el modelo OHSS [166,169], otra explicación posible sería que el PDGF-B disminuye las altas concentraciones de VEGF en el ovario. Por consiguiente, aumentaría la expresión de

claudina-5, estabilizando la unión intercelular y maduraría la vasculatura en el modelo de OHSS.

Como se mencionó anteriormente, y en particular, en el ovario, las uniones intercelulares intervienen en la adhesión, comunicación y permeabilidad entre células esteroideogénicas, endoteliales y peri-endoteliales [214,215]. Otra proteína que participa en la regulación de la permeabilidad vascular es la N-cadherina, que se encuentra en las uniones adherentes, y participa en la interacción del endotelio con el peri-endotelio. En este estudio, los resultados mostraron que el tratamiento con PDGF-B en el grupo OHSS aumentó la expresión proteica de la N-cadherina a valores similares al control. Estos datos junto con los resultados obtenidos de la claudina 5 sugieren que el PDGF-B es capaz de aumentar tanto la presencia de claudina-5 en las uniones entre células endoteliales como también la presencia de N-cadherina en las uniones entre células endoteliales y pericitos. Es decir, el PDGF-B mejoraría fuertemente la reorganización y la estabilidad en las uniones intercelulares, disminuyendo la hiperpermeabilidad en la vasculatura ovárica en OHSS.

El S1P actúa principalmente mediante la unión y activación específica de receptores de superficie celular acoplados a proteína G, denominados receptores de S1P (S1PRs). Además, se sabe que el S1P1 es el principal receptor de S1P para inducir migración de células de músculo liso [241]. Es importante destacar que dos estudios han mostrado que la administración *in vivo* de S1P inhibe la permeabilidad vascular inducida por VEGF, y que el receptor S1P1 presente en las células endoteliales y peri-endoteliales regula esta permeabilidad a través del tráfico de la N-cadherina hacia membrana plasmática de las células endoteliales, favoreciendo el contacto de estas células con los pericitos [121,242]. En el ovario, previamente nosotros hemos mostrado que la administración intraovárica con S1P aumenta los niveles proteicos de claudina-5 y S1P1 en el modelo de OHSS en rata [167]. Solamente un estudio ha demostrado la acción del PDGF-B sobre la señalización del esfingolípido mencionado anteriormente.

Hobson y col., (2001) han reportado que el PDGF-B no solo activa la enzima SphK1, que sintetiza S1P, sino que también activa al receptor de S1P mediante “trans-activación” de receptores, induciendo la motilidad celular [243]. En base a todos estos antecedentes, evaluamos el efecto de PDGF-B sobre el principal receptor del S1P, S1P1, y la enzima que forma S1P a partir de la esfingosina, SphK1, en el modelo de OHSS. En esta tesis, los resultados mostraron que PDGF-B incrementó la expresión proteica tanto de S1P1 como de SphK1 a niveles similares al grupo control. Estos resultados, en conjunto con los antecedentes descritos en la literatura, sugieren que el PDGF-B administrado en animales OHSS se uniría a su receptor PDGFR- $\beta$ , aumentando la expresión SphK1 y, por ende, la formación de S1P. Además, PDGF-B activaría al receptor S1P1, estabilizando las uniones entre endotelio-endotelio y endotelio-peri-endotelio, mediante el aumento de claudina-5 y N-cadherina. Es decir, que en OHSS, PDGF-B sería capaz de estabilizar la vasculatura ovárica a través de la “trans-activación” entre su propio receptor del tipo TRK (tirosin kinasa) y el receptor del tipo GPCR (“*guanine nucleotide binding protein-coupled receptor*”). En el futuro, se requieren más estudios para dilucidar esta interacción entre ambos tipos de receptores promovida por la acción de PDGF-B en el modelo del síndrome.

Dado que una de las características de OHSS es el aumento de la permeabilidad vascular que lleva a la presencia de ascitis, se evaluó el efecto del tratamiento con PDGF-B sobre la extravasación de NaFlu como parámetro de permeabilidad vascular en ovarios de los distintos grupos experimentales. En el grupo OHSS se observó una gran cantidad de áreas de extravasado de naflu en CL y en áreas estromales, como también en la red de capilares presente en la teca de folículos antrales comparado a los grupos control. En cambio, el PDGF-B redujo las zonas de extravasado de NaFlu en el grupo OHSS. Estos resultados son consistentes con los resultados observados anteriormente que indican que PDGF-B estabiliza la integridad de las uniones intercelulares presentes

en los vasos sanguíneos en el ovario y, por consiguiente, disminuye la permeabilidad vascular en OHSS.

Está demostrado que los componentes de la matriz celular de la vasculatura interaccionan con factores de crecimiento modulando la actividad biológica de esta matriz y, por consiguiente, la estabilidad del vaso [244] [245]. En particular, se ha reportado que los dímeros de PDGF (AA, BB y AB) se adhieren a distintos tipos de colágeno, como es el caso de colágeno tipo IV, regulando la actividad biológica de la matriz celular [246]. En base a estos antecedentes, se decidió evaluar el efecto de PDGF-B sobre la interacción del colágeno IV con las células de músculo liso en la vasculatura ovárica en el síndrome. Los resultados mostraron que disminuye considerablemente la marca positiva para este componente de la matriz celular, así como también la marca para células peri-endoteliales en la vasculatura ovárica del grupo OHSS, comparado al grupo control. En cambio, el tratamiento con PDGF-B aumenta la marca positiva para ambos marcadores en animales que desarrollaron OHSS. Estos resultados sugieren que PDGF-B reduciría la permeabilidad vascular, incrementando en parte la presencia de colágeno IV en la matriz celular, mejorando la interacción de las células peri-endoteliales con esta matriz y, en consecuencia, estabilizando la arquitectura del vaso.

En resumen, en esta parte del Capítulo I de la tesis demostramos que la disminución severa de los niveles de PDGF-B podría ser un mediador del desarrollo de OHSS, ocasionando una exacerbada permeabilidad vascular. Por consiguiente, la administración de este factor de crecimiento representaría una posible estrategia terapéutica para prevenir la aparición del OHSS en pacientes que se someten a técnicas de fertilización asistida. Además, los resultados descriptos en relación con el reclutamiento de células peri-endoteliales y la regulación de proteínas de uniones estrechas como adherentes, pueden proporcionar nuevos conocimientos sobre los mecanismos por los cuales el PDGF-B tiene efecto sobre la disfunción ovárica, como es el caso de OHSS.



## **FF humanos**

Se sabe que las lipoproteínas son responsables del transporte de colesterol entre distintos tipos celulares [247]. En los FF, HDL es el tipo predominante de lipoproteína, como resultado de las restricciones de tamaño para las partículas que pueden atravesar la lámina basal folicular [129,130]. Otros tipos de lipoproteínas, en caso de estar presentes, no pueden ser medidas por ensayos de rutina, y no se ha encontrado que existan partículas de LDL y VLDL presentes en FF [248]. A pesar de que la composición lipoproteica de los FF es única y podría ser una fuente de interesante de información respecto al ambiente que rodea al ovocito, no existen suficientes estudios que investiguen la variabilidad de las HDL de FF, limitando su utilidad como biomarcador del entorno folicular.

Por estas razones, uno de los objetivos de esta tesis fue estudiar la composición de las HDL en los FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS respecto de pacientes control y las posibles implicancias en el transporte de colesterol hacia las células foliculares. Los resultados mostraron que no solamente existe un aumento en el contenido de colesterol total de FF de pacientes con riesgo a desarrollar este síndrome, sino que las HDL que lo transportan también difieren en tamaño y carga de colesterol, en comparación con las HDL de FF de pacientes control. También observamos diferencias en la composición proteica de las HDL de estas pacientes, ya que los niveles de expresión de ApoA-I (una de las apolipoproteínas principales de HDL de FF) disminuyeron respecto de aquellas de pacientes control. No se puede descartar que existan también variaciones en otras apolipoproteínas en las HDL de este tipo de pacientes. Estos resultados indicarían que los FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS se caracterizan por presentar diferentes HDL a nivel de estructura y función, comparadas con las HDL de FF de pacientes control. Por lo tanto, este es el primer estudio en encontrar variabilidad entre las HDL de FF provenientes de los dos grupos analizados.

Se sabe que el receptor principal de partículas de HDL, SR-BI, está presente en el sistema reproductivo femenino, en particular en células tecaes, intersticiales y luteales, y que su expresión varía a lo largo del desarrollo folicular y luteal en ovario provenientes de ratón [249]. Por otra parte, se ha reportado que defectos en el receptor SR-BI o en su expresión pueden ocasionar fallas en la fertilidad [149,150]. En este trabajo, evaluamos la expresión de este receptor en CGL humanas provenientes de pacientes con alto riesgo a desarrollar OHSS y de pacientes controles. Los resultados indicaron que la expresión de SR-BI aumenta significativamente en CGLs de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS respecto de CGLs de pacientes control. Esta información concuerda con varios estudios realizados en rata que han reportado que la expresión de SR-BI puede inducirse por gonadotrofinas [125] y que la inhibición de este receptor en ovario reduce abruptamente la esteroidogénesis estimulada por dichas hormonas hipofisiarias [250]. Estos antecedentes refuerzan la importancia de la entrada de colesterol mediante SR-BI en los compartimentos folicular y luteal. Se requieren más estudios para dilucidar la participación de transportadores de colesterol, tales como ABCA1 y ABCG1 [251], presentes en la membrana de las células ováricas en este tipo de pacientes. Los datos obtenidos sugieren que en ovarios de pacientes con alto riesgo a desarrollar OHSS se estaría promoviendo la expresión de este receptor de HDL, favoreciendo la entrada de colesterol a las células ováricas y, por ende, aumentando la síntesis de hormonas sexuales. Este contexto podría contribuir a la luteinización de las células, incrementando la angiogénesis ovárica y la aparición del síndrome.

A modo de resumen, se presenta a continuación un esquema que detalla la caracterización del perfil lipoproteico de los FF de pacientes control y pacientes con alto riesgo a desarrollar OHSS (Fig. 1.23).

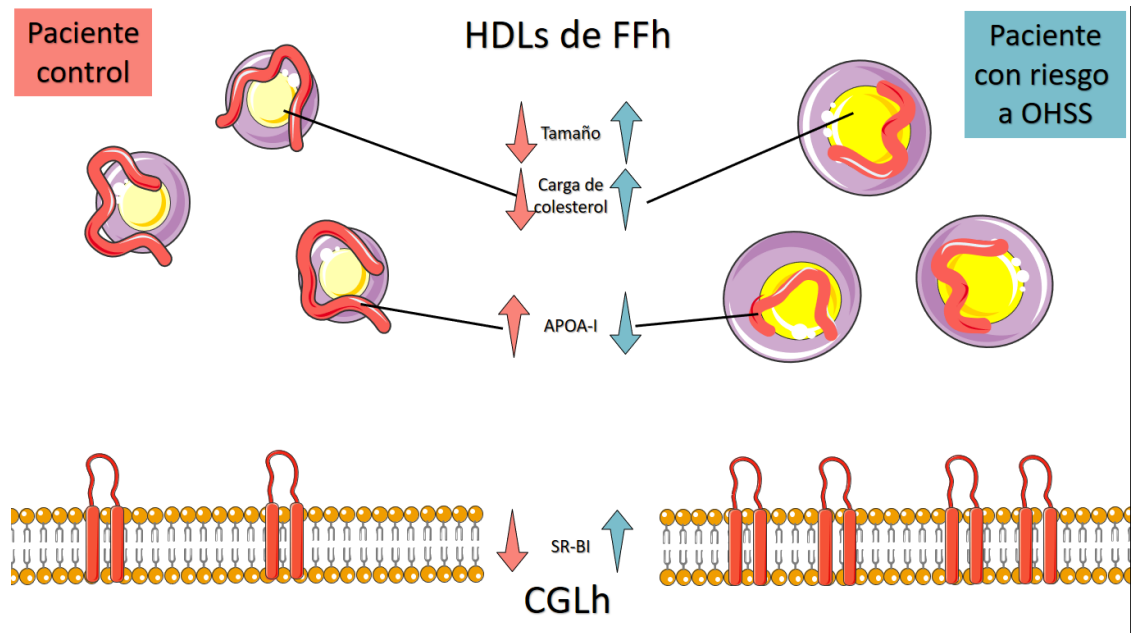


Fig. 1.23: Esquema que describe el perfil lipoproteico de pacientes control y pacientes con riesgo a desarrollar OHSS, según los resultados obtenidos en FF humanas y CGL humanas.

### **Cultivo primario de VSMCs de aorta de rata**

Las VSMCs son células peri-endoteliales que, aunque cumplen funciones de gran relevancia en la regulación de vasos sanguíneos, en muchas ocasiones no son tenidas en cuenta al momento de estudiar patologías con alteraciones en la angiogénesis. En este caso, nos propusimos utilizarlas como herramienta para evaluar parámetros angiogénicos y estudiar su rol en el contexto del OHSS.

En primer lugar, se corroboró la expresión de marcadores específicos de VSMCs y de proteínas de interés para este trabajo, como PDGFR- $\beta$  (receptor de PDGF), S1P1 (receptor de S1P) y N-cadherina (molécula de uniones adherentes). Estos resultados nos permitieron avanzar en el estudio de la regulación de VSMCs en las distintas condiciones experimentales.

Debido a que las uniones intercelulares y la organización del citoesqueleto son esenciales para la regulación de la permeabilidad vascular, se estudiaron estos parámetros en el cultivo de VSMCs. La actina es la proteína de citoesqueleto más abundante en las VSMCs contráctiles, contribuyendo a un 20% del contenido proteico total de estas células [252]. Mediante sus conexiones con otras células peri-endoteliales, con el endotelio y con la matriz extracelular, sumado a los estímulos mecánicos, las VSMCs integran numerosas señales que le otorgan gran plasticidad de respuesta en cuanto a la arquitectura celular. De esta manera, el citoesqueleto regula la forma celular, la rigidez de la membrana basal secretada y la topografía de la superficie subcelular. Como resultado, la reorganización del citoesqueleto de las VSMCs está finamente regulado para asegurar la estructura y funcionalidad adecuada de estas células en condiciones fisiológicas [253]. En esta tesis, observamos que las VSMCs estimuladas con FF de pacientes con alto riesgo a desarrollar OHSS presentan alteraciones en el citoesqueleto celular, lo que se evidencia por la gran cantidad de fibras de estrés y por la adquisición de una morfología más ahusada y filamentosa.

Además, hemos encontrado evidencias de la internalización de la N-cadherina en presencia de FF de pacientes con riesgo a desarrollar OHSS, comparado con FF de pacientes control. Si bien este fenómeno no está completamente descrito aún en la literatura, existen varios trabajos que describen que el tráfico anómalo de cadherinas está involucrado en diversas patologías, como, por ejemplo, la pancreatitis aguda y algunos tipos de cáncer, en los que la angiogénesis está alterada [254]. Entre los mecanismos que regulan la endocitosis de cadherinas, se destaca la acción de las cateninas, las cuales se unen a las cadherinas dentro del citoplasma, permiten la conexión con el citoesqueleto de actina y estabilizan las uniones adherentes [255]. Resulta particularmente interesante el trabajo de Sharma y Henderson (2007) [256], quienes reportan que en células en migración,  $\beta$ -catenina es internalizada de manera conjunta con N-cadherina por macropinocitosis, sugiriendo que esta catenina es mediadora de la endocitosis de N-cadherina. Todos estos antecedentes en la literatura, sumados a nuestros resultados, nos permiten inferir que los factores presentes en los FF de pacientes OHSS generan una desregulación en el anclaje y tráfico de cadherinas, especialmente la N-cadherina, de manera directa o indirectamente a través de las cateninas.

Tanto la reorganización del citoesqueleto como la internalización de la N-cadherina fueron parcialmente revertidos por el agregado de S1P a los FF de pacientes con alto riesgo de OHSS. Además, hubo una disminución en la expresión proteica de los niveles de N-cadherina en VSMCs incubadas con FF OHSS, mientras que el agregado de S1P restaura los niveles de esta proteína. Esto concuerda con varios estudios que han reportado que la activación de los receptores de S1P es necesaria para el tráfico y fortalecimiento de las uniones “peg and socket” dependientes de N-cadherina entre células endoteliales y periendoteliales [62,121]. Además, las cadherinas permiten la unión entre VSMCs adyacentes y la propagación de señales mecánicas de una célula a la otra [257]. Estas acciones están mediadas por las proteínas del citoesqueleto

distribuidas a lo largo del citoplasma [258]. Por lo tanto, los efectos observados de S1P sobre las VSMCs podrían deberse en parte al aumento en la expresión de N-cadherina y de su localización en uniones entre células, lo que a su vez induce un rearrreglo de la arquitectura celular similar al de VSMCs estimuladas con FF control. Esto es consistente con los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio, en los que demostramos que la administración intrabursa de S1P aumenta los niveles de N-cadherina en ovarios provenientes del modelo de OHSS desarrollado en rata [167].

Por último, se evaluó la expresión de los dos receptores principales de S1P en VSMCs, S1P1 y S1P3. Los resultados mostraron que el receptor S1P1 se encuentra disminuido en VSMCs estimuladas con FF OHSS respecto de aquellas estimuladas con FF de pacientes control, mientras que no se observaron cambios en la expresión de S1P3. Por otra parte, el agregado de S1P aumentó la expresión de su receptor S1P1, en concordancia con lo descrito por Kluk y Hla, quienes demostraron que S1P puede regular positivamente la expresión de su propio receptor en VSMCs [241]. Estos autores también observaron que S1P favorece la proliferación y migración de estas células mediante la señalización por S1P1. Además, este resultado está de acuerdo con los obtenidos previamente en nuestro laboratorio, ya que se ha observado que este esfingolípido es capaz de incrementar los niveles del receptor S1P1 en ovarios provenientes del modelo de OHSS en roedor.

## CAPÍTULO II: FALLA OVÁRICA PREMATURA (FOP)

La menopausia, con sus manifestaciones clínicas y sus complicaciones, es un cuadro de interés por sí misma, debido a que induce en quien la padece un envejecimiento prematuro con complicaciones cardíacas, óseas, psíquicas y metabólicas.

Fisiológicamente, este fenómeno se produce de manera progresiva desde aproximadamente los 38-40 años de edad, momento en el cual la fertilidad empieza a declinar: se calcula que este proceso se inicia cuando quedan aproximadamente 25.000 folículos ováricos. [259] En una primera fase, se produce un aumento sutil de los niveles de FSH, probablemente debidos a una menor producción de inhibina por las células de la granulosa en los folículos senescentes. Éste aumento de FSH determina un desarrollo folicular más rápido con un acortamiento de los ciclos y un agotamiento progresivo de los folículos restantes. A medida que se van agotando los folículos aumenta la aparición de ciclos anovulatorios que determinan una segunda fase en la que se produce un aumento progresivo de la duración de los ciclos hasta su cese definitivo. La menopausia aparece cuando el número de folículos residuales desciende por debajo del umbral crítico en torno a 1000, con independencia de la edad. El diagnóstico de menopausia es generalmente clínico realizándose cuando existe un periodo de amenorrea superior a los doce meses acompañados de cifras hormonales de FSH > 40 mU/ml y E2 < 20 pg/ml.

Se define a la falla ovárica prematura o menopausia precoz como el cese de la función ovárica por debajo de los 40 años, si éste se produce entre los 40 y 45 se denomina menopausia temprana [172]. La primera referencia histórica al respecto la encontramos en 1967, cuando se definió la falla ovárico prematuro (FOP) como el cese no fisiológico de la menstruación antes de los 40 años y después de la menarca [260]. Es

una entidad clínica caracterizada por la existencia de amenorrea de al menos 4 meses de evolución, síntomas de déficit estrogénico, elevación de gonadotrofinas mayores de 40 mU/ml con disminución de estrógenos menores de 5 pg/ml (obtenidas en dos ocasiones distintas), que se presenta en mujeres antes de la edad normal de la menopausia.

Este síndrome ha recibido distintas denominaciones que han creado una cierta confusión terminológica. Las más utilizadas han sido: Menopausia precoz, extinción ovárica precoz, hipogonadismo o amenorrea hipergonadotropa, ovarios resistentes y FOP. Éste último término (o su variante, insuficiencia ovárica prematura) es el que más aceptación tiene y el más utilizado en la actualidad [172].

La incidencia de este síndrome descrita en la literatura es muy divergente. Hace pocos años, el organismo “Study of Women Across the Nation (SWAN)” ha reportado una incidencia de 1,1 % de FOP antes de los 40 años. Este porcentaje representaría aproximadamente 90.000 casos en Argentina. Además de las consecuencias en lo que concierne a la capacidad reproductiva, la FOP está asociada con un riesgo aumentado de enfermedad cardiovascular, osteoporosis, cáncer epitelial de ovario y Alzheimer [261].

## **FISIOPATOLOGÍA DE FOP**

En condiciones normales, al comienzo de la vida embrionaria se produce en el feto hembra la migración de las células germinales hacia la cresta genital. De la interacción de ambas se desarrolla la gónada femenina, que en la semana 20 tiene 6-7 millones de ovogonias. Hacia la semana 25 comienza un proceso continuo de atresia que hace que sólo queden entre 300.000 y 400.000 en el momento del nacimiento. Al final de la vida reproductiva desaparecen por completo como consecuencia de que en



cada ciclo alrededor de 1.000 folículos inician el desarrollo mientras sólo uno ovula y en el resto se desencadena la atresia.

Existen principalmente dos tipos fisiopatológicos de fallo ovárico prematuro: por depleción folicular y por disfunción folicular [262]. El FOP por depleción folicular ovárica abarca los casos en los que la reserva o “pool” folicular está disminuido, provocando un agotamiento prematuro de los mismos. El déficit de folículos disponibles puede deberse a dos mecanismos. El primero es la falta de emigración de los gonocitos hacia la cresta genital (o en menor número de lo normal), dando origen a una gónada patológica con escasa o nula dotación folicular. El segundo se da cuando la emigración de los gonocitos es normal, pero se acelera el proceso de atresia en la vida prenatal o en la postnatal, lo que va produciendo gónadas con escasa dotación folicular, que fracasarán en su función prematuramente. La tasa de atresia folicular tiene variaciones individuales en las que estarían involucrados principalmente factores genéticos [263]. No se conocen completamente los mecanismos que gobiernan la atresia, pero puede estar acelerada por defectos del cromosoma X (por ejemplo, síndrome del X frágil) [263] o bien por una alteración en la producción o señalización de gonadotrofinas [264]. También se ha sugerido que alteraciones inmunológicas podrían estar implicadas en la tasa de atresia folicular.

Otra de las causas posibles de la aceleración de la atresia, y en lo que nos basaremos en este estudio, son los agentes externos iatrogénicos. Esta clasificación comprende los siguientes tipos de agentes:

Quimioterapia: su efecto sobre el ovario produciría, por una parte, la destrucción de las células en desarrollo de la granulosa y la teca, componentes necesarios para el desarrollo folicular y, por otra, la alteración del ADN celular, que afectaría a los folículos primordiales en reposo. Los factores determinantes para la aparición de FOP post-tratamiento son la edad de la paciente, la dosis y el tiempo de administración. Al comparar los datos de volúmenes ováricos de otros autores, se ha

reportado que en las pacientes sometidas a tratamientos oncológicos, la edad de los ovarios sería aproximadamente 10 años superior a la cronológica [265].

Radioterapia: la FOP producida por radioterapia depende de la edad de la paciente y la dosis administrada. Dosis mayores de 600 cGy producen un FOP definitivo, mientras que dosis de 400-500 cGy sólo producen alteraciones irreversibles en el 50% de los casos [266].

Cirugía: está en discusión cuánto puede afectar a la función ovárica aquellas cirugías que alteran la vascularización ovárica, como la histerectomía o cirugía a nivel tubárico.

Tabaco: es uno de los factores de riesgo más relacionado con FOP. Las fumadoras están más predispuestas a tener menopausia natural un año antes que las no fumadoras [267] y a presentar una perimenopausia más corta [259,268]. Fumar se asocia también con peores resultados reproductivos y trastornos menstruales, como ciclos más irregulares y cortos debidos al acortamiento de la fase folicular y a las cifras incrementadas de FSH [268].

## **LA QUIMIOTERAPIA COMO AGENTE INDUCTOR DE FOP**

El riesgo de desarrollar FOP como consecuencia de los tratamientos quimioterapéuticos depende de numerosos factores. Uno de los más importantes es el protocolo o régimen de tratamiento a seguir, ya que no todas las drogas quimioterapéuticas generan el mismo grado de gonadotoxicidad. Se ha reportado que los agentes alquilantes son los más dañinos para el ovario: el 42% de las mujeres que se sometieron a tratamientos con agentes alquilantes desarrollaron FOP, mientras que en aquellas que estuvieron expuestas a alcaloides derivados de plantas o agentes derivados de platino aumentó muy poco su riesgo de tener FOP [269]. También se ha estimado

que las mujeres menores de 20 años tratadas con agentes alquilantes tienen nueve veces más probabilidades de desarrollar FOP que pacientes control [270,271].

Otro punto para tener en cuenta es la dosis de tratamientos administrada, ya que varios estudios han demostrado que la aparición de FOP es dosis-dependiente [272]. En ratones, se ha demostrado que la pérdida de folículos primordiales en respuesta a terapias alquilantes ocurre a medida que se incrementan las dosis [273].

Un factor de riesgo crucial es la edad de la paciente al momento del tratamiento, ya que está demostrado que hay mayor incidencia de FOP en pacientes mayores [274]. Las pacientes de mayor edad ya tienen una reserva folicular menor a la de pacientes jóvenes al comienzo del tratamiento, entonces la pérdida de folículos de este “pool” más pequeño tiene más chances de inducir FOP al finalizar el tratamiento [275].

Uno de los inconvenientes principales de los estudios que buscan determinar el riesgo de una paciente de desarrollar FOP luego de la quimioterapia, es la heterogeneidad de métodos utilizados para evaluar la reserva folicular remanente. Uno de los métodos más utilizados es utilizar la amenorrea como punto final de la función ovárica, pero esta condición puede ser temporal, ya que en muchas pacientes los ciclos menstruales se reanudan varios meses después del tratamiento. Sin embargo, al mismo tiempo, ese reinicio puede durar un período corto y ser sucedido por una amenorrea permanente [276]. Esto complica la obtención de un parámetro preciso. Además, debido a que la amenorrea es reportada por las mismas pacientes, no es una medida de las más confiables.

Otro tipo de medición que está cobrando relevancia es la utilización de recuento de folículos antrales por ultrasonido y de indicadores hormonales, tales como E2, FSH y AMH. AMH es una hormona proteica producida por las células de granulosa de los folículos en crecimiento, que puede ser utilizada para inferir el número de

folículos pequeños en desarrollo presentes en el ovario. A partir de este dato, se puede extrapolar el número de folículos primordiales restantes[277].

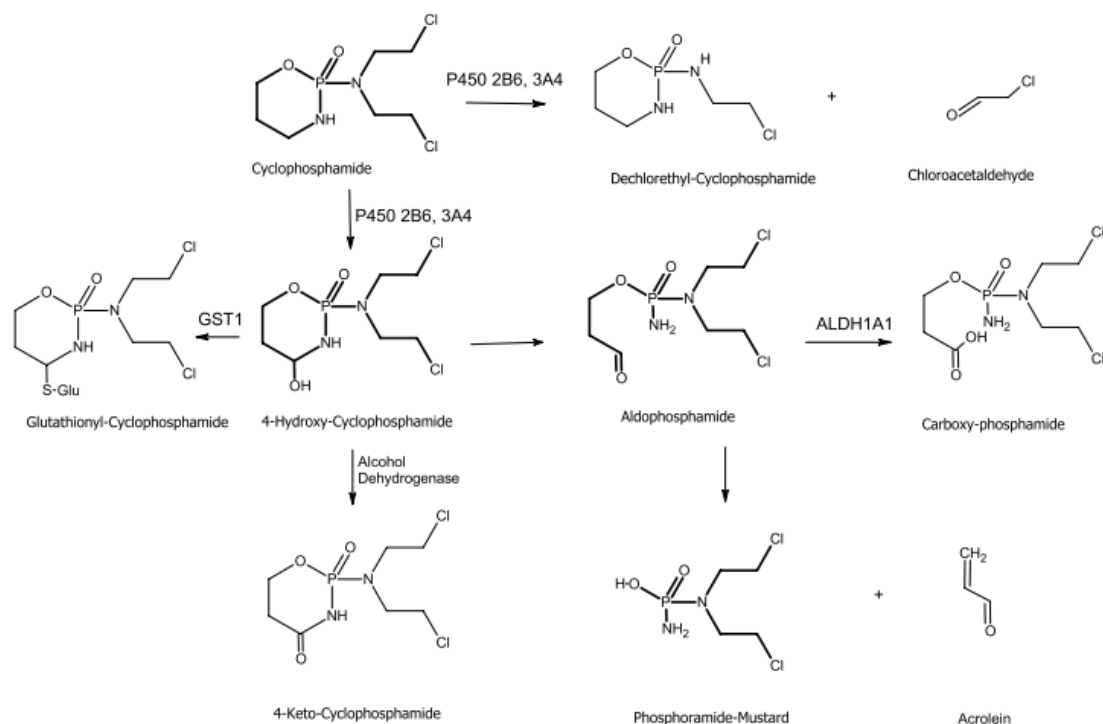
### **AGENTES ALQUILANTES: EL USO DE CICLOFOSFAMIDA (CTX)**

La ciclofosfamida (CTX, por su nombre comercial más conocido: Citoxan) pertenece al grupo de las oxazafosforinas, está clasificada dentro de los agentes alquilantes y es una de las drogas quimioterapéuticas más utilizadas. Fue sintetizada por primera vez en 1958 y se obtuvo la aprobación para su uso como agente antitumoral en 1959 [278]. Un amplio espectro de tipos de cáncer puede tratarse con CTX, incluyendo cáncer de mama y linfomas, y generalmente se la utiliza en combinación con otras drogas anticancerígenas [279]. Cabe resaltar que también se utiliza a CTX como inmunosupresor en diversas patologías autoinmunes, tales como lupus y esclerosis múltiple, así como para transplantes de médula ósea [280,281]. Aunque esta droga se utiliza hace varias décadas, se han desarrollado nuevos usos terapéuticos como la terapia metronómica o de alta dosis. Estos nuevos protocolos tienen como objetivo sobrepasar la inmunosupresión en los estadios de cáncer avanzados, destruyendo las células inmunes de perfiles regulatorios que evitan el ataque del sistema inmune a las células tumorales [279]. Su uso en la clínica está limitado por su toxicidad, ya que sus efectos secundarios incluyen neutropenia, cardiotoxicidad y cistitis hemorrágica [282] [283].

Como ya se mencionó anteriormente, la CTX junto otros agentes alquilantes, como el busulfan, son considerados los tratamientos quimioterapéuticos más ovotóxicos [269]. Se ha estimado que entre el 60 y el 80% de las mujeres tratadas por la combinación CMF (ciclofosfamida, metotrexato y 5-fluorouracil) desarrollan FOP [284]

.

El tratamiento con CTX puede ser administrado tanto de forma oral como intravenosa. Al ser una pro-droga inactiva, luego de su absorción, CTX necesita ser activada biológicamente en el hígado para ejercer sus efectos citotóxicos. Tal como muestra la Figura 2.1, el citocromo P450, mayormente CYP 2B6 y 3A4, oxida al compuesto CTX a 4-hidroxi-ciclofosfamida (también conocida como perfosfamida), formando un equilibrio con la aldofosfamida. Ambas formas pueden entrar a las células y allí ser descompuestas para producir mostaza fosforamida, el principal metabolito activo que interfiere con el ADN celular [285].



**Fig. 2.1: Metabolismo de la ciclofosfamida (CTX).** Las estructuras resaltadas en negrita corresponden al camino metabólico que lleva a la formación del metabolito activo, la mostaza perfosfamida. Las enzimas involucradas son: el citocromo P450 (P450 2B6, 3A4); la ALDH aldehído deshidrogenasa (ALDH1A1), la glutatión-S-transferasa (GST1) y la alcohol deshidrogenasa. Tomado de Ahlmann y col. [279]

Si bien hay otros metabolitos intermedios producidos por CTX con efectos citotóxicos, los estudios realizados sugieren que es la mostaza fosforamida la que presenta mayor poder gonadotóxico [286,287]. El mecanismo de acción de esta droga consiste en la creación de enlaces cruzados entre bases del ADN, tanto intra-catenarios como inter-catenarios, que interfieren con la división celular [288]. En consecuencia, los efectos de CTX son independientes del ciclo celular. Sin embargo, como todos los agentes alquilantes, las células con altos niveles de proliferación son las más sensibles a los efectos de CTX [289].

En particular, las células de granulosa tratadas con CTX presentan alteraciones mitocondriales, que incluyen una reducción del potencial transmembrana mitocondrial y la acumulación de citocromo c en el citosol, lo que puede conducir a la activación de la apoptosis a través de caspasas [290]. También se ha demostrado que CTX produce un aumento en la expresión de BAX, una proteína que es parte de la vía mitocondrial del proceso de apoptosis [291]. Esta podría ser la forma en la que esta droga interfiere con el potencial de membrana mitocondrial y produce apoptosis. La generación de estrés oxidativo es otro de los mecanismos propuestos que se cree causan muerte celular y que ha sido especialmente vinculado a los efectos secundarios sobre el sistema cardiovascular [292]. Además, la exposición de ovarios a metabolitos activos de CTX *in vitro* induce la expresión de la histona H2AX (marcador de quiebres en la doble hebra de ADN), predominantemente en ovocitos y células de granulosa [293].

## **BLANCOS POTENCIALES DE CTX EN EL OVARIO**

### **Efectos de CTX sobre los distintos estadios foliculares**

Las poblaciones foliculares que componen el ovario son heterogéneas, por lo que cada estadio folicular presenta una vulnerabilidad distinta a los efectos citotóxicos de la quimioterapia. Actualmente, no hay suficiente información que permita

esclarecer esto, pero existen diversos trabajos que demuestran algunos efectos de CTX sobre los distintos estadios foliculares. Dado que la pérdida de la reserva folicular es lo que finalmente conduce a la aparición de FOP, la mayoría de los estudios solamente se centra en evaluar los folículos primordiales. Por ejemplo, en ovarios de rata y ratón, se ha observado que el tratamiento con CTX y sus metabolitos produce una reducción en el número de folículos primordiales y primarios sanos [286,293].

Sin embargo, los mecanismos de daño de CTX sobre la reserva pueden ser debido a un efecto directo de la quimioterapia sobre los folículos primordiales, o puede atribuirse a un efecto indirecto dado por el daño a folículos en crecimiento, que a su vez, induce el reclutamiento folicular inicial y la desaparición de la reserva folicular. Dado que los folículos en desarrollo inhiben la activación a través de factores como la AMH [294], la rápida destrucción de folículos en crecimiento podría llevar a un aumento en el reclutamiento folicular. Este fenómeno, repetido a lo largo de varios ciclos de tratamiento quimioterapéutico, podría ser una causa fundamental del efecto gonadotóxico de CTX respecto al número de folículos primordiales [180]. Tal como han demostrado Kalich-Philosoph y col. en un modelo de ratón, CTX aumenta el reclutamiento de folículos primordiales, aunque no está establecido si lo hace a través de una acción directa sobre ese tipo particular de folículos o de forma indirecta a través de la pérdida de los folículos en desarrollo [179]. Por otra parte, en biopsias humanas tratadas con CTX, hay menor número de folículos primordiales respecto de muestras control sin tratar [177].

Por otra parte, se ha reportado que los folículos preantrales son altamente susceptibles al daño por quimioterapia, y que su calidad disminuye rápidamente con la administración de CTX tanto *in vivo* como *in vitro* [295,296]. El abrupto descenso en los niveles de AMH durante los tratamientos quimioterapéuticos es también un indicador de que los folículos es crecimiento son dañados [297,298].

### **Efectos de CTX sobre las células germinales y células somáticas ováricas**

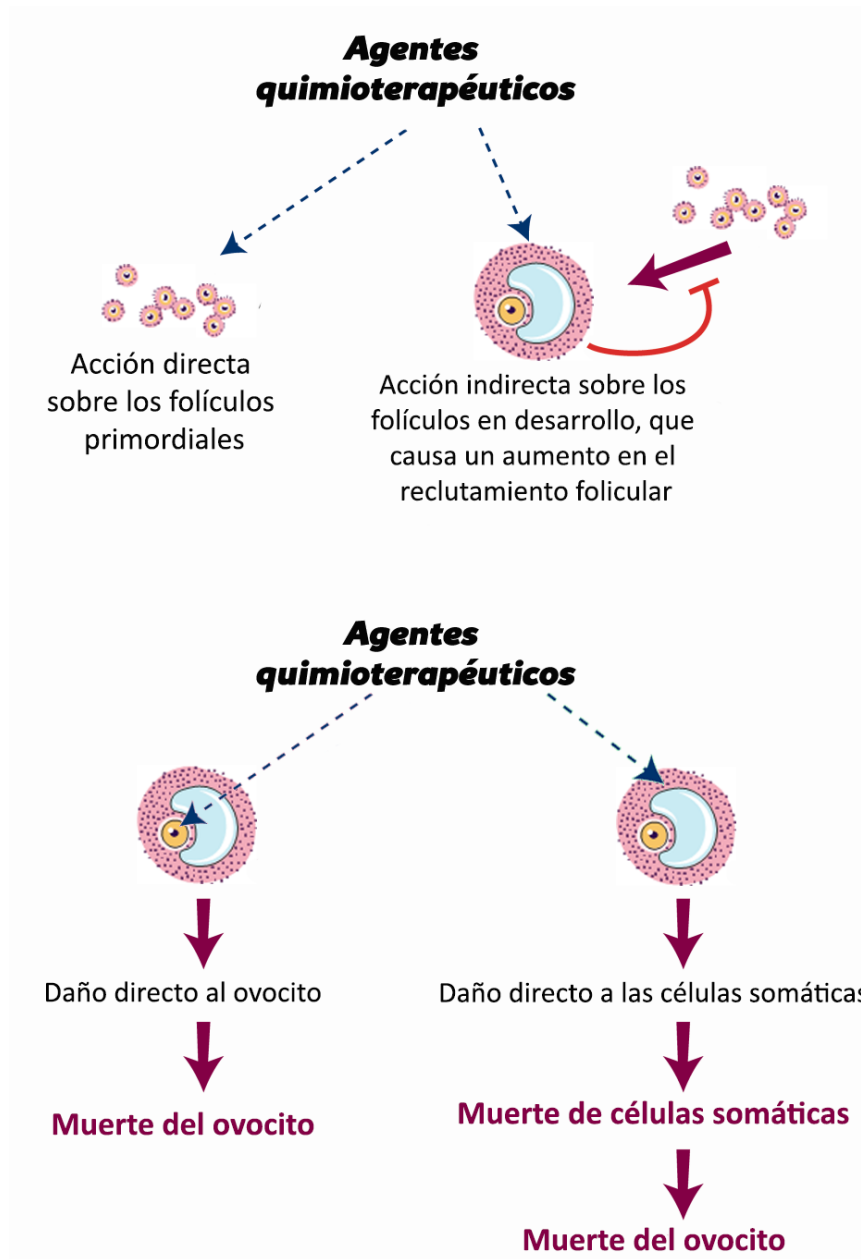
El ovario está constituido por diversos tipos celulares expuestos a la citotoxicidad causada por CTX. Una suposición frecuente es que los ovocitos son dañados en forma directa por la quimioterapia, llevando a la muerte de las células germinales y por ende a la pérdida de folículos. No obstante, existe muy poca evidencia que sustente esa hipótesis. En un modelo de xenotransplante, se transplantaron en ratones piezas de ovario fetal humano, que luego fueron tratadas con CTX [177]. En este trabajo, se detectó apoptosis en los ovocitos antes que en las células de pregranulosa, pero dado que se trata de tejido fetal, no puede descartarse que se deba a que las células germinales aún están mitóticamente activas, a diferencia de lo que sucede en el ovario adulto.

Una explicación alternativa es que CTX afecta directamente a las células somáticas, ya que se encuentran en división mitótica, lo que las torna susceptibles a la acción de la quimioterapia. Debido a que los ovocitos y las células de la granulosa que lo rodean son dependientes unos de los otros, la destrucción de las células de la granulosa podría llevar indirectamente a dañar el ovocito. Este daño podría estar latente y manifestarse en estadios foliculares avanzados o incluso post-fertilización. Como se ha demostrado en el estudio de Raz y col. [296], cuando se cultivan cortezas ováricas humanas en presencia de CTX, se observa un aumento del daño en células de granulosa y en la membrana basal. Se obtuvieron resultados similares en un estudio de biopsias humanas provenientes de mujeres tratadas con quimioterapia [295].



| Quimioterapia                       | Autores                             | Especie      | Tipo celular afectado           | Estadio folicular afectado |
|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------|---------------------------------|----------------------------|
| CTX                                 | Raz y col. (2002)[296]              | Humano       | Células de granulosa            | -                          |
|                                     | Desmeules y Devine (2006)[286]      | Ratón        | Ovocitos y células de granulosa | Primordiales, primarios.   |
|                                     | Oktem y Oktay (2007)[177]           | Humano       | Ovocito                         | Primordiales               |
|                                     | Zhao y col. (2010)[290]             | Rata         | Células de granulosa            | -                          |
|                                     | Petrillo y col. (2011)[293]         | Rata y ratón | Principalmente ovocitos         | Primordiales y primarios   |
|                                     | Kalich-Philosoph y col. (2013)[179] | Ratón        | Células de la granulosa         | Folículos en desarrollo    |
| CTX en combinación con otras drogas | Abir y col. (2008)[295]             | Humano       | Células de granulosa y ovocitos | Preantrales                |

Tabla 2.1. Resumen de los antecedentes en literatura que evalúan los efectos directos de CTX sobre el ovario.



**Figura 2.2 - Los tratamientos quimioterapéuticos tienen distintos blancos posibles en el ovario.** A: La quimioterapia puede afectar directamente a la reserva de folículos primordiales o, indirectamente, a través del daño a los folículos en crecimiento. Puesto que los folículos en estadios más avanzados inhiben la activación de los folículos primordiales, la pérdida de esta población supone un aumento en el reclutamiento folicular. B: La quimioterapia puede dañar el ovocito directamente o dañar las células somáticas ováricas, lo que lleva indirectamente al daño del ovocito y la destrucción del folículo. Adaptado de Morgan y col. 2012 [180].

### **Efectos de CTX sobre otros tipos celulares del ovario**

Otra posibilidad es que el daño por quimioterapia afecte los diversos componentes del estroma ovárico, lo que a su vez alteraría la función folicular. La angiogénesis, como ya se ha mencionado, es un proceso fundamental, ya que el ovario depende de la formación y la remodelación continua de su complejo sistema vascular para funcionar correctamente. La vasculatura ovárica permite que tanto folículos como cuerpos lúteos reciban el suministro necesario de nutrientes, oxígeno y hormonas, así como también la liberación de hormonas. Además, los procesos angiogénicos son indispensables para el crecimiento folicular, la ovulación y la funcionalidad de los CL [299]. Dado el continuo crecimiento y regresión de la vasculatura ovárica, resulta lógico pensar que CTX podría generar daños sobre los vasos que afecten los folículos ováricos. Marcello y col. demostraron que en biopsias ováricas de niñas que estuvieron expuestas a tratamientos quimioterapéuticos por leucemia había daño (de moderado a severo) en el estroma y en la vasculatura ovárica [300]. Por otra parte, se encontraron evidencias de fibrosis cortical y daño vascular en ovario humano luego del tratamiento con este agente alquilante [178], por lo que la injuria vascular podría ser un mecanismo adicional que explique parte de la pérdida de folículos en FOP.

Como ya se ha mencionado, CTX tiene importantes efectos citotóxicos sobre las células inmunes, ya que genera inmunosupresión y/o inmunomodulación. El tratamiento con CTX genera rápidamente una disminución en la respuesta inmune innata y leucopenia en sangre [301,302]. Además, está reportado que existe una subpoblación de macrófagos especialmente sensible a CTX [303] y que la deficiencia de macrófagos alveolares y peritoneales luego del tratamiento con CTX es mucho más persistente que la leucopenia, en un modelo murino de inmunosupresión [304].

Los macrófagos son las células inmunes más frecuentes del ovario, fundamentales para modular procesos como el desarrollo folicular, la ovulación, la luteinización y la angiogénesis [305]. También contribuyen a la continua remodelación

del ovario mediante la producción de metaloproteasas [306]. Se ha comprobado, tanto en humanos como en roedores, que los macrófagos ováricos remueven por fagocitosis a las células apoptóticas que se producen como resultado de la atresia y la luteólisis [307]. Los macrófagos también son responsables de la producción y secreción de numerosos factores de crecimiento, citoquinas y quemoquinas que regulan de forma parácrina la actividad de las células ováricas, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas [308]. Por ejemplo, Figueroa y col. han reportado que los macrófagos están involucrados en la etiología de PCOS, ya que los factores que secretan inducen apoptosis en células ováricas de un modelo de rata [309].

La activación de los macrófagos en el microambiente ovárico está regulada por la modulación local de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), que recluta y activa a los macrófagos [310]. Cabe resaltar que, además de los mismos macrófagos, las células tecales también pueden secretar MCP-1 para reclutar macrófagos [311]. Se sabe que, en el ovario, los macrófagos se localizan principalmente en la teca de los folículos en distintos estadios de desarrollo, dentro de los folículos atrésicos, en el estroma ovárico (cerca de los capilares perifoliculares) y asociados a los CL [308]. Además, aunque dentro de los tipos celulares presentes en FF predominan las células de granulosa, Barañao y col. han demostrado que casi un 8% de las células allí presentes son macrófagos derivados de ovario [312]. Por último, un interesante trabajo ha demostrado que la ablación local de macrófagos en el ovario altera severamente la vasculatura ovárica, produciendo hemorragias generalizadas en un modelo en ratón [313].

Si bien no hay literatura hasta el momento que evalúe los efectos de CTX en los macrófagos ováricos, todos estos antecedentes nos permiten hipotetizar que la citotoxicidad producida por CTX también afectaría a este tipo celular, y esto a su vez alteraría la funcionalidad del ovario.

### **Efectos de CTX sobre otros tejidos**

La quimioterapia podría potencialmente afectar la fertilidad, paralelamente a la citotoxicidad ovárica, a través del daño a la estructura y funcionalidad del útero y su capacidad de sostener un embarazo hasta llegar a término. Existen algunos trabajos que describen el daño de CTX sobre el endometrio, como el de Plowchalk y col., quienes reportaron una disminución en el peso uterino de ratones expuestos a CTX [314]. Se requieren más estudios para determinar los efectos de CTX sobre este y otros tejidos relevantes para la fertilidad.

### **PROTECCIÓN DE LA FERTILIDAD FRENTE A CTX**

En las últimas décadas, gracias a los avances en el diagnóstico temprano y en las tasas de supervivencia de las pacientes que padecen cáncer, el campo de la oncofertilidad ha cobrado gran importancia. Numerosas guías internacionales sobre preservación de la fertilidad recomiendan a los especialistas discutir con las pacientes acerca del riesgo que representan los tratamientos antitumorales y sobre su interés en concebir luego de recuperarse. Por todas estas razones, resulta imprescindible presentarle a las pacientes todas las opciones disponibles.

En el caso de los tratamientos con CTX, que tienen un riesgo muy alto de generar FOP, se han propuesto las siguientes estrategias para preservar la fertilidad femenina:

#### Criopreservación de gametas o embriones

Existen dos métodos posibles para criopreservar, el congelamiento lento y la vitrificación [315]. Aunque son técnicas de fertilidad asistida estándar, presentan ciertas dificultades, ya que se requiere de dos semanas como mínimo para realizar los protocolos de estimulación hormonal. Esto puede no ser lo indicado para pacientes que

necesiten comenzar inmediatamente la quimioterapia y para aquellas con tumores que responden a hormonas. Tampoco puede llevarse a cabo en pacientes prepuberales.

#### Criopreservación de tejido ovárico

Se ha comprobado que esta técnica, aunque experimental, es efectiva para preservar la fertilidad en pacientes bajo tratamientos gonadotóxicos [316]. Al reimplantarse el tejido, se logra una recuperación de la función ovárica durante 3 a 6 meses en casi todos los casos [317]. Es una buena opción comparada con la criopreservación de gametas o embriones porque solo se precisan unos días para su aplicación: la obtención de tejido puede realizarse por laparoscopia, en cualquier momento del ciclo menstrual y no requiere estimulación hormonal. Está especialmente indicada en niñas y adolescentes que aún no están en edad reproductiva [318].

#### Análogos de GnRH

La protección farmacológica del ovario frente a los efectos tóxicos de CTX es una opción particularmente atractiva para preservar la fertilidad [9]. Los análogos de GnRH, incluyendo agonistas y antagonistas, son candidatos en estudio para proteger al ovario a través de la supresión de sus funciones, ya que tienen la capacidad de inhibir el eje hipotálamo-hipofisario. Estos análogos han sido utilizados durante décadas en técnicas de fertilización asistida para producir una estimulación ovárica controlada [10]. El resultado buscado es detener el reclutamiento folicular y que así las células ováricas sean menos susceptibles al daño por CTX al entrar en un estado de quiescencia más resistente a la citotoxicidad. Se han reportado propiedades ovoprotectoras de estos análogos frente a la exposición con agentes alquilantes en algunos modelos animales: ratón [319], rata [290] y mono [320]. Sin embargo, otros reportes no han logrado ver efectos protectores de los análogos utilizados [321]. En humanos, los estudios prospectivos randomizados también presentan información contradictoria. Una de las

objeciones más fuertes contra los análogos de GnRH es que el reclutamiento inicial de folículos es independiente de gonadotrofinas, por lo que estos compuestos no podrían inhibir ese proceso. Si bien su efectividad sigue siendo controversial, se utiliza en la clínica debido a su bajo costo y poco riesgo.

### **POTENCIALES TRATAMIENTOS “FERTOPROTECTORES”**

La estrategia ideal sería proteger directamente al ovario del daño causado por tratamientos como CTX. Los candidatos tienen que cumplir con una serie de requisitos para cumplir su función como protectores ováricos: no interferir con la acción antitumoral de la quimioterapia; no ser tóxico por sí mismo, ni para el ovario ni para la paciente en general y no alterar la calidad de los ovocitos que se buscan proteger.

A continuación, se discuten diversos tratamientos posibles para la preservación ovárica.

#### **AS101**

AS101 es una molécula que se desarrolló como potencial tratamiento inmunomodulador [322]. Se ha demostrado que protege del daño hematopoyético y de la alopecia inducida por CTX y otros agentes quimioterapéuticos [323]. El mecanismo de acción de AS101 parece ser la estimulación de citoquinas como la IL-1 y la inhibición de IL-10 [324]. Un trabajo reciente ha sugerido que AS101 puede actuar como protector ovárico frente a CTX, previniendo la pérdida de folículos e inhibiendo la activación folicular excesiva [179].

## **AMH**

Kano y col. han propuesto utilizar AMH como protector del ovario con el objetivo de impedir el reclutamiento excesivo de folículos primordiales, que se desencadena al destruirse los folículos en desarrollo por el tratamiento con CTX [325]. Los autores demostraron que la administración de AMH en un modelo de FOP en ratón es efectiva y protege la reserva ovárica.

## **Inhibidores de mTOR**

Otro trabajo ha mostrado que inhibir la vía de señalización de mTOR contribuye a prevenir el daño por CTX en un modelo de ratón. Para ello, utilizaron un inhibidor específico de esa vía, que está fuertemente implicada en la activación de folículos primordiales [326].

## **Compuestos antioxidantes**

La capacidad de los antioxidantes de actuar como quimioprotectores está cobrando gran relevancia en los últimos años. Esto se debe a que agentes quimioterapéuticos como la doxorrubicina y CTX ejercen sus efectos negativos en parte a través de un aumento en el estrés oxidativo [292]. Por ejemplo, en un estudio reciente, se ha postulado que la melatonina tiene propiedades protectoras frente a la citotoxicidad de CTX. Los autores demostraron en un modelo de FOP en rata que esta hormona protege al ADN a través de su capacidad antioxidante, contrarrestando el daño causado por CTX [327].



## **Esfingolípidos**

Los esfingolípidos son moléculas bioactivas que han surgido como importantes reguladores del destino celular, ya que controlan un amplio espectro de funciones celulares. En particular, S1P es un esfingolípido que, como ya se ha mencionado anteriormente, posee importantes propiedades angiogénicas, antiapoptóticas y estimuladoras de la proliferación celular. Meng y col. demostraron que S1P previene la apoptosis y la pérdida de la reserva folicular en un modelo de xenotransplante de material ovárico humano transplantado a ratones [328]. En células de granulosa humana cultivadas en presencia de CTX, S1P fue capaz de inhibir la apoptosis mediante la activación de la vía de AKT [329]. Además, los efectos citoprotectores de S1P no solo se limitan a proteger del daño inducido por CTX, sino que también se observó que S1P disminuye la muerte de folículos primordiales por exposición a otros agentes quimioterapéuticos en un modelo murino, mientras que en primates fue capaz de proteger la función ovárica del daño por radioterapia [330].

## **EL ESFINGOLÍPIDO C1P: CANDIDATO PARA LA PRESERVACIÓN DE LA FERTILIDAD**

Sobre la base de todos los antecedentes descriptos, se buscó una molécula que tuviera propiedades anti-apoptóticas y fertoprotectoras para prevenir el daño gonadotóxico por CTX. El esfingolípido C1P, relacionado con S1P, cumple con muchos de los requisitos necesarios para convertirse en una terapia efectiva y novedosa.

### **Estructura y metabolismo de los esfingolípidos**

Los esfingolípidos son constituyentes esenciales de las células eucariotas. Fueron descubiertos en 1876 por J. L. W. Thudichum y durante mucho tiempo se

consideró que su función en la formación de las membranas era únicamente estructural. Sin embargo, el estudio de su metabolismo y función ha revelado que algunos miembros de la familia de los esfingolípidos, como la ceramida y la esfingosina, y sus derivados, como la ceramida-1-fosfato y la esfingosina 1-fosfato (S1P), además de realizar una función estructural en las membranas celulares tienen una función activa en procesos de regulación y vías de transducción de señales como la regulación del crecimiento celular, la diferenciación, la senescencia y la apoptosis [331]. Además, los esfingolípidos pueden agruparse dinámicamente en las membranas celulares con esteroides para formar microdominios lipídicos o rafts, los cuales funcionan como centros de transducción de señales y organización de proteínas [332].

Como todos los lípidos de membrana, los esfingolípidos son moléculas anfipáticas. La región hidrófoba consiste en una larga cadena base esfingoide, normalmente esfingosina, esfinganina o fitoesfingosina, a la que se une un ácido graso por una unión amida al carbono 2 (C2). La vía metabólica de los esfingolípidos presenta una intrincada red de reacciones que conducen a la formación de una gran diversidad de esfingolípidos, siendo la ceramida la estructura central de la biosíntesis y del catabolismo y precursor de esfingolípidos complejos [113,331].

Los esfingolípidos pueden sintetizarse de novo en el retículo endoplásmico liso a partir de serina y palmitato, que condensan gracias a la serin palmitoil transferasa para formar 3-cetodihidroesfingosina. Este compuesto, diversas reacciones en las que intervienen varias enzimas, acaba generando ceramida [113]. La ceramida también puede generarse por la hidrólisis de la esfingomielina a través de la acción de las esfingomielinasas, que rompen la esfingomielina generando ceramida y fosfolina [333]. Se conocen cinco tipos de esfingomielinasas, que se clasifican en función de su pH óptimo y su dependencia de cationes. Así, hay una esfingomielinasa ácida lisosomal y su forma secretada dependiente de  $Zn^{2+}$ , una alcalina y dos formas neutras.

La conversión de ceramida en ceramida 1-fosfato está catalizada por la ceramida quinasa (CerK), enzima clave para el control de los niveles de ceramida, la cual ha de ser transportada al complejo de Golgi para su fosforilación [334].

### **Características y señalización**

Si bien este esfingolípido está relacionado estructuralmente y comparte algunas funciones con S1P, es importante resaltar que *C1P presenta la ventaja de metabolizarse más lentamente y, en consecuencia, tiene una vida media mayor en fluidos biológicos que S1P* [335]. La concentración de ambos compuestos en sangre periférica es relativamente alta, ~0.5–1  $\mu\text{M}$ , y mucho menos en fluidos intersticiales. [336].

En comparación con S1P, que puede unirse a cinco receptores diferentes, los receptores de C1P aún no han sido identificados. Sin embargo, dado que la señalización de C1P se ve afectada por la toxina *pertussis*, se cree que su receptor es probablemente del tipo de siete pasos transmembrana, acoplado a proteína G, similar a los receptores de S1P [337].

### **El rol de C1P en la regulación celular**

Además de estar involucrado en los procesos de fagocitosis e inflamación, C1P es una molécula con efectos mitogénicos y anti-apoptóticos [338]. Por ejemplo, el mecanismo por el cual C1P ejerce sus efectos mitogénicos en macrófagos es la estimulación de las vías de señalización de MEK, ERK1-2, PI3-K/Akt y JNK [339]. Además, C1P es un potente inhibidor de la apoptosis [340,341]. La regulación negativa de la enzima que sintetiza C1P (CerK) disminuye el crecimiento y promueve la apoptosis [342].

Otro de los efectos anti-apoptóticos de C1P es que causa una potente inhibición de la esfingomielinasa ácida, y de esta manera, la depleción de los niveles celulares de ceramida (que es pro-apoptótica), como se observó en un estudio en macrófagos [341]. Lo interesante de este trabajo es que C1P bloqueó la actividad de la enzima incluso en homogenatos celulares, lo que sugiere que la inhibición de la esfingomielinasa ocurre por interacción física con C1P [341]. Por lo tanto, C1P sería un inhibidor natural de la esfingomielinasa ácida, mecanismo por el cual promueve la supervivencia celular.

## **METODOLOGÍA**

### **MODELO DE FALLA OVÁRICA PREMATURA (FOP) INDUCIDA POR QUIMIOTERAPIA EN RATÓN**

Todos los procedimientos fueron revisados y aprobados por el comité de ética del IByME (Protocolo N° CE-042-6/2015) y llevados a cabo en estricto acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio aprobados por el Instituto Nacional de la Salud de Estados Unidos (NIH).

Se utilizaron ratones híbridos de la generación F1 entre machos C57BL/6 x hembras Balb/c. Las colonias fueron mantenidas en condiciones controladas y libres de patógenos (21-23°C, con ciclos de 12 h de luz: 12 h de oscuridad). Los animales recibieron agua y alimento balanceado ad libitum.

El diseño experimental de los grupos se encuentra detallado en la Tabla 2.2. Ratones hembra de seis a ocho semanas de edad fueron pesados individualmente y se les administró una dosis única de CTX (75 mg/kg, volumen final: 200-300 µl) de manera intraperitoneal (i.p.), o bien un volumen equivalente de solución fisiológica en los animales control. Esta dosis de CTX es gonadotóxica, pero no esterilizante, y es utilizada por varios autores para desarrollar el modelo de FOP inducida por CTX [273,343,344].

Para la administración local de C1P, los animales fueron anestesiados vía i.p. con una combinación de ketamina-HCl (70 mg/kg; Holliday-Scott S.A, Buenos Aires) y xilacina (5 mg/kg; Laboratorios König, Buenos Aires) y sus ovarios fueron exteriorizados a través de una incisión en la región dorsal lumbar. Los animales del grupo control y del grupo CTX sufrieron cirugías sham, es decir, recibieron una inyección de agua destilada estéril bajo la bursa de ambos ovarios, mientras que los grupos CTX + C1P recibieron 5 µl de C1P (0,5 mM o 1 mM, según el grupo) bajo la bursa de cada ovario. Luego de las inyecciones, los ovarios fueron devueltos a su posición y la herida fue suturada. Las cirugías fueron realizadas 1 h antes de la inyección de vehículo

o CTX (75 mg/kg peso). Para los ensayos preliminares, ambas dosis de C1P fueron evaluadas. Tomando en consideración esos resultados, se eligió la dosis de 1 mM para los estudios subsiguientes.

|                           | <b>Control</b>          | <b>CTX</b>               | <b>CTX + C1P</b>                               | <b>CTX + C1P</b>                             |
|---------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Inyección intraperitoneal | <b>Vehículo</b><br>(SF) | <b>CTX</b><br>(75 mg/kg) | <b>CTX</b><br>(75 mg/kg)                       | <b>CTX</b><br>(75 mg/kg)                     |
| Inyección intrabursa      | <b>Vehículo</b><br>(SF) | <b>Vehículo</b><br>(SF)  | <b>C1P</b><br>(5 ul/ovario;<br><b>0,5 mM</b> ) | <b>C1P</b><br>(5 ul/ovario;<br><b>1 mM</b> ) |

**Tabla 2.2: Protocolo de inyección para los grupos experimentales del modelo de FOP desarrollado en ratón.**

En la mayoría de los casos, los animales fueron sacrificados dos semanas después de la cirugía y el método de eutanasia utilizado fue la dislocación cervical, para la posterior extracción de órganos. Las excepciones a esto fueron: los ensayos de fertilidad *in vivo*, para lo cual se mantuvieron vivas por más tiempo y cuyo diseño se detalla más adelante, y los estudios de hormonas. Para estudiar los niveles hormonales, se buscó que todos los animales estuvieran en la misma etapa del ciclo estral. Para ello, fueron cicladas diariamente mediante evaluación de la citología vaginal a partir del día 10 post-cirugía. Los ratones fueron sacrificados en el primer proestro luego de cumplirse los 14 días de tratamiento (el cual nunca fue posterior al día 17 post-cirugía). El método de eutanasia utilizado en este caso fue anestesia seguida de punción cardíaca terminal para obtener un volumen de sangre adecuado, pero también se extrajeron sus ovarios.

## **PROCESAMIENTO DE TEJIDOS**

Luego del sacrificio, se procedió a extraer los ovarios de cada animal, uno para realizar cortes histológicos y el contralateral para obtener extracto proteico. También fueron extraídos los cuernos uterinos, hígado y riñón de cada animal para su posterior análisis histopatológico.

Todos los órganos reservados para técnicas histológicas fueron fijados en solución de Bouin (Biopur S.A., Argentina) durante 18 h a 4° C, deshidratados e impregnados con parafina para la realización de cortes histológicos con micrótopo. Se utilizaron dos tipos de portaobjetos según la técnica a realizar posteriormente: para los cortes destinados a tinción con hematoxilina y eosina, se usaron portaobjetos esmerilados (Biotraza) y para las técnicas histoquímicas se usaron portaobjetos cargados positivamente (Patholab).

Por otra parte, los ovarios destinados para análisis de proteínas fueron congelados a -80° C hasta su posterior procesamiento.

## **RECUENTO FOLICULAR**

Para estudiar la morfología ovárica, se realizaron cortes histológicos seriados de 5 µm de espesor de todo el ovario. Uno de cada cinco cortes fue coloreado con hematoxilina – eosina y fue utilizado para contar el número de folículos primordiales, primarios, preantrales, antrales y atrésicos (Kalich-Philosophy col. [179], con modificaciones).

Se definió como folículos primordiales a aquellos que contenían un ovocito intacto rodeado de células foliculares planas y como primarios a aquellos con un ovocito de mayor tamaño rodeado de una única capa de células de granulosa de forma cuboidal. Los ovocitos con dos o más capas de granulosa, pero carentes de espacio entre las células de granulosa, fueron identificados como folículos preantrales. Se

consideraron folículos antrales a aquellos que contenían varias capas de células de granulosa, un ovocito definido, una cavidad antral y un compartimento tecal. Los folículos fueron identificados como atrésicos cuando presentaban numerosas células picnóticas y un ovocito de aspecto degenerado.

Una vez finalizado el recuento en todos los cortes, se estimó el número total de folículos de cada tipo multiplicando las sumas obtenidas por un factor de corrección igual a 5, para representar al ovario entero [345]. Los datos están presentados como número de folículos en cada estadio de desarrollo (n = 8/grupo).

Para corroborar que el recuento de folículos primordiales era el correcto, se realizó además una IHQ para marcar DDX4. Esta proteína, también conocida como VASA, es una helicasa dependiente de ATP que pertenece a la familia de proteínas de caja DEAD, caracterizadas por presentar el motivo conservado Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD) [346]. DDX4 es considerado un marcador específico de células germinales, ya que se expresa en el linaje germinal y se localiza en células madre de células germinales y en el citoplasma de ovocitos [347,348].

## **EVALUACIÓN DE FERTILIDAD *IN VIVO***

Para estudiar el efecto de la ciclofosfamida sobre los parámetros básicos de fertilidad, así como también para evaluar posibles efectos protectores por parte de C1P, se realizaron dos rondas sucesivas de apareamientos. Como se describió anteriormente, las hembras fueron divididas en tres grupos y se les administró CTX, CTX + C1P o bien recibieron vehículo (grupo control). En este caso, para asegurar el transcurso de dos ciclos completos de activación folicular luego de la administración de la quimioterapia, los cruzamientos comenzaron ocho semanas post-tratamiento. Las hembras fueron colocadas en jaulas con machos de la cepa C57BL/6 de fertilidad comprobada, en relación 1:1, y todas las mañanas fueron examinadas para determinar



si presentaban tapón vaginal. Una vez confirmado el apareamiento, las hembras fueron removidas de la jaula y trasladadas a jaulas individuales hasta el parto.

Se registraron las hembras que tuvieron preñeces exitosas, la duración de la gestación y las características de las crías (tamaño de la camada y peso de las crías en el día 2 post-natal). Seguidamente, las crías fueron retiradas de las jaulas y sacrificadas y las hembras se dejaron en recuperación hasta el siguiente cruzamiento. Para la segunda ronda, se repitieron todos los procedimientos ya detallados, con la única diferencia de que los machos fueron rotados aleatoriamente.

### **ENSAYOS DE FERTILIZACIÓN *IN VITRO* Y DESARROLLO EMBRIONARIO**

La fertilización *in vitro* (FIV) se realizó de acuerdo a lo descrito previamente por Gomez-Elias y col. [349]. Tres animales de cada grupo fueron superovulados mediante una inyección (i.p.) de eCG (5 UI; Syntex, Argentina) una hora antes del apagado de luces, seguida de una inyección (i.p.) de Hcg (5UI) 48 horas después. Entre 13 y 14 horas post-administración de hCG, se sacrificaron los animales y se recolectaron los complejos cumulus-ovocito de los oviductos. Los ovocitos con el cumulus intacto fueron inseminados con espermatozoides capacitados (concentración final:  $5 - 6 \times 10^5$  espermatozoides/ml) y las gametas fueron co-incubadas durante 3 horas a 37°C, en una estufa con una concentración atmosférica de de 5% (v/v) de CO<sup>2</sup> en aire.

Los ovocitos fueron evaluados bajo lupa estereoscópica y se los clasificó según su morfología como normales o anormales (ovocitos muertos y fragmentados). Luego, los ovocitos normales fueron transferidos a medio fresco y 15 h después, se registró el número de embriones de dos células. Estos embriones fueron a continuación transferidos a gotas de 50 ml de medio KSOM y continuaron su desarrollo durante 4 días a 37°C y una concentración de 5% (v/v) de CO<sup>2</sup>. Una vez cumplido ese período de tiempo,

se determinó la etapa de desarrollo alcanzada por cada embrión en un microscopio invertido (Nikon Eclipse TS100, Nikon).

## **TÉCNICA DE TUNEL**

Para cuantificar las células en apoptosis, se procesaron cortes histológicos de ovarios previamente fijados en solución de Bouin para localización *in situ* de núcleos con fragmentación apoptótica del ADN mediante la técnica de TUNEL [350]. Para ello, se utilizó un kit para detección de apoptosis (Apoptag plus peroxidase in situ Apoptosis detection kit; Chemicon Internacional, Inc.), como ha sido descrito previamente [190,351].

Las secciones de tejido fueron desparafinadas e hidratadas mediante lavados en alcoholes con graduación decreciente (100% - 70%) y tratadas con proteinasa K (Gibco) durante 15 min a temperatura ambiente. La peroxidasa endógena fue bloqueada por tratamiento con peróxido de hidrógeno al 3% en PBS. La reacción de marcación fue llevada a cabo incubando los cortes con un buffer que contiene digoxigenina-dUTP seguida por incubación con la enzima TdT por 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, el tejido fue incubado por 30 min con un anticuerpo monoclonal para digoxigenina conjugado a peroxidasa y, por último, se llevó a cabo la reacción con diaminobencidina (DAB), que permitió visualizar las células apoptóticas. Los controles negativos fueron realizados en ausencia de TdT. La tinción de contraste elegida fue el verde de metilo.

El número de células apoptóticas fue determinado contando las células marcadas en todos los tipos de folículos en campos de 400x (4 secciones/ovario; 5 ovarios/grupo). Aquellos folículos con un porcentaje de células marcadas mayor a 5% fueron considerados atrésicos. El índice de apoptosis se calculó como la proporción de folículos atrésicos sobre el total de cada estadio folicular.

## RESULTADOS

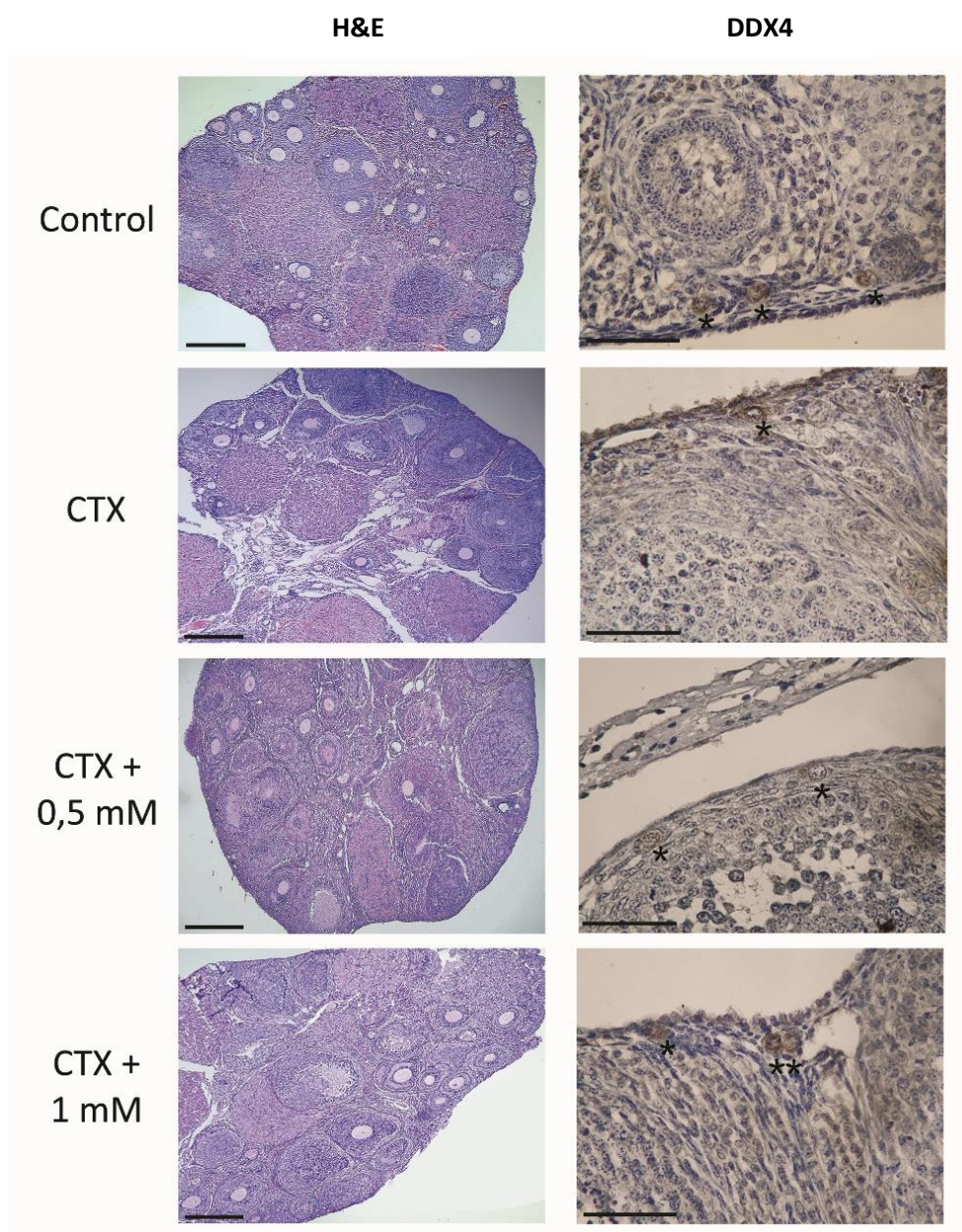
### **Efecto de C1P sobre la foliculogénesis ovárica y la morfología uterina en el modelo de FOP inducida por ciclofosfamida (CTX).**

Como se mencionó anteriormente, CTX produce un daño severo en la dinámica folicular. Sobre la base de estos antecedentes, se realizó una evaluación histológica de los ovarios. Se observó que los ovarios tratados con CTX, en comparación con los ovarios controles, se encuentran dañados, ya que presentan fibrosis cortical y células estromales alteradas. Por otra parte, los dos grupos de animales que recibieron las dos dosis de C1P (0,5 mM y 1 mM) junto con CTX exhiben ovarios similares a los ovarios sanos del grupo control (Fig. 2.3A)

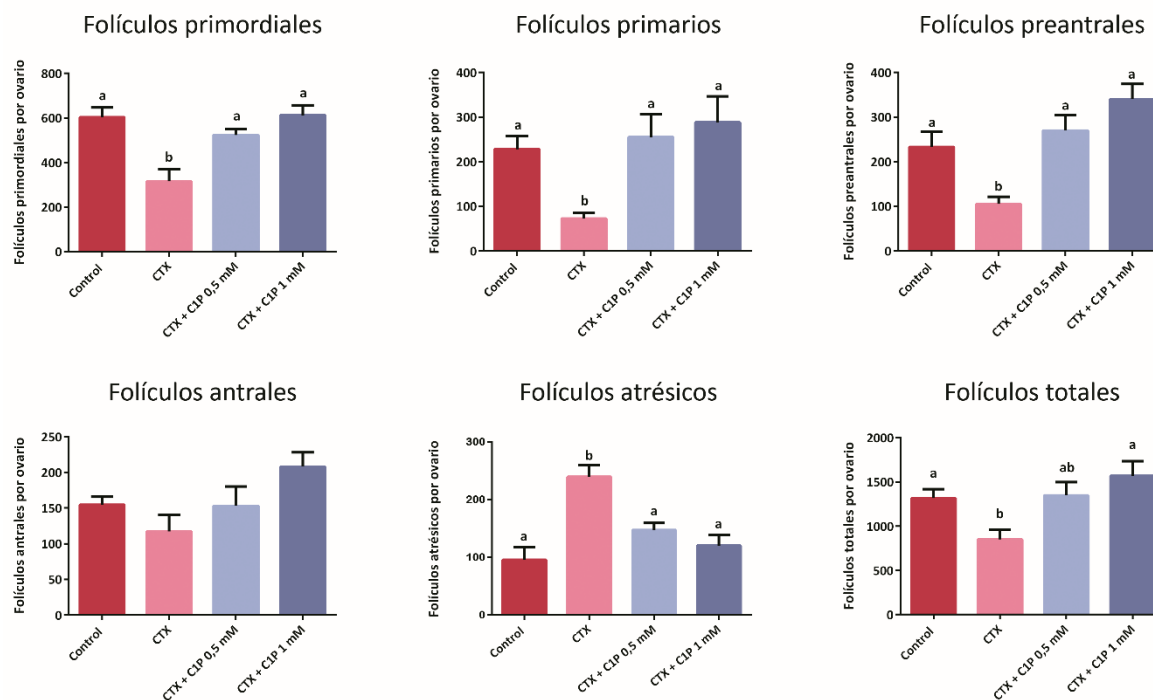
A continuación, se llevó a cabo la clasificación y cuantificación de los distintos estadios foliculares. En los animales tratados con CTX se encontró que el número de folículos primordiales ( $p < 0,01$ ), primarios ( $p < 0,05$ ) y preantrales ( $p < 0,05$ ) disminuyó respecto al control, mientras que aumentó el número de folículos atrésicos ( $p < 0,001$ ), lo cual confirma el efecto gonadotóxico de esta droga quimioterapéutica (Fig 2.3B). En los grupos a los cuales se les co-administró C1P, en ambas dosis, junto con CTX, los ovarios mantuvieron valores que no difirieron del grupo control en todos los estadios foliculares estudiados. Esto implica que, en comparación con el grupo que recibió solo CTX, tanto la dosis de C1P de 0,5 mM como la de 1 mM provocaron un aumento de folículos en estadios tempranos (primordiales y primarios:  $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ ; preantrales:  $p < 0,01$  y  $p < 0,001$ , respectivamente) y una disminución en el número de folículos atrésicos ( $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ , respectivamente).

Además, la suma total de los distintos estadios foliculares fue significativamente menor en ratones tratados con CTX respecto del grupo control ( $p < 0,05$ ). Mientras que el número total de folículos en el grupo CTX + C1P 0,5 mM fue comparable al grupo control, pero no significativamente distinto al grupo tratado con

CTX, la dosis más alta de C1P (1 mM) fue capaz de prevenir la disminución en el número total de estructuras foliculares que se observó en el grupo CTX ( $p < 0,01$ ).



**Figura 2.3: Efecto de C1P sobre la morfología ovárica en el modelo de FOP inducida por ciclofosfamida.** Imágenes representativas de cortes histológicos de ovario de todos los grupos experimentales (control, CTX, CTX + C1P 0,5 mM y CTX + C1P 1 mM). Panel izquierdo: Microfotografías de cortes de ovario coloreados con H&E. Las barras representan 200  $\mu\text{m}$ . Panel derecho: Marcación de las células germinales por IHQ con un anticuerpo anti-DDX4, que permite la identificación de folículos primordiales. Los asteriscos indican la presencia de folículos primordiales. Las barras representan 50  $\mu\text{m}$ .



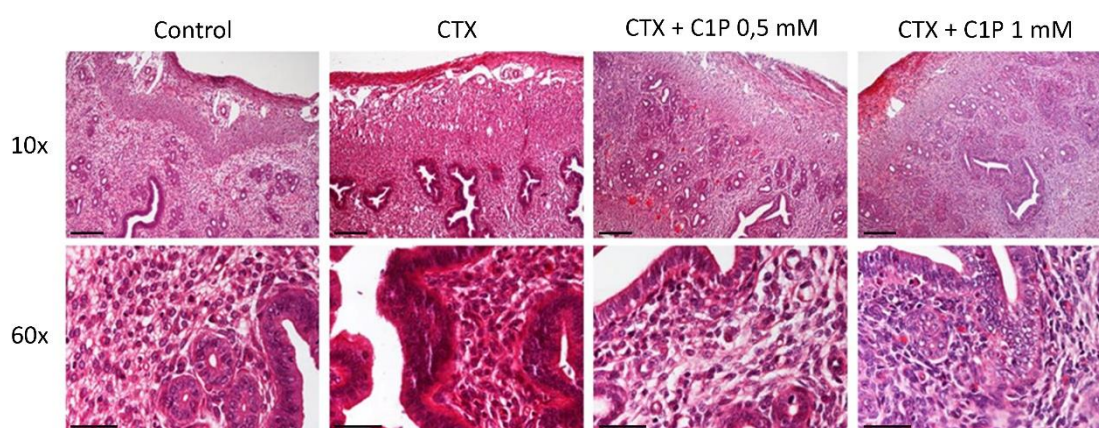
**Figura 2.4: Efecto de CIP sobre la foliculogénesis ovárica en el modelo de FOP inducida por ciclofosfamida.** Efecto de la administración de CTX y la co-administración de CTX y CIP sobre el número de folículos primordiales, primarios, preantrales, antrales, atrésicos y sobre la suma total de folículos luego de dos semanas de tratamiento. Los datos están expresados como la media  $\pm$  ESM;  $n = 6-8$  animales/grupo. Las distintas letras indican las diferencias significativas entre grupos, utilizando ANOVA de una vía, seguido por el test de comparación múltiple de Tukey.

A partir de cortes histológicos de úteros de los grupos control, CTX y CTX + CIP en ambas dosis (0,5 y 1 mM), se realizó una evaluación de la arquitectura endometrial de manera comparativa (Fig. 2.5). En condiciones control, y de acuerdo a lo esperado, los cuernos uterinos y el fundus están compuestos por una mucosa recubierta por epitelio (endometrio) y de una la capa muscular (miometrio). El endometrio se encontraba dispuesto en elevados pliegues transversales, rico en vasos e innervaciones. El epitelio endometrial está formado por una monocapa de células columnares, que se extienden hasta formar glándulas tubulares, generalmente ramificadas, que se insertan dentro del compartimento estromal, el cual contiene tejido conectivo reticular laxo, con numerosas células y matriz extracelular. Los animales tratados con CTX presentaron alteraciones endometriales en comparación con los controles, que afectaron tanto al

epitelio como al estroma. En particular, hubo una severa disminución en la cantidad de ramificaciones glandulares, así como en el tejido estromal, que perdió su característica laxitud. Por otra parte, en los animales a los que se les co-administró C1P en cualquiera de las dosis estudiadas, se pudo observar que el estroma mantiene su calidad y su tejido conectivo laxo, y se conservan las ramificaciones glandulares del epitelio endometrial. Además, se observó un aumento en las estructuras vasculares, predominantemente en el endometrio y en estrato vascular.

Debido a la completa recuperación de todos los estadios foliculares con la dosis de C1P 1 mM, sumado a los resultados observados por análisis histológico del efecto de C1P sobre los cuernos uterinos, esta fue la dosis seleccionada para realizar todos los experimentos subsiguientes.

Con el objetivo de descartar un posible efecto de C1P a nivel sistémico, se realizó un análisis morfológico en cortes histológicos teñidos con H&E de órganos más distantes, como hígado y riñón, provenientes de los distintos grupos experimentales. No se observó ningún cambio a nivel morfológico en los tejidos analizados (datos no mostrados).

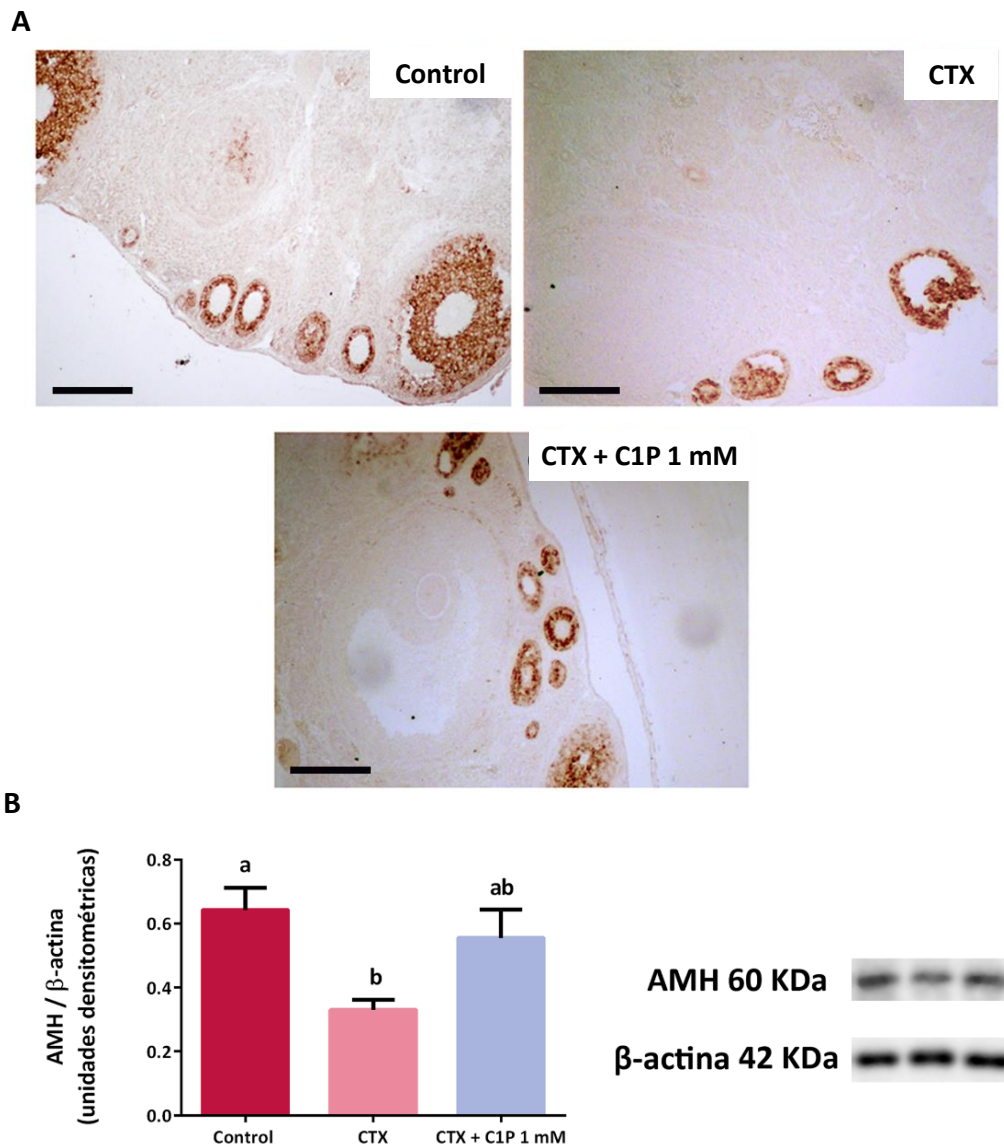


**Figura 2.5: Efecto de C1P sobre la morfología uterina en el modelo de FOP inducida por quimioterapia.** Microfotografías representativas de cortes histológicos con H&E en los que puede observarse los tejidos uterinos de animales de los grupos control, CTX y CTX + C1P en ambas dosis. Los cuernos uterinos de ratones tratados con CTX presentan alteraciones tanto en el compartimiento epitelial como estromal del endometrio, comparados con ratones control, mientras que la co-administración de C1P ayuda a preservar la calidad endometrial. Paneles superiores: magnificación original 10x, las barras representan 200  $\mu\text{m}$ . Paneles inferiores: magnificación original 60x, las barras representan 50  $\mu\text{m}$ .

### **Efecto de C1P sobre la expresión ovárica de AMH en el modelo de FOP inducida por ciclofosfamida**

Para corroborar los resultados obtenidos en los estudios de morfología ovárica, se evaluó la expresión de AMH por IHQ. Esta hormona es sintetizada solamente en células de granulosa de folículos primarios a folículos antrales tempranos, mientras que en las etapas finales del desarrollo folicular (dependientes de FSH), las células de la granulosa dejan de expresar AMH. También lo pierden los folículos que se tornan atrésicos. Los resultados obtenidos en los diferentes grupos experimentales mostraron que CTX afecta severamente la expresión de AMH, mientras que la administración de C1P protege al ovario de este efecto, al menos parcialmente (Fig. 2.6A).

Estos resultados fueron corroborados por la técnica de Western blot, utilizando homogenatos de ovario completo (Fig. 2.6B). La expresión proteica de AMH fue menor en el grupo tratado con CTX respecto del grupo control ( $p < 0,05$ ), mientras que el tratamiento con C1P mantuvo la expresión AMH en niveles similares al control.



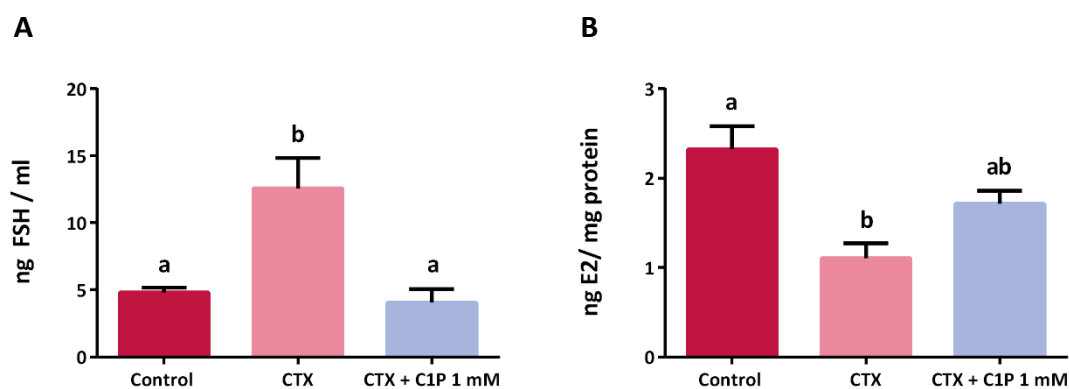
**Figura 2.6: Efecto del esfingolípido C1P sobre la expresión de AMH en el modelo de FOP inducida por ciclofosfamida.** A: Microfotografías representativas de ovarios de ratón de todos los grupos experimentales (control, CTX y CTX + C1P en ambas dosis), que fueron marcados mediante IHQ para la hormona AMH. La coloración marrón localizada en el citoplasma celular fue considerada inmunomarcación positiva. Las barras representan 100  $\mu$ m. B. Expresión proteica de AMH en ovarios analizada por Western Blot, incluyendo la cuantificación de AMH relativizada a  $\beta$ -actina (izquierda) y bandas representativas de cada proteína (derecha). Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  ESM; n = 6 animales/grupo. Las distintas letras indican las diferencias significativas entre grupos, utilizando ANOVA de una vía, seguido por el test de comparación múltiple de Tukey (a vs b:  $p < 0.05$ ).



### Efecto de C1P sobre los niveles hormonales en el modelo de FOP inducida por ciclofosfamida

En base a los resultados obtenidos con relación al efecto quimioprotector de C1P sobre la dinámica folicular, se evaluó el efecto de este esfingolípido sobre la concentración de hormonas sexuales en el modelo de FOP. Para ello, se midieron los niveles de FSH sérica y de E2 en tejido ovárico por la técnica de RIA en todos los grupos experimentales (Fig. 2.7). El tratamiento con CTX incrementó en forma significativa la concentración sérica de FSH, mientras que este aumento fue prevenido por la co-administración de C1P ( $p < 0,01$ , CTX vs. control y CTX vs. CTX + C1P).

Por otra parte, los niveles de E2 ováricos disminuyeron significativamente en los animales tratados con CTX ( $p < 0,01$ ). Sin embargo, cuando se administró también C1P, estos niveles se mantuvieron semejantes al control. Cabe mencionar que los niveles de E2 en suero fueron indetectables.



**Figura 2.7: Efecto del esfingolípido C1P sobre los niveles hormonales en el modelo de FOP inducida por ciclofosfamida.** A: Concentraciones séricas de FSH en ratones control, tratados con CTX y co-tratados con CTX y C1P. Los datos están expresados como ng de FSH por ml de suero. B: Concentración de E2 en tejido ovárico de ratones control, tratados con CTX y co-tratados con CTX y C1P. Los valores fueron relativizados al contenido de proteína en el ovario y están expresados como ng de E2 por mg de proteína. Los datos están expresados como la media  $\pm$  ESM;  $n = 6$  animales/grupo. Las distintas letras indican las diferencias significativas entre grupos, utilizando ANOVA de una vía, seguido por el test de comparación múltiple de Tukey.

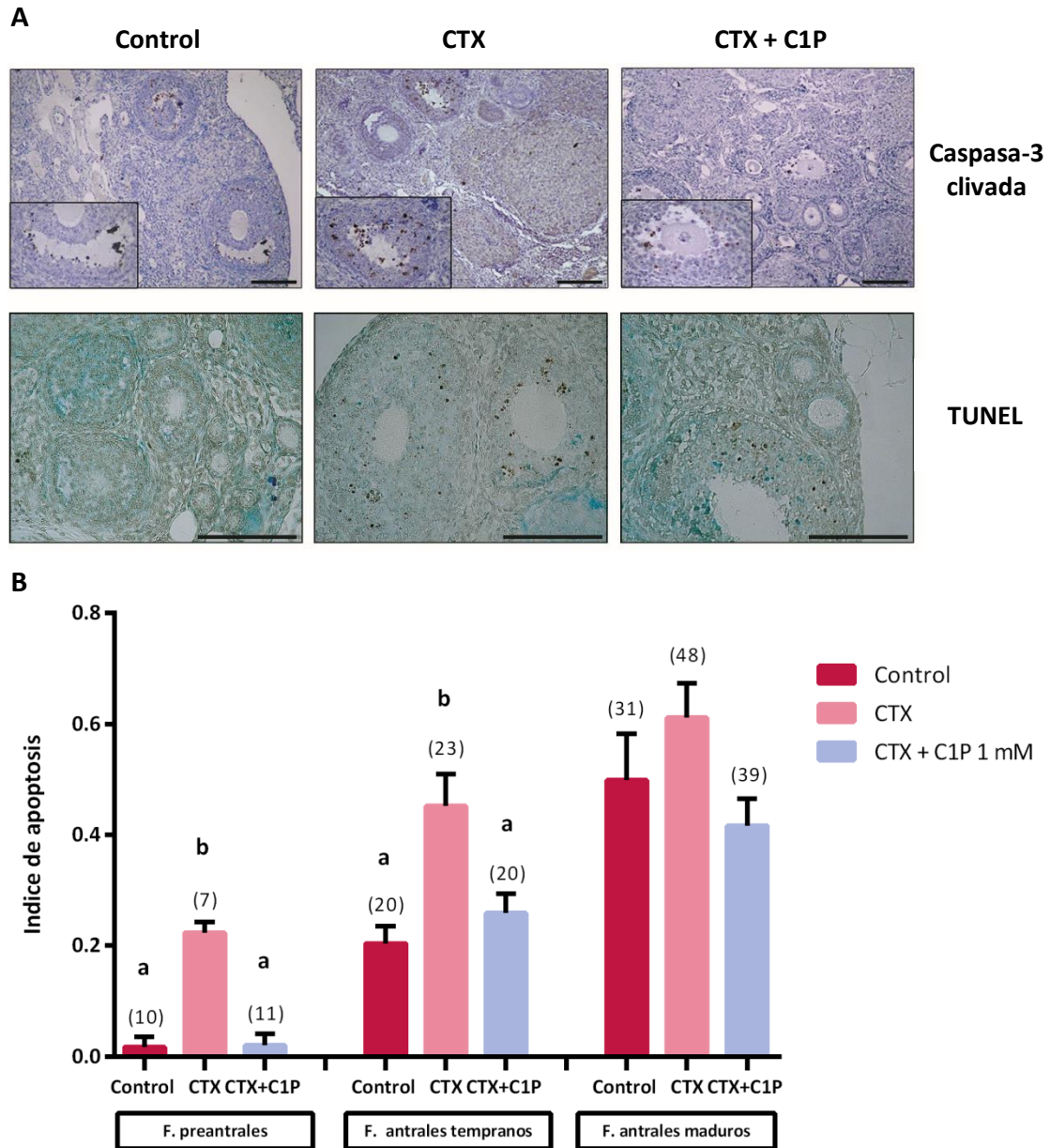
### **Efecto de C1P sobre la apoptosis en el modelo de FOP inducida por ciclofosfamida**

Dado que CTX causa un aumento en el número de folículos atrésicos, el cual es revertido por C1P, se evaluó el efecto de este esfingolípido sobre el grado de apoptosis existente en los distintos grupos experimentales.

Para ello, se llevaron a cabo las técnicas de IHQ, utilizando un anticuerpo que detecta caspasa-3 clivada, y de TUNEL, con el objetivo de identificar células apoptóticas. En el grupo tratado con CTX, una gran cantidad de folículos en desarrollo (es decir, en estadios de preantral a antral maduro) presentó una extensiva marcación de células de granulosa en apoptosis, pero la severidad fue menor en ovarios cotratados con CTX y C1P, como muestra la Fig. 2.8A.

A partir de los cortes procesados por la técnica de TUNEL, todos los folículos fueron clasificados de acuerdo a su estadio y se cuantificaron las células marcadas positivamente en cada uno de ellos (Fig. 2.8B). Los resultados mostraron un aumento en el índice de apoptosis (folículos positivos para TUNEL/folículos totales) en folículos preantrales y antrales tempranos tratados con CTX, en comparación con el grupo control ( $p < 0.001$  y  $p < 0,01$ , respectivamente). En cambio, la administración de C1P disminuyó el índice de apoptosis a niveles similares al grupo control en los estadios foliculares mencionados anteriormente. Además, se cuantificó el número de células promedio por folículo marcadas como apoptóticas para cada estadio folicular. No se encontraron diferencias significativas en este parámetro.

Cabe resaltar que no se observó ninguna marca positiva en células pertenecientes a folículos primordiales ni primarios, tanto por IHQ como por TUNEL. Por lo tanto, en este trabajo no se han encontrado evidencias de que la depleción de la reserva folicular en respuesta a CTX esté dada por apoptosis.

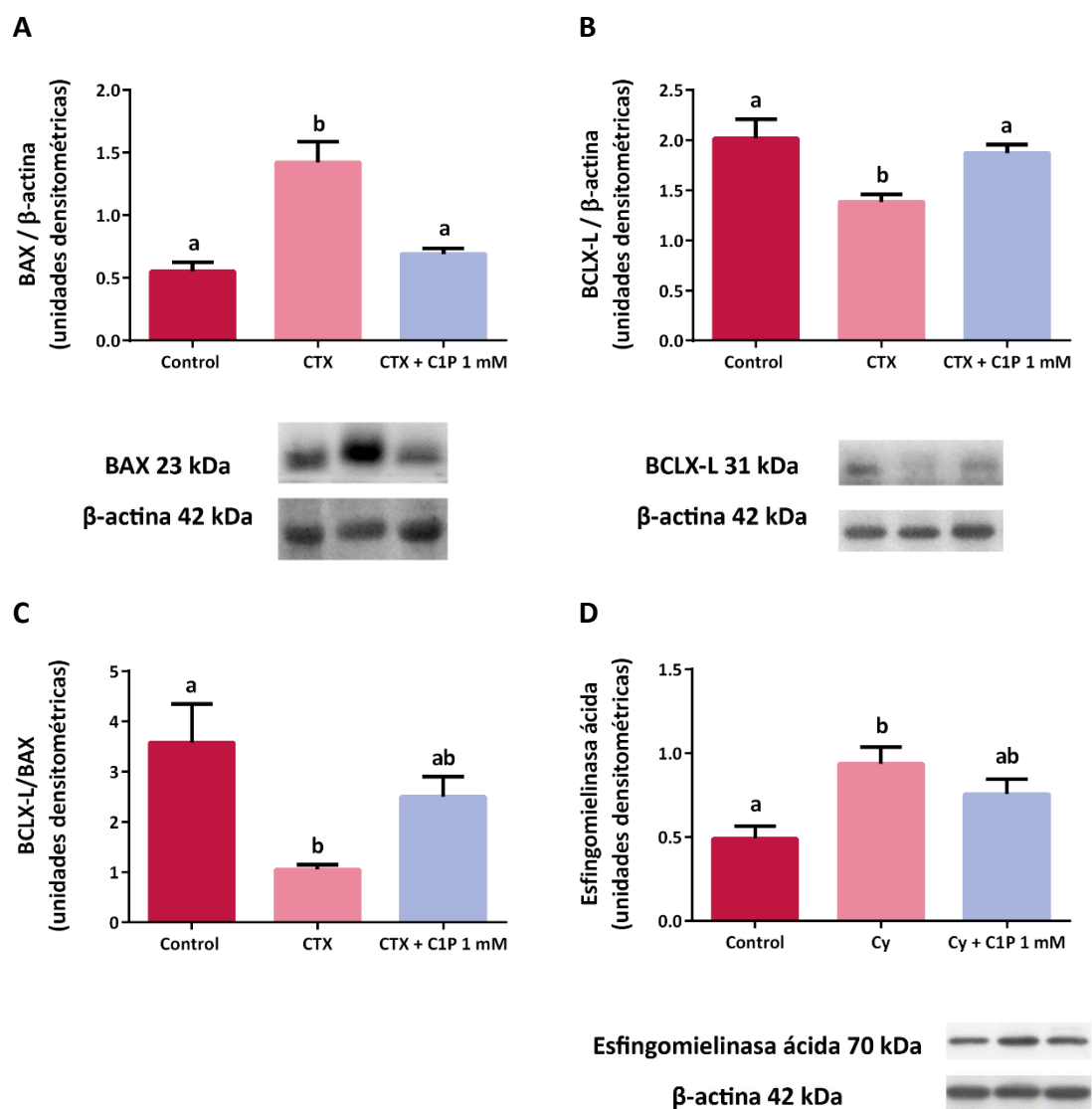


**Figura 2.8: Efecto de C1P sobre la muerte celular de células ováricas en el modelo de FOP inducida por ciclofosfamida.** A: Microfotografías representativas de ovarios de ratón de todos los grupos experimentales (control, CTX y CTX + C1P 1 mM), que fueron marcados mediante IHQ para detectar la proteína caspasa-3 en su forma clivada (panel superior) y mediante la técnica de TUNEL para detectar fragmentación apoptótica del ADN (panel inferior). En ambos casos, la coloración marrón fue considerada marcación positiva. Las barras representan 100  $\mu$ m. Los recuadros son magnificaciones digitales. B. Cuantificación del índice de apoptosis, a partir de las imágenes obtenidas por TUNEL. El índice de apoptosis fue calculado para cada estadio folicular como la proporción de folículos apoptóticos/folículos totales ( $n = 5/\text{grupo}$ ). Las distintas letras indican las diferencias significativas entre grupos, utilizando ANOVA de una vía, seguido por el test de comparación múltiple de Tukey. Los números entre paréntesis representan el número promedio de células positivas para TUNEL en cada etapa folicular, según el tratamiento recibido. No se observaron células marcadas en folículos primordiales y primarios en ninguno de los grupos experimentales en estudio.

Luego, para estudiar en mayor profundidad el efecto de C1P sobre la apoptosis causada por CTX, se evaluó la expresión de las proteínas anti- o pro-apoptóticas mediante Western blot. En primer lugar, se analizó la expresión de la proteína pro-apoptótica BAX y de la proteína anti-apoptótica BCLX-L, como muestra la Fig 2.9. El tratamiento con CTX produjo un aumento en la expresión de BAX ( $p < 0,01$ ) y una disminución en la expresión de BCLX-L ( $p < 0,01$ ), en comparación con ovarios control. La relación BCLX-L:BAX fue significativamente menor en animales tratados con CTX ( $p < 0,05$ ). Al administrar C1P conjuntamente con CTX, tanto los niveles de expresión de BAX, BCLX-L como la relación entre ambos fueron restaurados a niveles similares al grupo control (y significativamente diferentes al grupo CTX).

El esfingolípido C1P ejerce su efecto anti-apoptótico a través de la inhibición de la enzima esfingomielinasa ácida [341], que es la enzima responsable de aumentar los niveles de ceramida, un esfingolípido pro-apoptótico. En base a estos antecedentes, se evaluó el efecto de C1P sobre la expresión de esta enzima en el modelo de FOP en estudio. Los niveles de expresión de la esfingomielinasa fueron mayores en los ovarios tratados con CTX comparados con ovarios controles ( $p < 0,05$ ), mientras que en los ovarios del grupo CTX + C1P este aumento fue parcialmente revertido, es decir, similares al grupo control (Fig. 2.9D).

**Página siguiente - Figura 2.9: Efecto de C1P sobre la expresión ovárica de proteínas pro- y anti-apoptóticas en el modelo de FOP inducida por ciclofosfamida.** El contenido proteico de BAX, BCLX-L, esfingomielinasa ácida y  $\beta$ -actina fue analizado por Western blot en los distintos grupos experimentales (control, CTX y CTX + C1P). Los gráficos de barra muestran la cuantificación densitométrica de cada proteína o la relación entre las mismas (paneles superiores), junto con imágenes de inmunoblots representativos (paneles inferiores). A: Análisis de la expresión de BAX. B: Análisis de la expresión de BCLX-L. C: Análisis de la relación entre contenido de BCLX-L y BAX. D: Análisis de la expresión de esfingomielinasa ácida. Los valores fueron expresados en unidades densitométricas arbitrarias y relativizados al contenido de  $\beta$ -actina. En todos los casos, los datos corresponden a la media  $\pm$  ESM de 3 experimentos independientes,  $n = 6$  animales/grupo. Las distintas letras indican las diferencias significativas entre grupos, utilizando ANOVA de una vía, seguido por el test de comparación múltiple de Tukey.



### Efecto de C1P sobre la vasculatura ovárica en el modelo de FOP inducida por ciclofosfamida

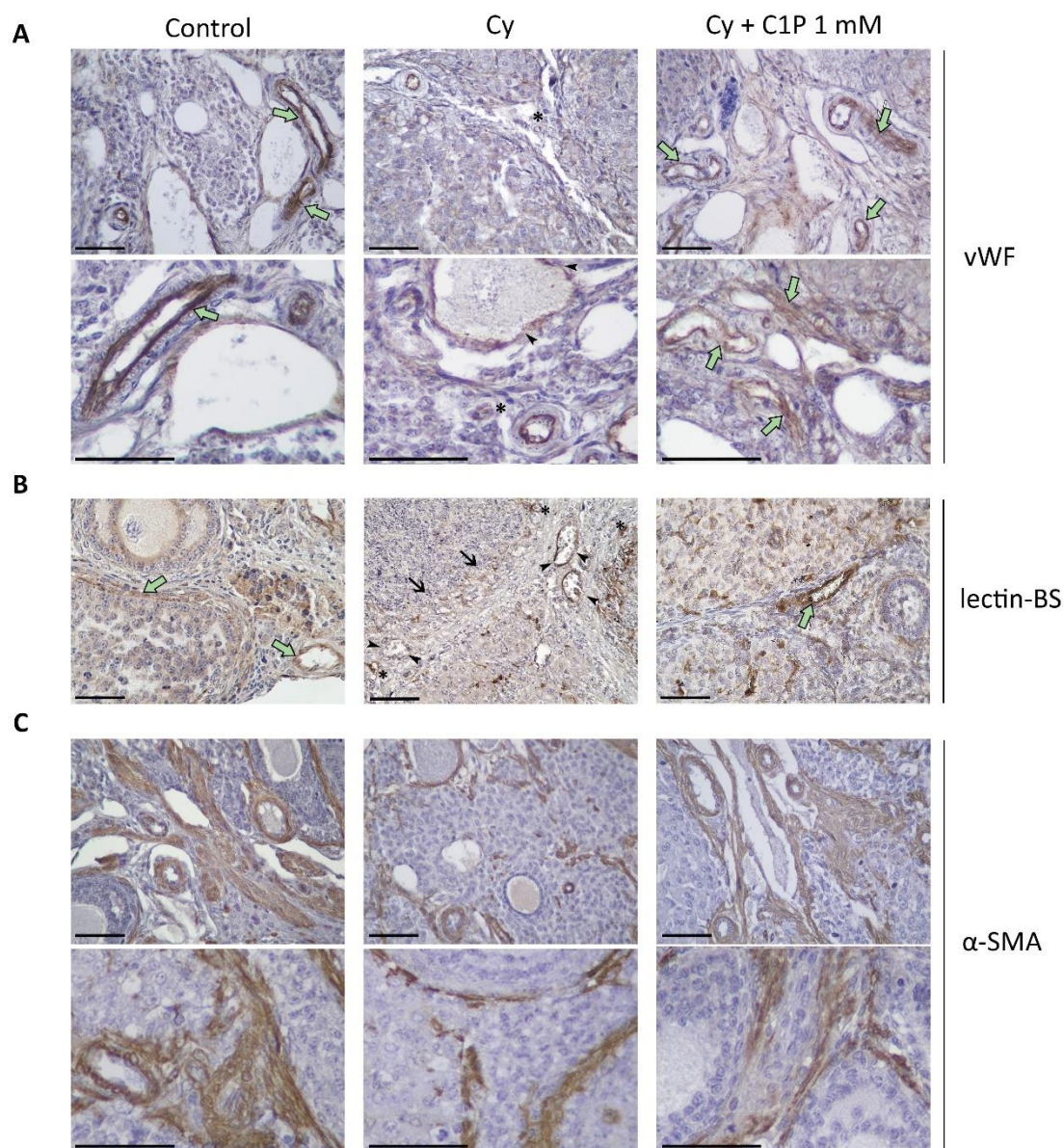
Considerando que CTX ocasiona daño severo sobre la vasculatura ovárica, se evaluó el efecto de C1P sobre las células endoteliales y peri-endoteliales provenientes del modelo de FOP. Para esto, se realizó una IHQ empleando un anticuerpo contra vWF y una marcación con lectina biotilada, ambas para detectar células endoteliales, así como también una IHQ utilizando un anticuerpo contra  $\alpha$ -SMA para detectar células peri-endoteliales (pericitos, células de músculo liso vascular y otras células murales), como muestra la Fig. 2.10.

Los cortes histológicos del grupo control presentaron un estroma ovárico homogéneo con numerosas estructuras vasculares distribuidas entre los folículos. Como muestran las marcas positivas para lectina y vWF, el endotelio está dispuesto en una capa continua.

El tratamiento con CTX causó injuria vascular, evidenciada por sectores de endotelio discontinuado. Además, se observó en este grupo una mayor hialinización y engrosamiento de las paredes vasculares, a expensas del lumen, especialmente en grandes vasos estromales. En respuesta a esta injuria, los ovarios tratados con CTX mostraron además un aumento en la neovascularización (formación de nuevos pequeños vasos), predominantemente localizados alrededor de los folículos.

En cuanto al grupo CTX + C1P, el engrosamiento de las paredes vasculares fue menos pronunciado y la neovascularización fue prácticamente nula. Además, C1P restauró la presencia de estructuras vasculares sanas en el estroma y se recuperó la continuidad del endotelio, lo que sugiere que C1P protege del daño endotelial generado por CTX, al menos de forma parcial (Fig. 2.10A-B).

Como ya se mencionó anteriormente, la marcación contra  $\alpha$ -SMA permite visualizar células peri-endoteliales (Fig. 2.10C). En condiciones control, se observaron con frecuencia células positivas en vasos asociados a folículos y en vasos estromales. En los ovarios tratados con CTX, se detectaron células marcadas de forma interrumpida alrededor de los vasos sanguíneos, lo que sugiere un recubrimiento pobre y, en consecuencia, una menor estabilidad vascular. En concordancia con los resultados de marcación de células endoteliales, la administración de C1P impidió los efectos dañinos causado por CTX, al menos parcialmente, lo cual condujo a una mayor proporción de células positivas para  $\alpha$ -SMA y, por ende, a una mayor estabilidad vascular.



**Figura 2.10: Efecto de C1P sobre la vasculatura ovárica en el modelo de FOP inducida por ciclofosfamida.** Microfotografías representativas de la marcación de células endoteliales con vWF (A), lectina-BS (B) y de células peri-endoteliales con  $\alpha$ -SMA (C) en ovarios de los distintos grupos experimentales (control, CTX y CTX + C1P 1 mM). Nótese en los animales tratados con CTX: el aumento en las disrupciones en la vasculatura estromal (cabezas de flecha), la escasa e intermitente presencia de células marcadas en la vasculatura del compartimento tecal (flechas negras) y los incipientes vasos sanguíneos propios de la neovascularización (asteriscos). Estas características contrastan con las gruesas bandas, sin interrupciones, de células positivamente marcadas (flechas verdes) que conforman los vasos sanguíneos en el grupo control y el grupo tratado con CTX y C1P. Las barras representan 50  $\mu$ m.

### Efecto de C1P sobre la fertilidad en el modelo de FOP inducida por ciclofosfamida

Con el objetivo de evaluar el efecto protector de C1P sobre la capacidad reproductiva, se llevaron a cabo ensayos *in vivo* de cruzamiento. En la Tabla 2.3 se encuentran descriptos todos los parámetros de fertilidad estudiados. Utilizando la presencia de tapón vaginal como señal, se corroboró el apareamiento en todos los cruzamientos de ambas rondas, entre 1 y 3 días luego de introducir las hembras en las jaulas de los machos.

Si bien no se hallaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados durante la primera ronda de cruzamientos, solamente dos de los cinco ratones tratados con CTX tuvieron cría en la segunda ronda, mientras que todas las hembras del grupo control y del grupo CTX + C1P resultaron fértiles (Tabla 2.3,  $p=0.0133$ ). Sumado a eso, los animales tratados con CTX que sí lograron una preñez exitosa, tuvieron un tamaño de camada significativamente menor que el grupo control. (Table 1,  $p<0.05$ ). Los animales co-tratados con CTX y C1P tuvieron un mayor número de crías, comparado con el grupo que solo recibió CTX. Sin embargo, la diferencia no resultó significativa en comparación con el grupo control ni con el grupo CTX.

|                                                           | Ronda 1 (8 semanas post-tratamiento) |            |                | Ronda 2 (12 semanas post-tratamiento) |                        |                         |
|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------|------------|----------------|---------------------------------------|------------------------|-------------------------|
|                                                           | Control                              | CTX        | CTX + C1P 1 mM | Control                               | CTX                    | CTX + C1P 1 mM          |
| Índice de apareamiento                                    | 5/5 (100%)                           | 5/5 (100%) | 6/6 (100%)     | 5/5 (100%)                            | 5/5 (100%)             | 6/6 (100%)              |
| Índice de fertilidad (Hembras con crías nacidas/ total) † | 5/5 (100%)                           | 4/5 (80%)  | 5/6 (83,3%)    | 5/5 (100%) <sup>a</sup>               | 2/5 (40%) <sup>b</sup> | 6/6 (100%) <sup>a</sup> |
| Tamaño de la camada (número promedio de crías) #          | 9,8±0,6                              | 9,6±1,3    | 8,2±1,1        | 11,7±1,2 <sup>a</sup>                 | 3,5±1,5 <sup>b</sup>   | 8,4±1,5 <sup>ab</sup>   |
| Peso promedio de las crías (g) #                          | 1,52±0,09                            | 1,51±0,03  | 1,64±0,11      | 1,44±0,07                             | 1,52±0,06              | 1,62±0,12               |



**Página anterior - Tabla 2.3: Efecto de C1P sobre la fertilidad natural en el modelo de FOP inducida por ciclofosfamida.** Descripción de los parámetros de fertilidad estudiados, en todos los grupos experimentales (control, CTX y CTX + C1P) y tiempos (8 y 12 semanas post-tratamiento). Las distintas letras indican las diferencias significativas entre grupos (a vs b:  $p < 0,05$ ). † Análisis estadístico correspondiente al test de Chi-Cuadrado. # Análisis estadístico correspondiente a ANOVA de una vía, seguido por el test de comparación múltiple de Tukey.

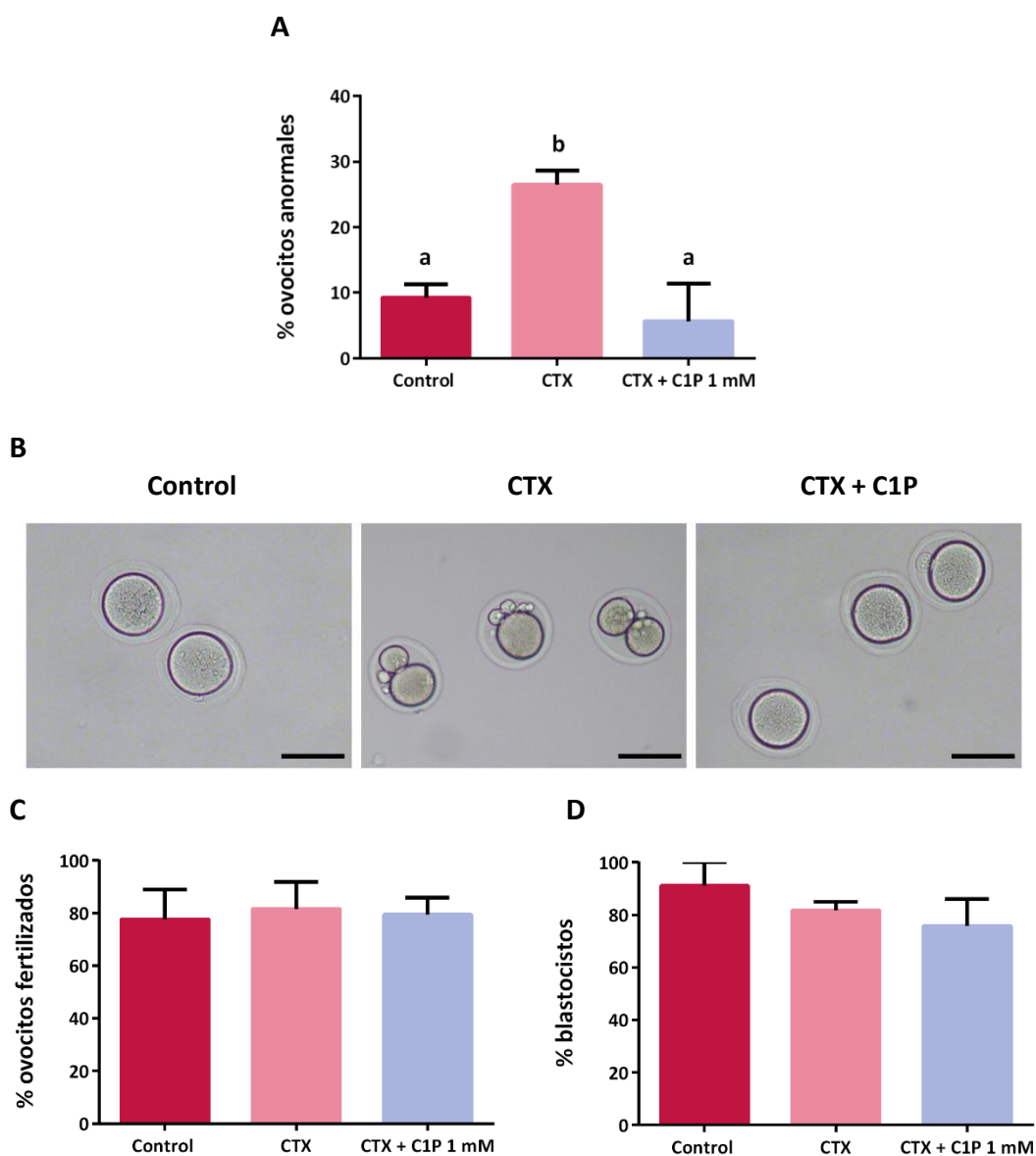
### **Efecto de C1P sobre la calidad ovocitaria y la fertilización *in vitro* en el modelo de FOP inducida por ciclofosfamida**

Para dilucidar si el efecto de los tratamientos sobre la fertilidad natural respondía a alteraciones en los ovocitos, se realizaron experimentos de fertilización *in vitro* a partir de ovocitos recuperados de hembras adultas superovuladas de cada grupo experimental.

El número total de ovocitos recuperados fue similar entre los grupos experimentales (datos no mostrados). Sin embargo, el tratamiento con CTX causó un incremento en la proporción de ovocitos anormales comparados con el control ( $p < 0,05$ ). La administración de C1P protegió a los ovocitos de este efecto (Fig. 2.11).

Los ovocitos normales fueron incubados para evaluar su capacidad de ser fertilizados. Ninguno de los tratamientos modificó los porcentajes de ovocitos que siguieron su desarrollo hasta alcanzar el estadio de embrión de dos células.

Además, para evaluar si CTX detiene el desarrollo embrionario pre-implantatorio, se monitoreó la progresión de los embriones de dos células a blastocistos. No se hallaron diferencias en el porcentaje de blastocistos obtenidos entre los distintos grupos experimentales.



**Figura 2.11 – Efecto de C1P sobre la calidad ovocitaria y la fertilización in vitro en el modelo de FOP inducida por ciclofosfamida.** A: Cuantificación de la proporción de ovocitos anormales calculada como el porcentaje de ovocitos anormales respecto del número de ovocitos totales recuperados de cada animal. B: Microfotografías representativas de ovocitos pertenecientes a los grupos experimentales (control, CTX y CTX + C1P). La barra representa 100  $\mu$ m. C: Cuantificación de la proporción de ovocitos fertilizados, calculada como el porcentaje de ovocitos que, luego de ser incubados con espermatozoides, formaron un embrión de dos células respecto del número total de ovocitos viables de cada animal. D: Cuantificación de la proporción de blastocistos en día 4, calculada como el porcentaje de embriones que se desarrollaron hasta formar un blastocisto respecto del número de embriones de dos células obtenidos de cada animal. Las distintas letras indican las diferencias significativas entre grupos (a vs b:  $p < 0,05$ ), utilizando ANOVA de una vía, seguido por el test de comparación múltiple de Tukey.

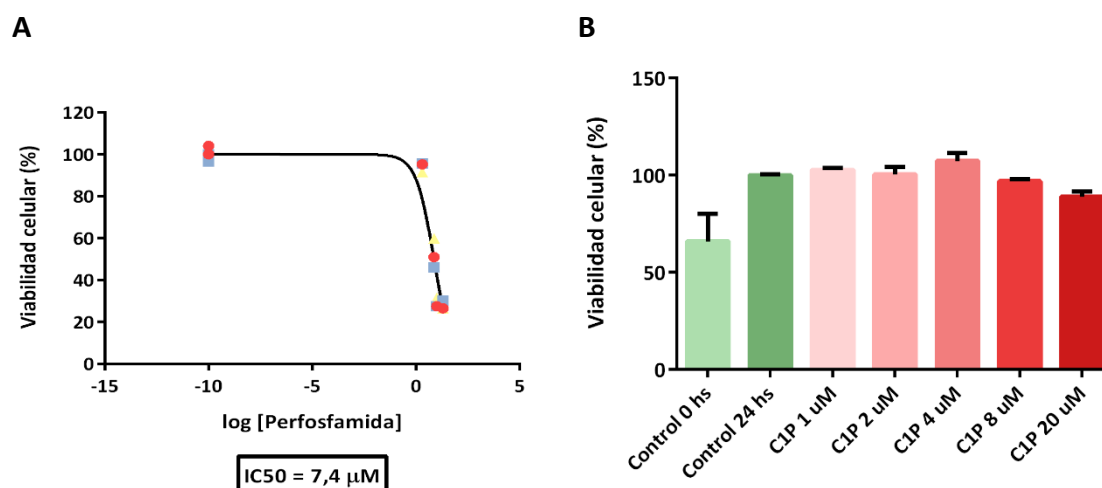
---

**Efecto de C1P sobre la funcionalidad de macrófagos en presencia de ciclofosfamida**

Los macrófagos son las células inmunes más frecuentes en el ovario y su correcta funcionalidad es necesaria para los procesos de foliculogénesis, ovulación y luteinización. Su depleción puede conducir a serias complicaciones de la función ovárica, como ya han descrito otros autores. Dado el rol anti-apoptótico y protector del esfingolípido C1P, decidimos probarlo también como potencial protector para los macrófagos ováricos.

Para ello, utilizamos una estrategia *in vitro*, utilizando la línea de macrófagos J774A.1, que es una línea derivada de macrófagos de ascitis de ratón, que son los que se asemejan en mayor medida a los macrófagos peritoneales que se hallan poblando el ovario. Debido a que la ciclofosfamida requiere de una reacción de hidroxilación que ocurre en el hígado para convertirse en un componente activo, se utilizó el metabolito perfosfamida para todos los ensayos *in vitro* realizados en esta sección.

En primer lugar, se buscó determinar el valor de IC50 de perfosfamida para poder realizar los ensayos subsiguientes. Para ello, se realizó una curva dosis-respuesta con concentraciones entre 2 y 20  $\mu\text{M}$  (Fig. 2.12A). Se observaron importantes efectos citotóxicos a partir de la dosis de 5  $\mu\text{M}$  de perfosfamida y se calculó una concentración media inhibitoria (IC50) aproximada de 7,4  $\mu\text{M}$ , por lo que la concentración de perfosfamida utilizada para todos los ensayos subsiguientes fue de 7,5  $\mu\text{M}$ . Además, se estudió el efecto de C1P *per se* (es decir, en ausencia de perfosfamida) sobre la viabilidad celular de los macrófagos mediante una curva de concentraciones. No se encontraron diferencias significativas en el rango de C1P estudiado (1 a 20  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 2.12B).

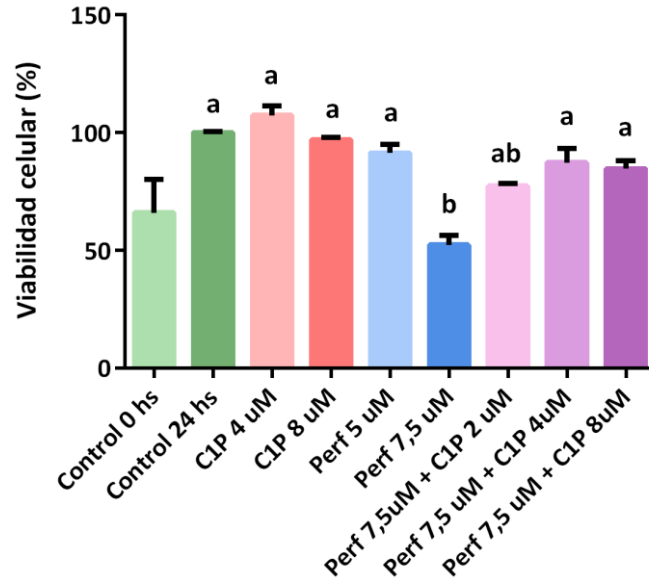


**Figura 2.12:** Puesta a punto de las condiciones experimentales: efecto por separado de la perfosfamida y del esfingolípido C1P sobre la viabilidad celular de la línea de macrófagos J774A.1.

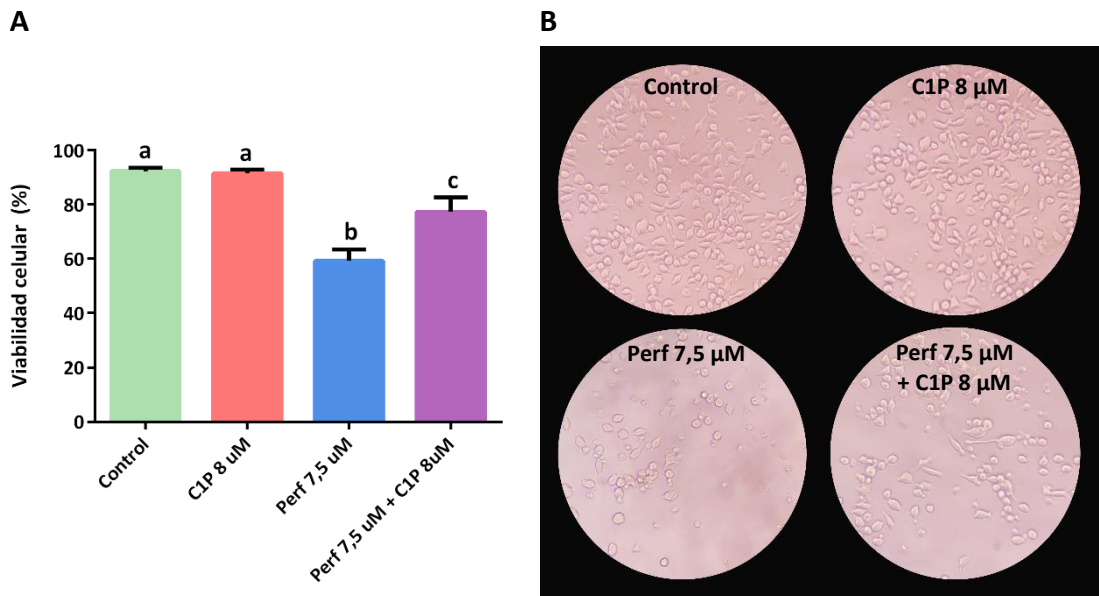
A: Curva dosis-respuesta en función de la concentración de perfosfamida (2 a 20  $\mu$ M). Tiempo de tratamiento: 24 h. El IC50 calculado fue 7,4  $\mu$ M. B: Efecto sobre la viabilidad de concentraciones crecientes de C1P (1 a 20  $\mu$ M). Tiempo de tratamiento: 24 h. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos.

Una vez establecidas las concentraciones a utilizar, se realizaron los ensayos de viabilidad correspondientes (Fig. 2.13). Los resultados mostraron que la presencia de C1P revirtió parcial o totalmente la disminución en la viabilidad ocasionada por la perfosfamida, de una manera dosis-dependiente. Se eligió la concentración de C1P 8  $\mu$ M como dosis a ser co-administrada junto con la perfosfamida para los ensayos subsiguientes.

Estos resultados se corroboraron mediante la técnica de exclusión por azul de tripán, en las condiciones de mayor interés (Fig. 2.14A). Cabe mencionar que las células mostraron diferencias en cuanto a su morfología según los diferentes estímulos que se les aplicaron, como puede evidenciarse en la Fig. 2.14B.



**Figura 2.13:** Efecto del esfingolípido C1P sobre la viabilidad celular de la línea de macrófagos J774A.1 medida por MTS en presencia de perfosfamida. Las barras representan la media  $\pm$  ESM, en forma de porcentaje respecto del control a 24 h. Tests estadísticos utilizados: ANOVA y test de Tukey. Las distintas letras indican las diferencias significativas entre grupos (a vs b:  $p < 0,01$ ).

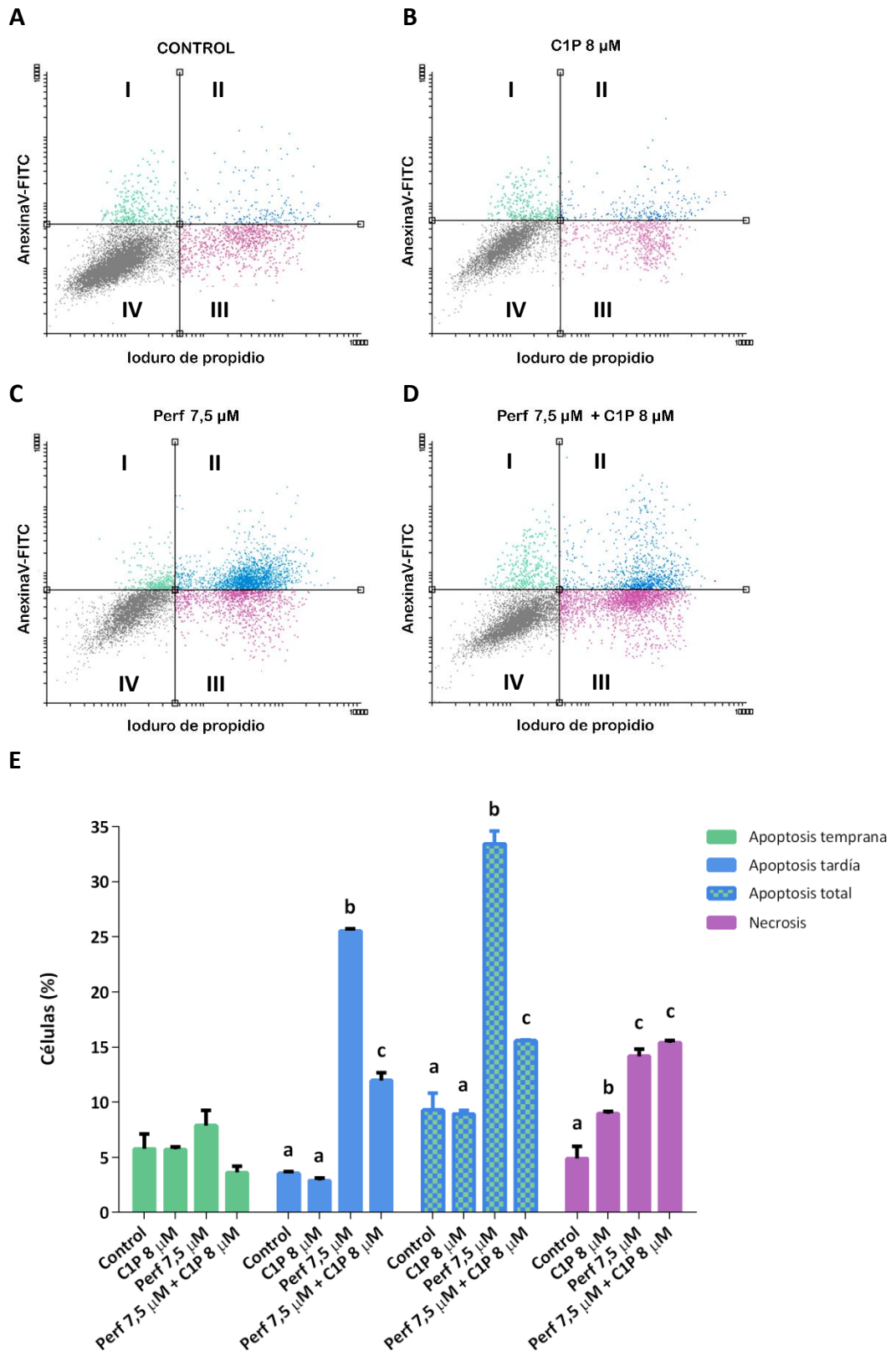


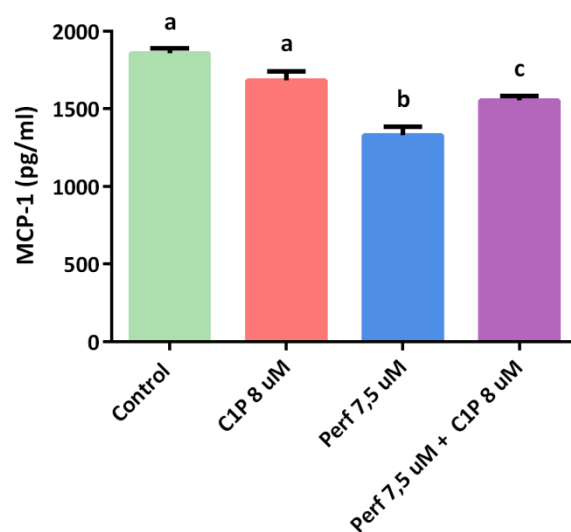
**Figura 2.14:** Efecto del esfingolípido C1P sobre la viabilidad celular y la morfología celular de la línea de macrófagos J774A.1 en presencia de perfosfamida. A: Efecto de C1P sobre la viabilidad celular en presencia de perfosfamida, medida por el ensayo de exclusión con azul de tripán. Las barras representan la media  $\pm$  ESM en forma de porcentaje. Tests estadísticos utilizados: ANOVA y post-test de Tukey. Las distintas letras indican las diferencias significativas entre grupos (a vs b:  $p < 0,0001$ ; a vs c:  $p < 0,05$ ; b vs c:  $p < 0,05$ ;  $n \geq 3$ /grupo). B: Efecto de C1P sobre la morfología celular en presencia de perfosfamida. Microfotografías tomadas de los macrófagos J774A.1 en las distintas condiciones experimentales. Aumento 100x.

A continuación, se estudió más en profundidad la citotoxicidad provocada por la perfosfamida. Para esto, se tiñeron los macrófagos con yoduro de propidio y anexina V y se les realizó un análisis por citometría de flujo, tal como muestra la Fig. 2.15. La perfosfamida ocasionó un aumento de la muerte celular, tanto por apoptosis como por necrosis. El tratamiento con C1P fue capaz de prevenir en forma parcial la apoptosis tardía en presencia de perfosfamida. Sin embargo, el C1P no inhibió los eventos necróticos.

Por último, se evaluó la producción de citoquinas de relevancia por parte de los macrófagos en las distintas condiciones experimentales mediante ELISA. Los resultados mostraron una disminución significativa en la concentración de MCP-1 en presencia de perfosfamida respecto del control. Esta disminución se vio parcialmente revertida con la co-administración de C1P junto con la perfosfamida (Fig. 2.16). Por otra parte, se evaluó la concentración de interleuquina-6, pero no se detectaron niveles suficientes en ninguna de las condiciones experimentales en los tiempos estudiados (datos no mostrados).

**Página siguiente - Figura 2.15: Efecto del esfingolípido C1P sobre la muerte celular en la línea de macrófagos J774A.1 en presencia de perfosfamida.** Panel superior: Evaluación de muerte celular por citometría de flujo luego de una doble tinción con anexina-V + yoduro de propidio en las distintas condiciones experimentales (A: control; B: C1P; C: perfosfamida y D: perfosfamida + C1P). Los cuadrantes indican las distintas poblaciones de células de la siguiente manera: I) Apoptosis temprana; II) Apoptosis tardía; III) Necrosis y IV) Dobles negativas. Panel inferior: Cuantificación de las poblaciones obtenidas (E). Los valores se expresan como porcentaje y corresponden a la media  $\pm$  ESM de 3 experimentos independientes. Tests estadísticos utilizados: ANOVA y post-test de Tukey. Las distintas letras indican las diferencias significativas entre las condiciones de una misma población celular.





**Figura 2.16: Efecto del tratamiento con C1P sobre la producción de la citoquina MCP-1 en la línea de macrófagos J774A.1, en presencia de perfosfamida.** Los valores están expresados en pg/ml y representan la media  $\pm$  ESM de 3 experimentos independientes. Tests estadísticos utilizados: ANOVA y post-test de Tukey. Las distintas letras indican las diferencias significativas entre condiciones. a vs b:  $p < 0,01$ ; b vs c  $p < 0,05$ ; a vs c:  $p < 0,01$ .



## DISCUSIÓN

La FOP inducida por quimioterapia o radioterapia es un cuadro que reviste importancia epidemiológica por su alta incidencia asociada a las mejoras en la supervivencia de pacientes que superan el cáncer, en las que los tratamientos convencionales causan pérdida de la reserva ovárica y, por ende, infertilidad [269,352,353].

En este trabajo, utilizamos el agente alquilante CTX, un quimioterapéutico comúnmente empleado en terapias anti-tumorales. Este compuesto induce la formación de puentes inter e intracatenarios en la doble hélice de ADN, afectando la replicación del ADN y la división celular [354]. En particular, está demostrado que CTX genera un severo daño ovárico, el cual abarca alteraciones en la dinámica folicular y en la producción de esteroides, la destrucción de folículos en crecimiento y, en consecuencia, una reducción en el número de folículos totales [179,287,355].

Las estrategias que se utilizan en la actualidad para proteger el ovario del daño por quimioterapia no garantizan la preservación de la fertilidad femenina. Estos tratamientos involucran el uso de agonistas de GnRH para suprimir la liberación de FSH y LH o bien la criopreservación de ovocitos, embriones o corteza ovárica. En Argentina, uno de los tratamientos farmacológicos más utilizados para proteger la función ovárica son los análogos de GnRH, administrados antes y durante los tratamientos anti-tumorales. Lamentablemente, no está comprobada la eficacia de este tratamiento para la preservación de la fertilidad [321]. Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevas estrategias para proteger el ovario de pacientes que se van a someter a los tratamientos quimioterapéuticos. En esta tesis, evaluamos la utilización del esfingolípido C1P como factor citoprotector frente a la toxicidad inducida por CTX, con la finalidad de resguardar al ovario. Por primera vez, hemos demostrado que la administración intrabursa de C1P aumenta la foliculogénesis y los niveles de E2 y de AMH, mientras que atenúa la pérdida de folículos primordiales y disminuye los niveles de FSH y de

apoptosis en ovarios de ratón tratados con CTX. Además, observamos que la administración local de este esfingolípido reduce el daño en el estroma y las disrupciones en los vasos sanguíneos causadas por la quimioterapia. Además, hallamos que C1P mejora la morfología uterina y los parámetros de fertilidad en el modelo de FOP mencionado.

Se conoce por antecedentes en la literatura que CTX ocasiona una reducción en la población de folículos primordiales y primarios en modelos de ratón y rata [286,293]. Asimismo, Raz y col. (2002) y Abir y col. (2008) han demostrado que el tratamiento con CTX afecta a los folículos preantrales tanto *in vivo* como *in vitro* [356,357]. En esta tesis, se demuestra por primera vez que la administración *in vivo* de C1P en ovarios de ratón expuestos a CTX reduce la pérdida de folículos primordiales, aumenta la cantidad de folículos primarios y preantrales y disminuye el número de folículos atrésicos. Estos resultados sugieren que C1P protege la reserva ovárica y contribuye a un normal desarrollo folicular, mitigando los severos efectos gonadotóxicos de CTX. En concordancia con estas observaciones, diversos autores han estudiado el rol de otro esfingolípido relacionado, S1P, en el ovario [358]. Tal es el caso de Morita y col. (2000), que demostraron que el tratamiento *in vivo* con S1P podría prevenir la FOP inducida por radioterapia [360]. Además, se observó que la administración local de S1P (2 mM) protege a los folículos de la muerte celular inducida por dacarbazina [358]. Es preciso mencionar que en nuestros experimentos utilizamos concentraciones aún menores de C1P (0,5 a 1 mM), en comparación con el estudio de Hancke y col. (2007) [358].

Los folículos primordiales constituyen la población folicular de mayor importancia, dado que la reserva ovárica no es renovable. La activación de estos folículos es irreversible, y por lo tanto, culmina en la ovulación o en atresia. En consecuencia, mantener quiescente la reserva folicular resulta crucial para la preservación de la fertilidad. En el presente trabajo, observamos que CTX reduce la

población de folículos primordiales, lo cual es consistente con publicaciones previas [286,361,362]. No obstante, C1P fue capaz de disminuir la pérdida de folículos primordiales observada en ovarios tratados con CTX, lo que permite inferir que C1P puede modular diversos caminos de señalización que regulan esta población de folículos. Se sabe que la quiescencia en este estadio folicular está controlada por numerosos factores, tales como la vía de señalización PI3K/PTEN/AKT, Foxl2, Foxo3a y AMH [179,294,363,364]. Actualmente, se están realizando estudios para evaluar el efecto de C1P sobre los mecanismos de regulación que activan a la población de folículos primordiales.

AMH es una hormona producida por células de la granulosa de folículos en estadios de primario a antral temprano, y es la principal responsable de inhibir la activación de folículos primordiales y mantener quiescente la reserva ovárica [342,365]. Se considera que los niveles séricos de AMH en pacientes son un factor predictivo de la población de folículos en crecimiento y que correlacionan con el número de folículos primordiales [300]. Precisamente, se ha propuesto medir los niveles de AMH como un marcador de la función ovárica en pacientes de cáncer de mama [366]. En este trabajo, hemos observado que la expresión ovárica de AMH es menor en los ovarios expuestos a CTX respecto de ovarios control. Este resultado es consistente con estudios previos que mostraron que los niveles de AMH descienden durante la quimioterapia [298]. En esta tesis, también hemos demostrado que C1P aumenta la expresión de AMH en ovarios tratados con CTX. Una posible explicación es que C1P previene el daño ovárico porque induce la expresión de AMH y, por ende, disminuye el reclutamiento excesivo de folículos primordiales dado por el tratamiento quimioterapéutico. Cabe mencionar que Kano y col. (2016) han demostrado recientemente que el tratamiento con AMH durante distintas terapias anti-tumorales (carboplatino, doxorubicina y CTX) protege la reserva ovárica en ratones [325]. Sin embargo, no puede descartarse que C1P esté evitando la activación de folículos

primordiales por mecanismos alternativos y, de esta manera, el aumento en los niveles de AMH sea debido a que hay un mayor número de folículos pequeños que expresan AMH. Se requieren más estudios sobre este tema para dilucidar estas hipótesis.

Está demostrado que CTX causa disfunción ovárica en roedores por aumento de la apoptosis y por alteraciones en la dinámica folicular, lo cual afecta la producción de hormonas esteroideas [367,368]. Asimismo, se ha reportado que la toxicidad ovárica inducida por CTX produce pérdida generalizada de folículos pequeños de manera dosis-dependiente, asociada a la reducción de los niveles de E2 [355]. Los resultados de esta tesis mostraron que el tratamiento con C1P disminuye la concentración de FSH en suero y aumenta la concentración de E2 en ovario en animales tratados con CTX. Debido a que en las pacientes la quimioterapia es causante de alteraciones en el desarrollo folicular y además induce hipogonadismo, dado por altos niveles de FSH y bajos niveles de E2 [270], estos resultados sugieren que C1P podría tener propiedades protectoras frente a las secuelas inducidas por CTX.

Junto con este estudio, muchos otros han determinado que CTX promueve la atresia, afectando severamente el correcto desarrollo folicular [368,369]. Al mismo tiempo, CTX provoca apoptosis y estrés oxidativo en células ováricas [356]. Al tener CTX un fuerte efecto sobre las células en proliferación, las células de granulosa de los folículos en crecimiento (especialmente preantrales y antrales) son naturalmente blanco de esta droga, induciendo apoptosis en los mencionados estadios foliculares. En este trabajo se demostró que las células positivas para TUNEL en folículos preantrales y antrales tempranos disminuyen con la administración de C1P en ovarios expuestos a CTX. Estos resultados fueron consistentes con lo observado en la inmunomarcación de caspasa 3 clivada. Es importante resaltar que no hemos encontrado evidencia de que la depleción de los folículos primordiales esté causada por apoptosis. En efecto, CTX puede desencadenar la activación y crecimiento folicular, originando así un fenómeno conocido como “burnout”, que consiste en el agotamiento de la reserva ovárica.

[179,370]. En línea con nuestras observaciones, en este trabajo los análisis histológicos han evidenciado ausencia de apoptosis en folículos primordiales y, en cambio, presencia de apoptosis en folículos más avanzados. El “burnout” folicular ha sido descrito en diversos modelos de knock-out en ratón [371,372], como también en estudios *in vitro* en cortezas ováricas humanas [373,374].

Por otra parte, se ha demostrado que la vía de señalización de PI3K/PTEN/AKT, clave para la activación de folículos primordiales, está regulada positivamente por CTX, es decir, que este compuesto genera una ola de reclutamiento folicular que conduce a la depleción de la reserva ovárica [375]. Aún falta dilucidar si la regulación de esta vía por parte de CTX se debe a un efecto directo sobre los ovocitos y las células de pregranulosa que conforman los folículos primordiales, o si se debe a un efecto indirecto causado por la destrucción de los folículos en desarrollo.

Las células ováricas expuestas a CTX sufren apoptosis a través de la vía intrínseca y presentan una desregulación de la expresión de los miembros de la familia de BCL-2. Asimismo, CTX induce la activación de la pro-caspasa 3, principal enzima efectora en desencadenar el proceso de apoptosis [290,376]. En el modelo de FOP estudiado, los ovarios tratados con CTX presentan menor expresión de la isoforma larga de BCLX (factor anti-apoptótico) junto con un aumento en la expresión de BAX (factor pro-apoptótico). A pesar de esto, la administración local de C1P restauró la expresión de estas proteínas a valores control en comparación con los animales que sólo recibieron CTX. En línea con estos resultados, Gómez Muñoz y col. (2005) han demostrado que el efecto anti-apoptótico de C1P está mediado por un aumento en la expresión de la isoforma anti-apoptótica BCLX-L y, de esta manera, inhibe la muerte celular en macrófagos derivados de médula ósea en condiciones inductoras de apoptosis [340]. No obstante, son pocos los trabajos que han explorado el rol anti-apoptótico de C1P. Uno de ellos es el estudio de Mitra y col. (2007), quienes han

demostrado que la regulación negativa de la ceramida kinasa induce apoptosis y disminuye el crecimiento en células de mamífero [342].

Por otra parte, Gomez Muñoz y col. (2004) han demostrado que C1P tiene una función anti-apoptótica en macrófagos derivados de médula ósea por la cual está directamente involucrado en la inhibición de la esfingomielinasa ácida. Esto a su vez genera un descenso en los niveles de ceramida (que es pro-apoptótica) y bloquea la vía de las caspasas 9 y 3 [341]. En concordancia con esto, nuestros resultados demuestran que CTX incrementa la expresión de esfingomielinasa ácida comparado con el grupo control y que C1P logra disminuir estos niveles en ovarios tratados con CTX. Esto sugiere que C1P lograría reducir los niveles de ceramida a través del bloqueo de la esfingomielinasa. Además, observamos una disminución en la expresión de caspasa-3 clivada que es congruente con estos datos.

Existen numerosos estudios que muestran el impacto de la quimioterapia sobre el sistema vascular en el ovario. En 1986, Doll y col. reportaron, mediante análisis histológicos, los efectos de los tratamientos citotóxicos dados indirectamente a través del daño estromal ocasionado [377]. Otro estudio ha mostrado que luego de la administración *in vivo* de doxorrubicina, se produce una disminución significativa del volumen de sangre en ovario y un estrechamiento de los vasos sanguíneos [378]. En nuestro trabajo, las marcaciones de vWF, lectina y  $\alpha$ -SMA en vasos sanguíneos permitieron observar que el tratamiento con CTX provoca injuria endotelial y altera la estabilidad vascular del ovario, mientras que la presencia de C1P protege de este daño. Estos resultados concuerdan con observaciones de otros investigadores, que determinaron que la quimioterapia puede causar fibrosis estromal y presencia de vasos inmaduros y desorganizados en la corteza ovárica [300,379]. Cabe resaltar que C1P puede ser liberado ante un daño tisular y así regular la migración de células progenitoras estromales y endoteliales y promover la angiogénesis [380]. Los resultados obtenidos en esta tesis, junto con los antecedentes mencionados, sugieren

que C1P podría ser un excelente candidato para mejorar la función ovárica durante la quimioterapia.

Plowchalk y col. han demostrado que CTX provoca un severo daño en el útero en respuesta a la toxicidad causada sobre el ovario [287]. Teniendo en consideración que para lograr un embarazo exitoso, se requiere de condiciones uterinas óptimas, se decidió evaluar el efecto protector de C1P sobre la morfología uterina en el modelo de FOP. Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con CTX afectó de manera crítica a los compartimentos epiteliales y estromales, y que además disminuyó la presencia de ramificaciones glandulares. Por otra parte, C1P protegió los tejidos endometriales de estos efectos, impidiendo la pérdida de calidad endometrial. Plowchalk y col. han observado también que los animales tratados con CTX presentaban un peso uterino reducido por alteraciones en la sensibilidad a los esteroides sexuales. Los resultados obtenidos en esta tesis, unidos a este antecedente, nos permiten inferir que C1P podría actuar como agente protector en el útero por impedir modificaciones en los receptores hormonales y/o por proteger a las células endometriales de la toxicidad.

Por otra parte, observamos en el modelo de FOP que la administración de C1P prolongó el período fértil luego del tratamiento con CTX, ya que previno la disminución en el índice de fertilidad y en el tamaño de la camada, atenuando los efectos observados en el grupo CTX, especialmente a tiempos más largos. Este resultado fue consistente con la preservación de la reserva de folículos primordiales observada en nuestro estudio. En base a esta información, puede inferirse que C1P podría actuar como un protector ovárico y producir un retraso o un bloqueo de la aparición de FOP en pacientes que se someten a quimioterapia.

En cuanto a los estudios de fertilización *in vitro*, no hubo diferencias entre los grupos experimentales, a excepción de un aumento en la proporción de ovocitos anormales en los animales tratados con CTX. Estas anomalías fueron prevenidas por el

co-tratamiento con C1P. Es interesante destacar que los ovocitos normales de todos los grupos fueron fertilizados y se desarrollaron hasta llegar al estadio de blastocitos de forma similar. Esto sugiere que aquellas pacientes bajo los efectos gonadotóxicos de CTX podrían recuperar su fertilidad luego del tratamiento si se logra proteger la reserva ovárica con la administración del esfingolípido.

Para descartar interacciones entre las terapias anti-tumorales y la actividad del esfingolípido C1P, es necesario que se lleven a cabo más estudios, tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos animales. En este trabajo, con el objetivo de investigar el efecto local de C1P en el ovario, su administración fue por vía intrabursa. Actualmente, estos resultados son preclínicos y el uso de esfingolípido representa un gran desafío en cuanto su aplicación específica en el ovario. Por lo tanto, una opción posible sería utilizar análogos de C1P fotosensibles, como los sintetizados por el grupo del Dr. Bittman [381,382]. Estos análogos, denominados “caged C1P analogues”, son solubles en soluciones acuosas, pueden atravesar las membranas celulares de manera no invasiva y son biológicamente inactivos hasta su liberación mediante irradiación con luz dentro del citosol, permitiendo una acción específica intracelular. El proceso fotolítico que activa al análogo puede realizarse con luz del espectro visible (mayor a 360 nm) por lo que no genera ninguna perturbación celular. En el futuro, este tipo de estrategias novedosas podría resultar de gran utilidad para la administración de esfingolípidos en forma localizada.

Hace varias décadas se conocen los importantes efectos inmunosupresores e inmunomoduladores de CTX [383,384], y por esa misma razón se lo utiliza no sólo como terapia anti-tumoral sino también para combatir enfermedades autoinmunes [279]. Está establecido que el tratamiento con CTX genera rápidamente una disminución en la respuesta inmune innata y leucopenia en sangre [301,302], pero los niveles de leucocitos son recuperados prontamente al finalizar la exposición a este quimioterapéutico. Sin embargo, CTX también afecta a otras células inmunes con



menor capacidad proliferativa, como a los macrófagos. Por ejemplo, en un modelo de inmunosupresión por CTX, se encontró que la deficiencia de macrófagos alveolares y peritoneales luego del tratamiento es mucho más persistente que la leucopenia [385]. En base a estos antecedentes, hemos estudiado el efecto protector *in vitro* de C1P en macrófagos frente a la acción de un metabolito activo de la ciclofosfamida, la perfosfamida. En particular, en el sistema reproductivo femenino, los macrófagos son las células inmunes más frecuentes en el ovario y su actividad es indispensable para la correcta funcionalidad del mismo [308]. Esto se debe a que los macrófagos cumplen funciones críticas en los procesos de foliculogénesis, atresia y angiogénesis cíclica en el ovario. En base a estos antecedentes, se evaluó el efecto protector de C1P sobre este tipo celular. De acuerdo con lo esperado, los macrófagos se vieron afectados severamente en presencia de perfosfamida, disminuyendo su viabilidad y su producción de citoquinas y aumentando su muerte celular. No obstante, C1P logró mejorar la morfología y la viabilidad celular, incrementar la producción de MCP-1, e inhibir la apoptosis temprana en este tipo celular. Estos resultados sugieren que el efecto citoprotector de C1P frente al daño severo causado por la quimioterapia abarca no sólo a las células ováricas, sino también a las células accesorias que contribuyen a mantener su función. En particular, se ha visto en un cultivo de folículos murinos *in vitro* que la presencia de macrófagos aumenta la supervivencia de los folículos, en especial de los más pequeños que dependen en mayor medida del microambiente en el que están [386]. Esto nos permite inferir que la protección de los macrófagos ováricos por parte de C1P podría ser un mecanismo indirecto por el cual previene la depleción de la reserva folicular ocasionada por CTX y preserva la función ovárica.

En resumen, la administración local de C1P reduce drásticamente el daño inducido por CTX en el ovario, a través de la protección de la reserva folicular, el restablecimiento de los niveles hormonales, la disminución de la apoptosis y la mejora de las redes vasculares. Además, C1P previene el deterioro de la morfología uterina y la

disminución de la fertilidad y la calidad ovocitaria, así como también protege a los macrófagos de los efectos citotóxicos de este quimioterapéutico.

Aunque aún es necesario corroborar la efectividad de C1P en humanos, el desarrollo de agonistas de C1P en el futuro y, como consecuencia, su posible administración, antes o durante el tratamiento con CTX, podría ser una estrategia prometedora e innovadora para resguardar la fertilidad femenina en pacientes cuya función reproductiva está en riesgo.

## **CONCLUSIONES GENERALES**

Las alteraciones en la función ovárica pueden llevar a numerosos desórdenes como la anovulación e infertilidad, la poliquistosis ovárica (PCOS), el *síndrome de hiperestimulación ovárica (OHSS)* y la *falla ovárica prematura (FOP)* entre otros [157,180,185] .

En el ovario, la dinámica folicular y luteal está modulada por diferentes mecanismos de regulación: endócrino, intraovárico, nervioso y angiogénico. Si algunos de estos mecanismos son afectados por causas endógenas o exógenas, se produce una disfunción ovárica, ocasionando los desórdenes mencionados anteriormente.

**En esta tesis**, se evaluaron los mecanismos celulares y moleculares de dos desórdenes ováricos: OHSS y FOP inducida por quimioterapia a través de ensayos *in vitro* (cultivos primarios y líneas celulares) y ensayos *in vivo* (modelos experimentales desarrollados en roedor). Estas patologías comparten la característica de ser de origen iatrogénico, es decir, son causadas por tratamientos médicos. Estos tratamientos provocan alteraciones severas en la dinámica folicular y luteal, y en la vasculatura ovárica, llevando a la aparición de estos desórdenes.

Además, nos propusimos desarrollar distintas estrategias terapéuticas para los desórdenes mencionados, dado que uno de los objetivos de nuestro laboratorio es llevar los resultados obtenidos al ámbito clínico y, por ende, adentrarnos en el campo de la medicina traslacional.

**Las conclusiones de este trabajo fueron las siguientes:**

### **CAPÍTULO I:**

#### **Modelo de OHSS desarrollado en roedor:**

- ❖ La administración local de PDGF-B disminuye el porcentaje de quistes y la concentración de P<sub>4</sub>, recluta células peri-endoteliales hacia el endotelio e induce

estabilidad en la vasculatura del ovario, disminuyendo la permeabilidad, y por consiguiente, mejorando la función ovárica en la fisiopatología del OHSS. Por la tanto, la administración de este factor de crecimiento representa una posible estrategia terapéutica para prevenir la aparición de OHSS en pacientes que se someten a técnicas de fertilización asistida.

**FF provenientes de pacientes con alto riesgo a desarrollar OHSS y pacientes controles:**

- ❖ El perfil lipoproteico de los FF de pacientes OHSS se encuentra alterado y se caracteriza por tener partículas de mayor tamaño (HDL), con altas carga de colesterol y menor cantidad de S1P, y reducida cantidad de apolipoproteína A-I (ApoAI). Además, se encuentra aumentado el receptor de HDL-colesterol, SR-BI, en células de granulosa luteínicas humanas provenientes de FF de OHSS.
- ❖ El agregado de S1P a los FF de pacientes con alto riesgo a OHSS en un cultivo VSMCs regula positivamente la expresión de su propio receptor S1P1 y la estabilidad en las uniones intercelulares mediante el incremento de N-cadherina.

*Es importante remarcar que los resultados descritos en relación con el reclutamiento de células peri-endoteliales y la regulación de proteínas tanto de uniones estrechas como de uniones adherentes, pueden proporcionar nuevos conocimientos no solo para OHSS, sino también para otras patologías donde hay una falla severa en el reclutamiento de células peri-endoteliales hacia los vasos sanguíneos (por ejemplo, la retinopatía diabética y el cáncer).*

**A continuación, se muestra un esquema que resume los resultados descritos en este capítulo de la Tesis (Fig. 9).**

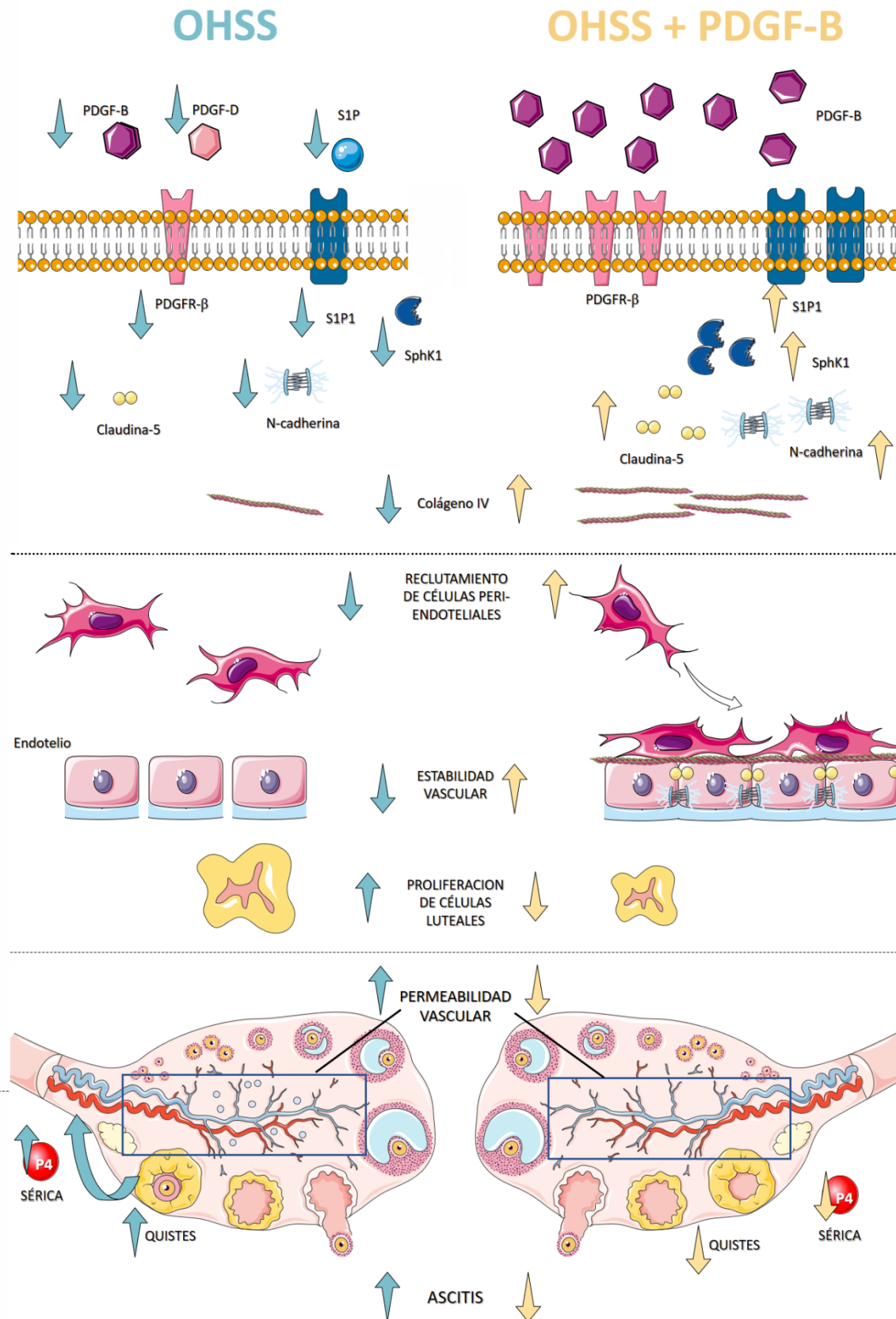


Figura 9: Esquema que muestra un resumen de los posibles mecanismos de acción de PDGF-B y sus efectos en el modelo de OHSS, a nivel molecular (arriba), celular (medio) y de la función ovárica (abajo).

## **CAPÍTULO II:**

### **Modelo de FOP inducido por quimioterapia desarrollado en roedor:**

- ❖ La administración local de C1P en presencia de ciclofosfamida, por una parte, disminuyó la atresia folicular, la activación acelerada de los folículos primordiales, los niveles de FSH y, por otra parte, aumentó los niveles de AMH y E<sub>2</sub>. Además, el tratamiento con C1P preservó la vasculatura ovárica y la morfología uterina de la injuria causada por ciclofosfamida.
- ❖ La administración local de C1P en presencia de ciclofosfamida disminuyó el número de ovocitos anormales e incrementó el índice de fertilidad en las hembras a las 12 semanas post-tratamiento.

### **Modelo *in vitro* de daño por quimioterapia en una línea celular de macrófagos:**

- ❖ El agregado de C1P en presencia del metabolito activo de ciclofosfamida aumenta la viabilidad celular y la secreción de MCP-1, mientras que disminuye la apoptosis en macrófagos.

**A continuación, se muestra un esquema que resume los resultados descriptos en este capítulo de la Tesis (Fig. 10).**

*Por último, la mayor accesibilidad a técnicas de reproducción asistida por la ley Nacional N° 26.862) que brinda acceso a los procedimientos y técnicas médico-asistenciales de reproducción asistida y el aumento en la tasa de supervivencia de las pacientes con cáncer en edad reproductiva, son hechos sumamente alentadores, pero que sin duda aumentarán la incidencia de las patologías estudiadas en esta tesis. Por eso, resulta imprescindible el desarrollo de nuevas estrategias que sean efectivas para proteger el ovario, preservar su fertilidad y mejorar su calidad de vida.*

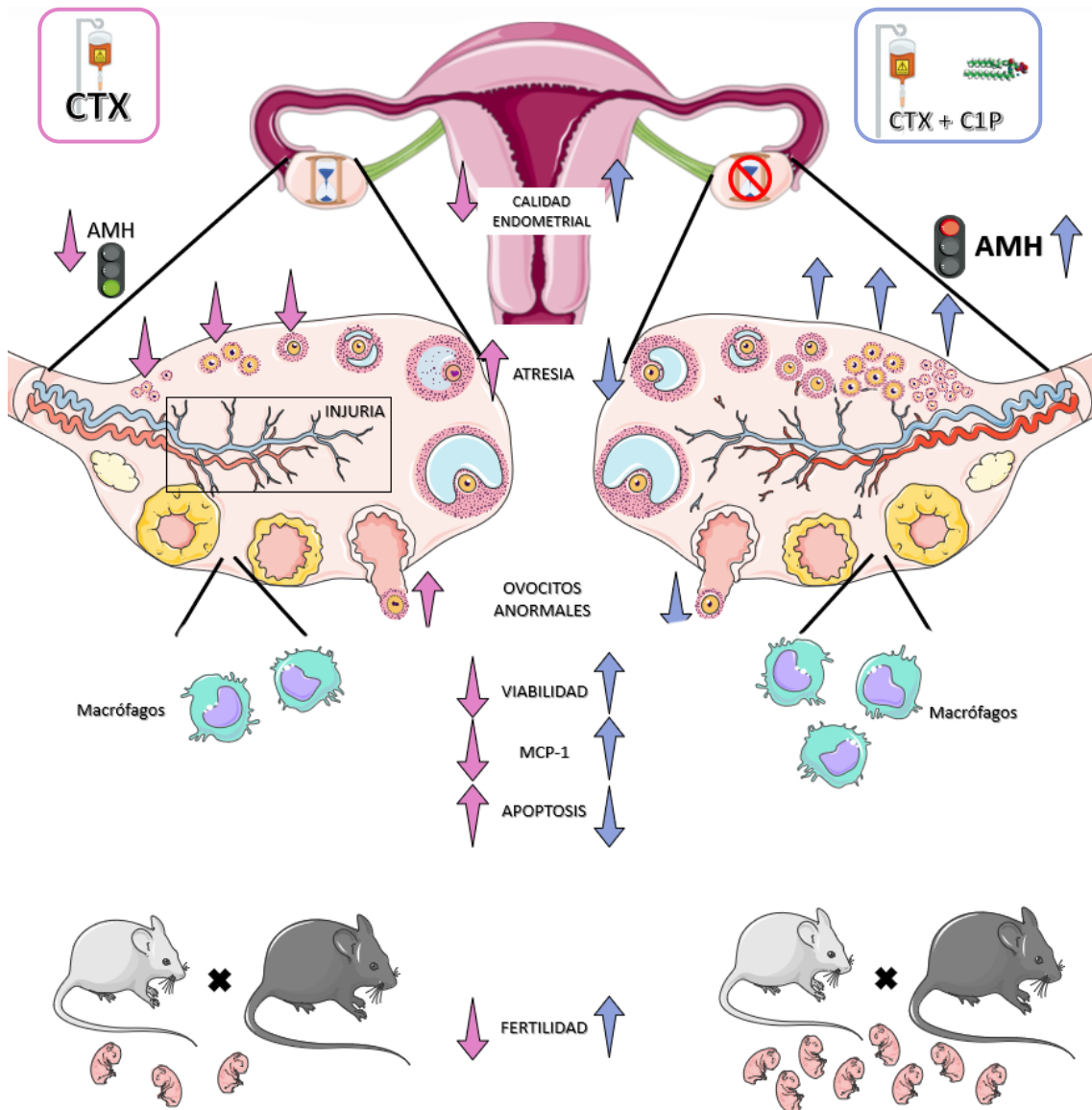


Figura 10: Esquema que resume las características de FOP y los efectos de C1P en el contexto de esta patología, a partir de los distintos modelos *in vivo* e *in vitro* utilizados en esta tesis.

---

**REFERENCIAS**

- [1] **Thibault C, Levasseur M-C, Hunter RHF (1993)**. Reproduction in Mammals and Man, English revised edition ed.
- [2] **McGee EA, Hsueh AJ (2000)**. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr.Rev.* 21, 200-214.
- [3] **Maekawa A (1990)**. Pathology of tumours in laboratory animals. Tumours of the rat. Tumours of the ovary. IARC Sci.Publ.473-497.
- [4] **W. B, W.D. F (1997)**. Tratado de Histología, 11<sup>aba</sup> ed., Mc. Graw Hill - Interamericana, Madrid.
- [5] **Johnson J y col. (2004)**. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 428, 145-150.
- [6] **Johnson J y col. (2005)**. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell* 122, 303-315.
- [7] **Jamngjit M, Hammes SR (2005)**. Oocyte maturation: the coming of age of a germ cell. *Semin.Reprod.Med.* 23, 234-241.
- [8] **Hutt KJ, Albertini DF (2007)**. An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. *Reprod.Biomed.Online.* 14, 758-764.
- [9] **Irving-Rodgers HF, Rodgers RJ (2000)**. Ultrastructure of the basal lamina of bovine ovarian follicles and its relationship to the membrana granulosa. *J.Reprod.Fertil.* 118, 221-228.
- [10] **Peters H y col. (1973)**. The effect of gonadotrophin on follicle growth initiation in the neonatal mouse ovary. *J Reprod.Fertil.* 35, 139-141.
- [11] **Elvin JA, Matzuk MM (1998)**. Mouse models of ovarian failure. *Rev.Reprod.* 3, 183-195.
- [12] **Hirshfield AN (1991)**. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int.Rev.Cytol.* 124, 43-101.
- [13] **Adashi EY y col. (1993)**. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-1 is an antigonadotropin: evidence that optimal follicle-stimulating hormone action in ovarian granulosa cells is contingent upon amplification by endogenously-derived IGFs. *Adv.Exp.Med.Biol.* 343, 377-385.
- [14] **Orisaka M y col. (2006)**. Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. *Mol.Endocrinol.* 20, 2456-2468.
- [15] **E G, RBJ (2004)**. Ovarian Angiogenesis, in: P.C L, E.Y A, (Eds.), *The ovary*, Elsevier Academic Press, San Diego, California. USA, pp. 305-317.
- [16] **Oxberry, A, GS G (1982)**. An autoradiographic study of the binding of 125 I-labeled follicle-stimulating hormone, human chorionic gonadotropin and prolactin to the hamster ovary throughout the estrous cycle. *Biol Repr* 27, 505-516.
- [17] **Amsterdam A y col. (1975)**. Distribution of binding sites for human chorionic gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat. *J.Cell Biol.* 67, 894-900.
- [18] **Eppig JJ (1979)**. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature* 281, 483-484.
- [19] **Dekel N, Galiani D, Sherizly I (1988)**. Dissociation between the inhibitory and the stimulatory action of cAMP on maturation of rat oocytes. *Mol.Cell Endocrinol.* 56, 115-121.
- [20] **Phillips DM, Dekel N (1982)**. Effect of gonadotropins and prostaglandin on cumulus mucification in cultures of intact follicles. *J.Exp.Zool.* 221, 275-282.
- [21] **Kumar TR y col. (1997)**. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat.Genet.* 15, 201-204.
- [22] **Gougeon A, Testart J (1986)**. Germinal vesicle breakdown in oocytes of human atretic follicles during the menstrual cycle. *J.Reprod.Fertil.* 78, 389-401.
- [23] **Zeleznik AJ, Schuler HM, Reichert LE, Jr. (1981)**. Gonadotropin-binding sites in the rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotropin to the preovulatory follicle. *Endocrinology* 109, 356-362.



- [24] **Zeleznik AJ, Midgley AR, Jr., Reichert LE, Jr. (1974).** Granulosa cell maturation in the rat: increased binding of human chorionic gonadotropin following treatment with follicle-stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 95, 818-825.
- [25] **Wang XN, Greenwald GS (1993).** Synergistic effects of steroids with FSH on folliculogenesis, steroidogenesis and FSH- and hCG-receptors in hypophysectomized mice. *J Reprod.Fertil.* 99, 403-413.
- [26] **Vitale AM y col. (2002).** Inhibin a increases apoptosis in early ovarian antral follicles of diethylstilbestrol-treated rats. *Biol.Reprod.* 67, 1989-1995.
- [27] **Foghi A y col. (1998).** Induction of apoptosis in thecal/interstitial cells: action of transforming growth factor (TGF) alpha plus TGF beta on bcl-2 and interleukin-1 beta-converting enzyme. *J.Endocrinol.* 157, 489-494.
- [28] **Tilly JL y col. (1991).** Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology* 129, 2799-2801.
- [29] **Parborell F y col. (2002).** Effects of a gonadotropin-releasing hormone agonist on rat ovarian follicle apoptosis: Regulation by EGF and the expression of Bcl-2-related genes. *Biol.Reprod.* 67, 481-486.
- [30] **Parborell F y col. (2005).** GnRH antagonist Antide inhibits apoptosis of preovulatory follicle cells in rat ovary. *Biol Repr* 72, 659-666.
- [31] **Chun SY, Hsueh AJ (1998).** Paracrine mechanisms of ovarian follicle apoptosis. *J Reprod.Immunol.* 39, 63-75.
- [32] **Tapanainen JS y col. (1993).** Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol.Endocrinol.* 7, 643-650.
- [33] **Billig H, Furuta I, Hsueh AJ (1993).** Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 133, 2204-2212.
- [34] **Carson RS y col. (1981).** Estradiol, testosterone, and androstenedione in ovine follicular fluid during growth and atresia of ovarian follicles. *Biol.Reprod.* 24, 105-113.
- [35] **Braw RH, Tsafri A (1980).** Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary. *J.Reprod.Fertil.* 59, 267-272.
- [36] **Chun SY y col. (1994).** Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 135, 1845-1853.
- [37] **Durlinger AL y col. (2000).** Apoptotic and proliferative changes during induced atresia of pre- ovulatory follicles in the rat. *Hum.Reprod.* 15, 2504-2511.
- [38] **Kenney RM y col. (1979).** Morphological and biochemical correlates of equine ovarian follicles as a function of their state of viability or atresia. *J.Reprod.Fertil.Suppl*163-171.
- [39] **Osman P (1985).** Rate and course of atresia during follicular development in the adult cyclic rat. *J.Reprod.Fertil.* 73, 261-270.
- [40] **Byskov AG (1974).** Cell kinetic studies of follicular atresia in the mouse ovary. *J.Reprod.Fertil.* 37, 277-285.
- [41] **Wang W y col. (2010).** Morphologic observation and classification criteria of atretic follicles in guinea pigs. *J.Zhejiang.Univ Sci.B* 11, 307-314.
- [42] **Pedersen HG, Watson ED, Telfer EE (2003).** Analysis of atresia in equine follicles using histology, fresh granulosa cell morphology and detection of DNA fragmentation. *Reproduction* 125, 417-423.
- [43] **Knobil E, Neill JD (2005).** *Physiology of Reproduction*, 3 Rev Ed edition ed.
- [44] **Caron MG y col. (1975).** Protein kinase stimulation of a reconstituted cholesterol side chain cleavage enzyme system in the bovine corpus luteum. *J Biol Chem* 250, 5137-5143.
- [45] **Hazzard TM, Xu F, Stouffer RL (2002).** Injection of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 into the preovulatory follicle disrupts ovulation and subsequent luteal function in rhesus monkeys. *Biol Reprod.* 67, 1305-1312.

- [46] **Peluffo MC y col. (2006)**. Expression of caspase-2, -3, -8 and -9 proteins and enzyme activity in the corpus luteum of the rat at different stages during the natural estrous cycle. *Reproduction* 132, 465-475.
- [47] **Stocco C, Telleria C, Gibori G (2007)**. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr.Rev.* 28, 117-149.
- [48] **Devoto L y col.** The human corpus luteum: life cycle and function in natural cycles. *Fertility and sterility* 92, 1067-1079.
- [49] **Thornberry NA, Lazebnik Y (1998)**. Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.
- [50] **Ashkenazi A (2002)**. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat.Rev.Cancer* 2, 420-430.
- [51] **Cory S, Huang DC, Adams JM (2003)**. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22, 8590-8607.
- [52] **Lavrik IN, Golks A, Krammer PH (2005)**. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J.Clin.Invest* 115, 2665-2672.
- [53] **Coucovanis EC y col. (1993)**. Evidence that the mechanism of prenatal germ cell death in the mouse is apoptosis. *Exp.Cell Res.* 209, 238-247.
- [54] **Pesce M, De Felici M (1994)**. Apoptosis in mouse primordial germ cells: a study by transmission and scanning electron microscope. *Anat.Embryol.(Berl)* 189, 435-440.
- [55] **Dauffenbach LM, Khan SM, Yeh J (2003)**. Corpus luteum regression in the rat--in vivo and in vitro studies of apoptotic mechanisms. *J.Med.* 34, 87-100.
- [56] **Rolaki A y col. (2005)**. Novel trends in follicular development, atresia and corpus luteum regression: a role for apoptosis. *Reprod.Biomed.Online.* 11, 93-103.
- [57] **Zeleznik AJ, Ihrig LL, Bassett SG (1989)**. Developmental expression of Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>-dependent endonuclease activity in rat granulosa and luteal cells. *Endocrinology* 125, 2218-2220.
- [58] **Matsuda F y col. (2012)**. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *J.Reprod.Dev.* 58, 44-50.
- [59] **Risau W, Flamme I (1995)**. Vasculogenesis. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 11, 73-91.
- [60] **Risau W (1997)**. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671-674.
- [61] **Yancopoulos GD y col. (2000)**. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407, 242-248.
- [62] **Gerhardt H, Betsholtz C (2003)**. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res.* 314, 15-23.
- [63] **Hanahan D, Weinberg RA (2000)**. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- [64] **Klagsbrun M, D'Amore PA (1996)**. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 7, 259-270.
- [65] **Folkman J, Klagsbrun M (1987)**. Angiogenic factors. *Science* 235, 442-447.
- [66] **Stouffer RL y col. (2001)**. Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Arch.Med.Res.* 32, 567-575.
- [67] **Reynolds LP y col. (1994)**. Mitogenic factors of corpora lutea. *Prog.Growth Factor Res.* 5, 159-175.
- [68] **Redmer DA y col. (2001)**. Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum. *Biol Reprod.* 65, 879-889.
- [69] **Allt G, Lawrenson JG (2001)**. Pericytes: cell biology and pathology. *Cells, tissues, organs* 169, 1-11.
- [70] **Sato A, Miyoshi S (1990)**. Morphometric study of the microvasculature of the main excretory duct subepithelia of the rat parotid, submandibular and sublingual salivary glands. *Anat.Rec.* 226, 288-294.
- [71] **Winkler EA, Bell RD, Zlokovic BV (2011)**. Central nervous system pericytes in health and disease. *Nature neuroscience* 14, 1398-1405.

- 
- [72] **Armulik A, Genove G, Betsholtz C (2011)**. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev.Cell* 21, 193-215.
- [73] **Leveen P y col. (1994)**. Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev.* 8, 1875-1887.
- [74] **Fruttiger M y col. (1999)**. Defective oligodendrocyte development and severe hypomyelination in PDGF-A knockout mice. *Development* 126, 457-467.
- [75] **Gnessi L y col. (2000)**. Leydig cell loss and spermatogenic arrest in platelet-derived growth factor (PDGF)-A-deficient mice. *J.Cell Biol.* 149, 1019-1026.
- [76] **Antoniades HN, Stathakos D, Scher CD (1975)**. Isolation of a cationic polypeptide from human serum that stimulates proliferation of 3T3 cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 72, 2635-2639.
- [77] **Raines EW, Ross R (1993)**. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br.Heart J.* 69, S30-S37.
- [78] **Heldin CH, Eriksson U, Ostman A (2002)**. New members of the platelet-derived growth factor family of mitogens. *Arch.Biochem.Biophys.* 398, 284-290.
- [79] **Hamada T, Ui-Tei K, Miyata Y (2000)**. A novel gene derived from developing spinal cords, SCDGF, is a unique member of the PDGF/VEGF family. *FEBS Lett.* 475, 97-102.
- [80] **Bergsten E y col. (2001)**. PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor. *Nat.Cell Biol.* 3, 512-516.
- [81] **LaRochelle WJ y col. (2001)**. PDGF-D, a new protease-activated growth factor. *Nat.Cell Biol.* 3, 517-521.
- [82] **Ostman A y col. (1992)**. PDGF-AA and PDGF-BB biosynthesis: proprotein processing in the Golgi complex and lysosomal degradation of PDGF-BB retained intracellularly. *J.Cell Biol.* 118, 509-519.
- [83] **Siegfried G y col. (2005)**. Regulation of the stepwise proteolytic cleavage and secretion of PDGF-B by the proprotein convertases. *Oncogene* 24, 6925-6935.
- [84] **Yarden Y y col. (1986)**. Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors. *Nature* 323, 226-232.
- [85] **Matsui T y col. (1989)**. Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF receptor genes. *Science* 243, 800-804.
- [86] **Heldin CH, Ostman A, Ronnstrand L (1998)**. Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim.Biophys.Acta* 1378, F79-113.
- [87] **Rönnstrand L, Heldin C-H (2001)**. Mechanisms of platelet-derived growth factor-induced chemotaxis. *International Journal of Cancer* 91, 757-762.
- [88] **Inui H y col. (1994)**. Differences in signal transduction between platelet-derived growth factor (PDGF) alpha and beta receptors in vascular smooth muscle cells. PDGF-BB is a potent mitogen, but PDGF-AA promotes only protein synthesis without activation of DNA synthesis. *J.Biol.Chem.* 269, 30546-30552.
- [89] **Siegbahn A y col. (1990)**. Differential effects of the various isoforms of platelet-derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts, monocytes, and granulocytes. *J.Clin.Invest* 85, 916-920.
- [90] **Giacobini MM y col. (1993)**. Differential effects of platelet-derived growth factor isoforms on dopamine neurons in vivo: -BB supports cell survival, -AA enhances fiber formation. *Neuroscience* 57, 923-929.
- [91] **Heldin CH, Westermark B (1999)**. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev.* 79, 1283-1316.
- [92] **Lubinus M y col. (1994)**. Independent effects of platelet-derived growth factor isoforms on mitogen-activated protein kinase activation and mitogenesis in human dermal fibroblasts. *J.Biol.Chem.* 269, 9822-9825.

- [93] **Bornfeldt KE y col. (1994)**. Insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor-BB induce directed migration of human arterial smooth muscle cells via signaling pathways that are distinct from those of proliferation. *J.Clin.Invest* 93, 1266-1274.
- [94] **Guerne PA, Sublet A, Lotz M (1994)**. Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes: distinct profiles in primary chondrocytes, subcultured chondrocytes, and fibroblasts. *J.Cell Physiol* 158, 476-484.
- [95] **Tzeng DY y col. (1985)**. Platelet-derived growth factor promotes human peripheral monocyte activation. *Blood* 66, 179-183.
- [96] **Wiedmeier SE y col. (1994)**. Age- and microenvironment-associated influences by platelet-derived growth factor on T cell function. *J.Immunol.* 152, 3417-3426.
- [97] **Milenkovic I y col. (2003)**. P2Y receptor-mediated stimulation of Muller glial cell DNA synthesis: dependence on EGF and PDGF receptor transactivation. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 44, 1211-1220.
- [98] **Satoh T y col. (1993)**. Platelet-derived growth factor receptor mediates activation of ras through different signaling pathways in different cell types. *Molecular and cellular biology* 13, 3706-3713.
- [99] **Ekman S y col. (1999)**. Increased mitogenicity of an alphabeta heterodimeric PDGF receptor complex correlates with lack of RasGAP binding. *Oncogene* 18, 2481-2488.
- [100] **Rupp E y col. (1994)**. A unique autophosphorylation site in the platelet-derived growth factor alpha receptor from a heterodimeric receptor complex. *European journal of biochemistry* 225, 29-41.
- [101] **DeMali KA, Balciunaite E, Kazlauskas A (1999)**. Integrins enhance platelet-derived growth factor (PDGF)-dependent responses by altering the signal relay enzymes that are recruited to the PDGF beta receptor. *J Biol Chem* 274, 19551-19558.
- [102] **Sundaresan M y col. (1995)**. Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 270, 296-299.
- [103] **Jones SM, Kazlauskas A (2001)**. Growth-factor-dependent mitogenesis requires two distinct phases of signalling. *Nature cell biology* 3, 165-172.
- [104] **Hoch RV, Soriano P (2003)**. Roles of PDGF in animal development. *Development* 130, 4769-4784.
- [105] **Maisonpierre PC y col. (1997)**. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277, 55-60.
- [106] **Song S y col. (2005)**. PDGFRbeta+ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival. *Nat.Cell Biol.* 7, 870-879.
- [107] **Hellstrom M y col. (1999)**. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* 126, 3047-3055.
- [108] **Soriano P (1994)**. Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev.* 8, 1888-1896.
- [109] **Lindahl P y col. (1997)**. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* 277, 242-245.
- [110] **Sanchez T, Hla T (2004)**. Structural and functional characteristics of S1P receptors. *J.Cell Biochem.* 92, 913-922.
- [111] **Allende ML, Proia RL (2002)**. Sphingosine-1-phosphate receptors and the development of the vascular system. *Biochim.Biophys.Acta* 1582, 222-227.
- [112] **Yatomi Y (2008)**. Plasma sphingosine 1-phosphate metabolism and analysis. *Biochim.Biophys.Acta* 1780, 606-611.
- [113] **Hannun YA, Obeid LM (2008)**. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 9, 139-150.

- [114] **Inoki I y col. (2006)**. Negative regulation of endothelial morphogenesis and angiogenesis by S1P2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 346, 293-300.
- [115] **Ryu Y y col. (2002)**. Sphingosine-1-phosphate, a platelet-derived lysophospholipid mediator, negatively regulates cellular Rac activity and cell migration in vascular smooth muscle cells. *Circulation research* 90, 325-332.
- [116] **Lee MJ y col. (1999)**. Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* 99, 301-312.
- [117] **Kimura T y col. (2000)**. Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, Edg-1 and Edg-3. *Biochem.J.* 348 Pt 1, 71-76.
- [118] **Marsolais D, Rosen H (2009)**. Chemical modulators of sphingosine-1-phosphate receptors as barrier-oriented therapeutic molecules. *Nature reviews. Drug discovery* 8, 297-307.
- [119] **Takuwa Y y col. (2010)**. Roles of sphingosine-1-phosphate signaling in angiogenesis. *World J.Biol Chem.* 1, 298-306.
- [120] **Liu Y y col. (2000)**. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *Journal of Clinical Investigation* 106, 951-961.
- [121] **Paik JH y col. (2004)**. Sphingosine 1-phosphate receptor regulation of N-cadherin mediates vascular stabilization. *Genes Dev.* 18, 2392-2403.
- [122] **Fraser HM (2006)**. Regulation of the ovarian follicular vasculature. *Reprod.Biol Endocrinol.* 4, 18.
- [123] **Geva E, Jaffe RB (2000)**. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. *Fertil.Steril.* 74, 429-438.
- [124] **Tamanini C, De Ambrogi M (2004)**. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod.Domest.Anim* 39, 206-216.
- [125] **Azhar S y col. (1998)**. Human granulosa cells use high density lipoprotein cholesterol for steroidogenesis. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 83, 983-991.
- [126] **Lafond J y col. (1999)**. Presence of CLA-1 and HDL binding sites on syncytiotrophoblast brush border and basal plasma membranes of human placenta. *Placenta* 20, 583-590.
- [127] **Farese RV, Jr., Herz J (1998)**. Cholesterol metabolism and embryogenesis. *Trends in genetics* : TIG 14, 115-120.
- [128] **Evans HM, Bishop KS (1922)**. On the Existence of a Hitherto Unrecognized Dietary Factor Essential for Reproduction. *Science* 56, 650-651.
- [129] **Le Goff D (1994)**. Follicular fluid lipoproteins in the mare: evaluation of HDL transfer from plasma to follicular fluid. *Biochim Biophys Acta* 1210, 226-232.
- [130] **Shalgi R y col. (1973)**. Proteins of human follicular fluid: the blood-follicle barrier. *Fertility and sterility* 24, 429-434.
- [131] **Rothblat GH y col. (1999)**. Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *Journal of lipid research* 40, 781-796.
- [132] **Schmitz G, Kaminski WE, Orso E (2000)**. ABC transporters in cellular lipid trafficking. *Current opinion in lipidology* 11, 493-501.
- [133] **Wu Z y col. (2007)**. The refined structure of nascent HDL reveals a key functional domain for particle maturation and dysfunction. *Nature structural & molecular biology* 14, 861-868.
- [134] **von Otte S y col. (2006)**. Follicular fluid high density lipoprotein-associated sphingosine 1-phosphate is a novel mediator of ovarian angiogenesis. *J.Biol.Chem.* 281, 5398-5405.
- [135] **Jaspard B y col. (1997)**. Structural and functional comparison of HDL from homologous human plasma and follicular fluid. A model for extravascular fluid. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 17, 1605-1613.
- [136] **Simpson ER y col. (1980)**. Plasma lipoproteins in follicular fluid of human ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 51, 1469-1471.

- [137] **Ansell BJ y col. (2003)**. Inflammatory/antiinflammatory properties of high-density lipoprotein distinguish patients from control subjects better than high-density lipoprotein cholesterol levels and are favorably affected by simvastatin treatment. *Circulation* 108, 2751-2756.
- [138] **Negre-Salvayre A y col. (2006)**. Antioxidant and cytoprotective properties of high-density lipoproteins in vascular cells. *Free radical biology & medicine* 41, 1031-1040.
- [139] **Therien I, Bousquet D, Manjunath P (2001)**. Effect of seminal phospholipid-binding proteins and follicular fluid on bovine sperm capacitation. *Biol Reprod* 65, 41-51.
- [140] **Mizutani T y col. (1997)**. Cloning, characterization, and cellular distribution of rat scavenger receptor class B type I (SRBI) in the ovary. *Biochem Biophys Res Commun* 234, 499-505.
- [141] **Johnson MS y col. (1998)**. Characterization and chromosomal localization of rat scavenger receptor class B type I, a high density lipoprotein receptor with a putative leucine zipper domain and peroxisomal targeting sequence. *Endocrinology* 139, 72-80.
- [142] **Marsche G y col. (2001)**. Identification of the human analog of SR-BI and LOX-1 as receptors for hypochlorite-modified high density lipoprotein on human umbilical venous endothelial cells. *FASEB J* 15, 1095-1097.
- [143] **Yuhanna IS y col. (2001)**. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nature medicine* 7, 853-857.
- [144] **Yeh YC y col. (2002)**. Identification and expression of scavenger receptor SR-BI in endothelial cells and smooth muscle cells of rat aorta in vitro and in vivo. *Atherosclerosis* 161, 95-103.
- [145] **Chinetti G y col. (2000)**. CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation* 101, 2411-2417.
- [146] **Acton S y col. (1996)**. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271, 518-520.
- [147] **Landschulz KT y col. (1996)**. Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *The Journal of clinical investigation* 98, 984-995.
- [148] **Rigotti A y col. (1996)**. Regulation by adrenocorticotrophic hormone of the in vivo expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI), a high density lipoprotein receptor, in steroidogenic cells of the murine adrenal gland. *J Biol Chem* 271, 33545-33549.
- [149] **Miettinen HE, Rayburn H, Krieger M (2001)**. Abnormal lipoprotein metabolism and reversible female infertility in HDL receptor (SR-BI)-deficient mice. *The Journal of clinical investigation* 108, 1717-1722.
- [150] **Santander NG y col. (2013)**. Developmental abnormalities in mouse embryos lacking the HDL receptor SR-BI. *Human molecular genetics* 22, 1086-1096.
- [151] **Delvigne A, Rozenberg S (2002)**. Epidemiology and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): a review. *Hum.Reprod Update.* 8, 559-577.
- [152] **Aboulghar MA, Mansour RT (2003)**. Ovarian hyperstimulation syndrome: classifications and critical analysis of preventive measures. *Hum.Reprod.Update.* 9, 275-289.
- [153] **Delvigne A, Rozenberg S (2003)**. Review of clinical course and treatment of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). *Hum.Reprod.Update.* 9, 77-96.
- [154] **Ozden S y col. (2005)**. Ovarian hyperstimulation associated with a spontaneous pregnancy. *J.Obstet.Gynaecol.* 25, 394-395.
- [155] **Bergh PA, Navot D (1992)**. Ovarian hyperstimulation syndrome: a review of pathophysiology. *J.Assist.Reprod.Genet.* 9, 429-438.
- [156] **Yamamoto S y col. (1997)**. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in epithelial ovarian neoplasms: correlation with clinicopathology and patient survival, and analysis of serum VEGF levels. *Br.J.Cancer* 76, 1221-1227.

- [157] **Pellicer A y col. (1999)**. The pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome: in vivo studies investigating the role of interleukin-1beta, interleukin-6, and vascular endothelial growth factor. *Fertil.Steril.* 71, 482-489.
- [158] **Wang TH y col. (2002)**. Human chorionic gonadotropin-induced ovarian hyperstimulation syndrome is associated with up-regulation of vascular endothelial growth factor. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 87, 3300-3308.
- [159] **Abramov Y y col. (1997)**. Vascular endothelial growth factor plasma levels correlate to the clinical picture in severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil.Steril.* 67, 261-265.
- [160] **Artini PG y col. (1998)**. Correlation between the amount of follicle-stimulating hormone administered and plasma and follicular fluid vascular endothelial growth factor concentrations in women undergoing in vitro fertilization. *Gynecol.Endocrinol.* 12, 243-247.
- [161] **Agrawal R y col. (1999)**. Serum vascular endothelial growth factor concentrations in in vitro fertilization cycles predict the risk of ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil.Steril.* 71, 287-293.
- [162] **Montanelli L y col. (2004)**. A mutation in the follicle-stimulating hormone receptor as a cause of familial spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 89, 1255-1258.
- [163] **Gomez R y col. (2010)**. Physiology and pathology of ovarian hyperstimulation syndrome. *Semin.Reprod.Med.* 28, 448-457.
- [164] **Hanahan D, Folkman J (1996)**. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353-364.
- [165] **Neufeld G y col. (1999)**. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 13, 9-22.
- [166] **Rodewald M y col. (2009)**. Molecular mechanisms of ovarian hyperstimulation syndrome: paracrine reduction of endothelial claudin 5 by hCG in vitro is associated with increased endothelial permeability. *Hum.Reprod.* 24, 1191-1199.
- [167] **Di Pietro M y col. (2017)**. In vivo intrabursal administration of bioactive lipid sphingosine-1-phosphate enhances vascular integrity in a rat model of ovarian hyperstimulation syndrome. *Molecular human reproduction* 23, 417-427.
- [168] **Scotti L y col. (2016)**. Sphingosine-1-phosphate restores endothelial barrier integrity in ovarian hyperstimulation syndrome. *Molecular human reproduction* 22, 852-866.
- [169] **Scotti L y col. (2014)**. Local VEGF inhibition prevents ovarian alterations associated with ovarian hyperstimulation syndrome. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 144 Pt B, 392-401.
- [170] **Scotti L y col. (2013)**. Involvement of the ANGPTs/Tie-2 system in ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). *Mol.Cell Endocrinol.* 365, 223-230.
- [171] **Rizk B y col. (1997)**. The role of vascular endothelial growth factor and interleukins in the pathogenesis of severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum.Reprod.Update.* 3, 255-266.
- [172] **Webber L y col. (2016)**. ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency. *Human reproduction* 31, 926-937.
- [173] **Cox L, Liu JH (2014)**. Primary ovarian insufficiency: an update. *Int.J.Womens Health* 6, 235-243.
- [174] **Rodriguez-Wallberg KA, Oktay K (2014)**. Fertility preservation during cancer treatment: clinical guidelines. *Cancer Manag.Res.* 6, 105-117.
- [175] **Thibaud E (2007)**. [Ovarian function and fertility after treatment for childhood cancer]. *Arch.Pediatr.* 14, 1129-1131.
- [176] **Dursun P, Dogan NU, Ayhan A (2014)**. Oncofertility for gynecologic and non-gynecologic cancers: fertility sparing in young women of reproductive age. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* 92, 258-267.
- [177] **Oktem O, Oktay K (2007)**. Quantitative assessment of the impact of chemotherapy on ovarian follicle reserve and stromal function. *Cancer* 110, 2222-2229.

- [178] **Meirow D y col. (2007)**. Cortical fibrosis and blood-vessels damage in human ovaries exposed to chemotherapy. Potential mechanisms of ovarian injury. *Hum.Reprod.* 22, 1626-1633.
- [179] **Kalich-Philosoph L y col. (2013)**. Cyclophosphamide triggers follicle activation and "burnout"; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility. *Science translational medicine* 5, 185ra162.
- [180] **Morgan S y col. (2012)**. How do chemotherapeutic agents damage the ovary? *Human reproduction update* 18, 525-535.
- [181] **Ayensu-Coker L y col. (2012)**. Fertility preservation in pediatric, adolescent and young adult female cancer patients. *Pediatr.Endocrinol.Rev.* 10, 174-187.
- [182] **Partridge AH (2012)**. Ovarian suppression for prevention of premature menopause and infertility: empty promise or effective therapy? *J.Clin.Oncol.* 30, 479-481.
- [183] **Irusta G y col. (2003)**. Steroidogenic acute regulatory protein in ovarian follicles of gonadotropin-stimulated rats is regulated by a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol.Reprod.* 68, 1577-1583.
- [184] **Golan A y col. (1989)**. Ovarian hyperstimulation syndrome: an update review. *Obstet.Gynecol.Surv.* 44, 430-440.
- [185] **Ferrara N y col. (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, 1881-1893.
- [186] **Levin ER y col. (1998)**. Role of vascular endothelial cell growth factor in Ovarian Hyperstimulation Syndrome. *J.Clin.Invest* 102, 1978-1985.
- [187] **Soares SR y col. (2008)**. Targeting the vascular endothelial growth factor system to prevent ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum.Reprod.Update.* 14, 321-333.
- [188] **Manno M, Tomei F (2008)**. Renin-angiotensin system activation during severe OHSS: cause or effect? *Fertility and sterility* 89, 488.
- [189] **Bachmakova NV y col. (2014)**. The development of ovarian hyperstimulation syndrome in the implementation of assisted reproductive technology in women with a background of endocrine pathology. *Gynecological Endocrinology* 30, 25-29.
- [190] **Scotti L y col. (2011)**. Administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist affects corpus luteum vascular stability and development and induces luteal apoptosis in a rat model of ovarian hyperstimulation syndrome. *Mol.Cell Endocrinol.* 335, 116-125.
- [191] **De Zúñiga I y col., Role of Vascular Endothelial Cell Growth Factor (VEGF) and Angiopoietins (ANGPTs) in Ovarian Hyperstimulation Syndrome (OHSS).** 2011.
- [192] **Scotti L y col. (2011)**. *Efecto de la inhibición del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y posible participación del sistema de ANGPTS/TIE-2 en el Síndrome de Hiperestimulación Ovárica (OHSS).* XXI Reunión Anual Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo.
- [193] **Molskness TA y col. (2006)**. Circulating levels of total angiopoietin-2 and the soluble Tie-2 receptor in women during ovarian stimulation and early gestation. *Fertil.Steril.* 86, 1531-1533.
- [194] **Zaidi J y col. (1995)**. Ovarian stromal blood flow in women with polycystic ovaries--a possible new marker for diagnosis? *Hum.Reprod.* 10, 1992-1996.
- [195] **Agrawal R y col. (1998)**. Serum vascular endothelial growth factor concentrations and ovarian stromal blood flow are increased in women with polycystic ovaries. *Hum.Reprod.* 13, 651-655.
- [196] **Zech J y col. (2017)**. Elective frozen-thawed embryo transfer (FET) in women at risk for ovarian hyperstimulation syndrome. *Reproductive biology.*
- [197] **Ferraretti AP y col. (1999)**. Elective cryopreservation of all pronucleate embryos in women at risk of ovarian hyperstimulation syndrome: efficiency and safety. *Human reproduction* 14, 1457-1460.



- [198] **Wang YQ y col. (2015)**. Can steroidal ovarian suppression during the luteal phase after oocyte retrieval reduce the risk of severe OHSS? *Journal of ovarian research* 8, 63.
- [199] **Mochtar MH y col. (2017)**. Recombinant luteinizing hormone (rLH) and recombinant follicle stimulating hormone (rFSH) for ovarian stimulation in IVF/ICSI cycles. *The Cochrane database of systematic reviews* 5, CD005070.
- [200] **Al-Shawaf T, Grudzinskas JG (2003)**. Prevention and treatment of ovarian hyperstimulation syndrome. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology* 17, 249-261.
- [201] **Ghahiri A y col. (2015)**. Evaluation of intravenous hydroxylethyl starch, intravenous albumin 20%, and oral cabergoline for prevention of ovarian hyperstimulation syndrome in patients undergoing ovulation induction. *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences* 20, 692-696.
- [202] **Shaker AG y col. (1996)**. Comparison of intravenous albumin and transfer of fresh embryos with cryopreservation of all embryos for subsequent transfer in prevention of ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertility and sterility* 65, 992-996.
- [203] **Venetis CA y col. (2011)**. Intravenous albumin administration for the prevention of severe ovarian hyperstimulation syndrome: a systematic review and metaanalysis. *Fertility and sterility* 95, 188-196, 196 e181-183.
- [204] **Gomez R y col. (2002)**. Vascular endothelial growth factor receptor-2 activation induces vascular permeability in hyperstimulated rats, and this effect is prevented by receptor blockade. *Endocrinology* 143, 4339-4348.
- [205] **Ujioka T y col. (1997)**. Role of progesterone in capillary permeability in hyperstimulated rats. *Hum.Reprod.* 12, 1629-1634.
- [206] **Kitajima Y y col. (2004)**. Gonadotropin-releasing hormone agonist administration reduced vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors, and vascular permeability of the ovaries of hyperstimulated rats. *Fertil.Steril.* 81 Suppl 1, 842-849.
- [207] **Ozckir HT y col. (2005)**. Immunohistochemical detection of transforming growth factor- $\alpha$ , epidermal growth factor, and vascular endothelial growth factor expression in hyperstimulated rat ovary. *Acta Obstet.Gynecol.Scand.* 84, 887-893.
- [208] **Woodruff TK y col. (1988)**. Dynamic changes in inhibin messenger RNAs in rat ovarian follicles during the reproductive cycle. *Science* 239, 1296-1299.
- [209] **Kaya M y col. (2008)**. Morphological and functional changes of blood-brain barrier in kindled rats with cortical dysplasia. *Brain Res.* 1208, 181-191.
- [210] **Allain CC y col. (1974)**. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clinical chemistry* 20, 470-475.
- [211] **Gruemmer R y col. (2005)**. Regulation of soluble vascular endothelial growth factor receptor (sFlt-1/sVEGFR-1) expression and release in endothelial cells by human follicular fluid and granulosa cells. *Reprod.Biol.Endocrinol.* 3, 57.
- [212] **Xu S y col. (2009)**. Development of an optimized protocol for primary culture of smooth muscle cells from rat thoracic aortas. *Cytotechnology* 61, 65-72.
- [213] **Eiselein L y col. (2007)**. Lipolysis products from triglyceride-rich lipoproteins increase endothelial permeability, perturb zonula occludens-1 and F-actin, and induce apoptosis. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 292, H2745-H2753.
- [214] **Bazzoni G, Dejana E (2004)**. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev.* 84, 869-901.
- [215] **Walz A y col. (2005)**. Effects of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin on corpus luteum cells in a spheroid cell culture system. *Mol.Reprod.Dev.* 72, 98-104.
- [216] **Olivera A y col. (1999)**. Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J Cell Biol* 147, 545-558.
- [217] **Aboulghar M (2003)**. Prediction of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). Estradiol level has an important role in the prediction of OHSS. *Human reproduction* 18, 1140-1141.

- [218] **Manolopoulos K y col. (2001)**. Elevated interleukin-10 and sex steroid levels in peritoneal fluid of patients with ovarian hyperstimulation syndrome. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 99, 226-231.
- [219] **Berdyshev EV y col. (2011)**. Intracellular S1P generation is essential for S1P-induced motility of human lung endothelial cells: role of sphingosine kinase 1 and S1P lyase. *PLoS one* 6, e16571.
- [220] **Usatyuk PV y col. (2011)**. Photolysis of caged sphingosine-1-phosphate induces barrier enhancement and intracellular activation of lung endothelial cell signaling pathways. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 300, L840-850.
- [221] **Lee H, Goetzl EJ, An S (2000)**. Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate stimulate endothelial cell wound healing. *American journal of physiology. Cell physiology* 278, C612-618.
- [222] **English D y col. (2000)**. Sphingosine 1-phosphate released from platelets during clotting accounts for the potent endothelial cell chemotactic activity of blood serum and provides a novel link between hemostasis and angiogenesis. *FASEB J* 14, 2255-2265.
- [223] **Agrawal R y col. (2002)**. Concentration of vascular endothelial growth factor released by cultured human luteinized granulosa cells is higher in women with polycystic ovaries than in women with normal ovaries. *Fertil.Steril.* 78, 1164-1169.
- [224] **Allende ML, Yamashita T, Proia RL (2003)**. G-protein-coupled receptor S1P1 acts within endothelial cells to regulate vascular maturation. *Blood* 102, 3665-3667.
- [225] **Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C (2005)**. Endothelial/pericyte interactions. *Circ.Res.* 97, 512-523.
- [226] **Gaengel K y col. (2009)**. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 29, 630-638.
- [227] **Murakami M y col. (2011)**. Sphingosine kinase 1/S1P pathway involvement in the GDNF-induced GAP43 transcription. *J.Cell Biochem.* 112, 3449-3458.
- [228] **Scotti L y col. (2011)**. **Possible involvement of ANGPTs/TIE-2 system in Ovarian Hyperstimulation Syndrome (OHSS)**. 27th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE).
- [229] **Phillips HS y col. (1990)**. Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum. *Endocrinology* 127, 965-967.
- [230] **Kitajima Y y col. (2006)**. Hyperstimulation and a gonadotropin-releasing hormone agonist modulate ovarian vascular permeability by altering expression of the tight junction protein claudin-5. *Endocrinology* 147 (2), 694-699.
- [231] **Zlotkin T, Farkash Y, Orly J (1986)**. Cell-specific expression of immunoreactive cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology* 119, 2809-2820.
- [232] **Gibori G, Rodway R, Rothchild I (1977)**. The luteotrophic effect of estrogen in the rat: prevention by estradiol of the luteolytic effect of an antiserum to luteinizing hormone in the pregnant rat. *Endocrinology* 101, 1683-1689.
- [233] **Nelson SE y col. (1992)**. Isolation, characterization, and culture of cell subpopulations forming the pregnant rat corpus luteum. *Endocrinology* 130, 954-966.
- [234] **Pauli SA y col. (2005)**. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor 2 pathway is critical for blood vessel survival in corpora lutea of pregnancy in the rodent. *Endocrinology* 146, 1301-1311.
- [235] **Reynolds LP, Grazul-Bilska AT, Redmer DA (2000)**. Angiogenesis in the corpus luteum. *Endocrine.* 12, 1-9.
- [236] **Kuhnert F y col. (2008)**. Soluble receptor-mediated selective inhibition of VEGFR and PDGFRbeta signaling during physiologic and tumor angiogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105, 10185-10190.
- [237] **Tilton RG (1991)**. Capillary pericytes: perspectives and future trends. *Journal of electron microscopy technique* 19, 327-344.

- 
- [238] **Lampugnani MG (2012)**. Endothelial cell-to-cell junctions: adhesion and signaling in physiology and pathology. *Cold Spring Harb.Perspect.Med.* 2.
- [239] **Di Pietro M y col. (2016)**. Local administration of platelet-derived growth factor B (PDGFB) improves follicular development and ovarian angiogenesis in a rat model of Polycystic Ovary Syndrome. *Molecular and cellular endocrinology* 433, 47-55.
- [240] **Di Pietro M y col. (2015)**. Metformin regulates ovarian angiogenesis and follicular development in a female polycystic ovary syndrome rat model. *Endocrinology* 156, 1453-1463.
- [241] **Kluk MJ, Hla T (2001)**. Role of the sphingosine 1-phosphate receptor EDG-1 in vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circulation research* 89, 496-502.
- [242] **Sanchez T y col. (2003)**. Phosphorylation and action of the immunomodulator FTY720 inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced vascular permeability. *J.Biol.Chem.* 278, 47281-47290.
- [243] **Hobson JP y col. (2001)**. Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science* 291, 1800-1803.
- [244] **Schubert D (1992)**. Collaborative interactions between growth factors and the extracellular matrix. *Trends in cell biology* 2, 63-66.
- [245] **Nelson PR, Yamamura S, Kent KC (1997)**. Platelet-derived growth factor and extracellular matrix proteins provide a synergistic stimulus for human vascular smooth muscle cell migration. *Journal of vascular surgery* 26, 104-112.
- [246] **Somasundaram R, Schuppan D (1996)**. Type I, II, III, IV, V, and VI collagens serve as extracellular ligands for the isoforms of platelet-derived growth factor (AA, BB, and AB). *J Biol Chem* 271, 26884-26891.
- [247] **O'Connell BJ, Genest J, Jr. (2001)**. High-density lipoproteins and endothelial function. *Circulation* 104, 1978-1983.
- [248] **Angelucci S y col. (2006)**. Proteome analysis of human follicular fluid. *Biochim Biophys Acta* 1764, 1775-1785.
- [249] **Chang XL y col. (2017)**. The function of high-density lipoprotein and low-density lipoprotein in the maintenance of mouse ovarian steroid balance. *Biol Reprod* 97, 862-872.
- [250] **Wu Q y col. (2003)**. Lipoprotein enhancement of ovarian theca-interstitial cell steroidogenesis: relative contribution of scavenger receptor class B (type I) and adenosine 5'-triphosphate- binding cassette (type A1) transporter in high-density lipoprotein-cholesterol transport and androgen synthesis. *Endocrinology* 144, 2437-2445.
- [251] **Liu X, Xiong SL, Yi GH (2012)**. ABCA1, ABCG1, and SR-BI: Transit of HDL-associated sphingosine-1-phosphate. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 413, 384-390.
- [252] **Kim HR y col. (2008)**. Cytoskeletal remodeling in differentiated vascular smooth muscle is actin isoform dependent and stimulus dependent. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 295, C768-C778.
- [253] **Ye GJ, Nesmith AP, Parker KK (2014)**. The role of mechanotransduction on vascular smooth muscle myocytes' [corrected] cytoskeleton and contractile function. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)* 297, 1758-1769.
- [254] **Kowalczyk AP, Nanes BA (2012)**. Adherens junction turnover: regulating adhesion through cadherin endocytosis, degradation, and recycling. *Sub-cellular biochemistry* 60, 197-222.
- [255] **Delva E, Kowalczyk AP (2009)**. Regulation of Cadherin Trafficking. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 10, 259-267.
- [256] **Sharma M, Henderson BR (2007)**. IQ-domain GTPase-activating protein 1 regulates beta-catenin at membrane ruffles and its role in macropinocytosis of N-cadherin and adenomatous polyposis coli. *J Biol Chem* 282, 8545-8556.
- [257] **Philippova MP y col. (1998)**. T-cadherin and signal-transducing molecules co-localize in caveolin-rich membrane domains of vascular smooth muscle cells. *FEBS letters* 429, 207-210.

- [258] **Gimbrone MA, Jr., Cotran RS (1975)**. Human vascular smooth muscle in culture. Growth and ultrastructure. *Lab Invest* 33, 16-27.
- [259] **McKinlay SM, Brambilla DJ, Posner JG (1992)**. The normal menopause transition. *Maturitas* 14, 103-115.
- [260] **de Moraes-Ruehsen M, Jones GS (1967)**. Premature ovarian failure. *Fertility and sterility* 18, 440-461.
- [261] **Podfigurna-Stopa A y col. (2016)**. Premature ovarian insufficiency: the context of long-term effects. *Journal of Endocrinological Investigation* 39, 983-990.
- [262] **Cox L, Liu JH (2014)**. Primary ovarian insufficiency: an update. *International Journal of Women's Health* 6, 235-243.
- [263] **Persani L, Rossetti R, Cacciatore C (2010)**. Genes involved in human premature ovarian failure. *Journal of molecular endocrinology* 45, 257-279.
- [264] **Nelson LM (2009)**. Primary Ovarian Insufficiency. *The New England journal of medicine* 360, 606-614.
- [265] **Larsen EC y col. (2003)**. Diminished ovarian reserve in female childhood cancer survivors with regular menstrual cycles and basal FSH <10 IU/l. *Human reproduction* 18, 417-422.
- [266] **Wallace WH y col. (1989)**. Ovarian failure following abdominal irradiation in childhood: the radiosensitivity of the human oocyte. *The British journal of radiology* 62, 995-998.
- [267] **Bromberger JT y col. (1997)**. Prospective study of the determinants of age at menopause. *American journal of epidemiology* 145, 124-133.
- [268] **Windham GC y col. (1999)**. Cigarette smoking and effects on menstrual function. *Obstetrics and gynecology* 93, 59-65.
- [269] **Meirow D, Nugent D (2001)**. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Human reproduction update* 7, 535-543.
- [270] **Bines J, Oleske DM, Cobleigh MA (1996)**. Ovarian function in premenopausal women treated with adjuvant chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol* 14, 1718-1729.
- [271] **Lower EE y col. (1999)**. The risk of premature menopause induced by chemotherapy for early breast cancer. *Journal of women's health & gender-based medicine* 8, 949-954.
- [272] **Chiarelli AM, Marrett LD, Darlington G (1999)**. Early menopause and infertility in females after treatment for childhood cancer diagnosed in 1964-1988 in Ontario, Canada. *American journal of epidemiology* 150, 245-254.
- [273] **Meirow D y col. (1999)**. Subclinical depletion of primordial follicular reserve in mice treated with cyclophosphamide: clinical importance and proposed accurate investigative tool. *Human reproduction* 14, 1903-1907.
- [274] **Petrek JA y col. (2006)**. Incidence, Time Course, and Determinants of Menstrual Bleeding After Breast Cancer Treatment: A Prospective Study. *Journal of Clinical Oncology* 24, 1045-1051.
- [275] **Meirow D (2000)**. Reproduction post-chemotherapy in young cancer patients. *Molecular and cellular endocrinology* 169, 123-131.
- [276] **Sklar CA y col. (2006)**. Premature menopause in survivors of childhood cancer: a report from the childhood cancer survivor study. *Journal of the National Cancer Institute* 98, 890-896.
- [277] **Kelsey TW y col. (2011)**. A Validated Model of Serum Anti-Müllerian Hormone from Conception to Menopause. *PloS one* 6, e22024.
- [278] **Emadi A, Jones RJ, Brodsky RA (2009)**. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nature reviews. Clinical oncology* 6, 638-647.
- [279] **Ahlmann M, Hempel G (2016)**. The effect of cyclophosphamide on the immune system: implications for clinical cancer therapy. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 78, 661-671.
- [280] **Elmariah H y col. (2018)**. Haploidentical Bone Marrow Transplantation with Post-Transplant Cyclophosphamide Using Non-First-Degree Related Donors. *Biology of blood and*

- marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation.
- [281] **Bawazier LA (2017)**. Current and Emerging Therapy on Lupus Nephritis. *Acta medica Indonesiana* 49, 369-377.
- [282] **Lallana EC, Fadul CE (2011)**. Toxicities of Immunosuppressive Treatment of Autoimmune Neurologic Diseases. *Current Neuropharmacology* 9, 468-477.
- [283] **Zver S y col. (2007)**. Cardiac toxicity of high-dose cyclophosphamide in patients with multiple myeloma undergoing autologous hematopoietic stem cell transplantation. *International journal of hematology* 85, 408-414.
- [284] **Byrne J y col. (1992)**. Early menopause in long-term survivors of cancer during adolescence. *American journal of obstetrics and gynecology* 166, 788-793.
- [285] **Yule SM y col. (1995)**. Cyclophosphamide metabolism in children. *Cancer research* 55, 803-809.
- [286] **Desmeules P, Devine PJ (2006)**. Characterizing the ovotoxicity of cyclophosphamide metabolites on cultured mouse ovaries. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 90, 500-509.
- [287] **Plowchalk DR, Mattison DR (1992)**. Reproductive toxicity of cyclophosphamide in the C57BL/6N mouse: 1. Effects on ovarian structure and function. *Reproductive toxicology* 6, 411-421.
- [288] **Wang JY, Prorok G, Vaughan WP (1993)**. Cytotoxicity, DNA cross-linking, and DNA single-strand breaks induced by cyclophosphamide in a rat leukemia in vivo. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 31, 381-386.
- [289] **Van Putten LM, Lelieveld P, Kram-Idsenga LK (1972)**. Cell-cycle specificity and therapeutic effectiveness of cytostatic agents. *Cancer chemotherapy reports* 56, 691-700.
- [290] **Zhao XJ y col. (2010)**. GnRH antagonist cetrorelix inhibits mitochondria-dependent apoptosis triggered by chemotherapy in granulosa cells of rats. *Gynecologic oncology* 118, 69-75.
- [291] **Barekati Z y col. (2012)**. Effects of amifostine in combination with cyclophosphamide on female reproductive system. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)* 19, 539-546.
- [292] **Schimmel KJ y col. (2004)**. Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer treatment reviews* 30, 181-191.
- [293] **Petrillo SK y col. (2011)**. Detection of DNA damage in oocytes of small ovarian follicles following phosphoramidate mustard exposures of cultured rodent ovaries in vitro. *Toxicology and applied pharmacology* 253, 94-102.
- [294] **Durlinger AL y col. (1999)**. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 140, 5789-5796.
- [295] **Abir R y col. (2008)**. Selection of patients before and after anticancer treatment for ovarian cryopreservation. *Human reproduction* 23, 869-877.
- [296] **Raz A y col. (2002)**. Possible Direct Cytotoxicity Effects of Cyclophosphamide on Cultured Human Follicles: An Electron Microscopy Study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 19, 500-506.
- [297] **Decanter C y col. (2010)**. Anti-Mullerian hormone follow-up in young women treated by chemotherapy for lymphoma: preliminary results. *Reproductive biomedicine online* 20, 280-285.
- [298] **Rosendahl M y col. (2010)**. Dynamics and mechanisms of chemotherapy-induced ovarian follicular depletion in women of fertile age. *Fertility and sterility* 94, 156-166.
- [299] **Robinson RS y col. (2009)**. Angiogenesis and vascular function in the ovary. *Reproduction* 138, 869-881.
- [300] **Marcello MF y col. (1990)**. Structural and ultrastructural study of the ovary in childhood leukemia after successful treatment. *Cancer* 66, 2099-2104.

- [301] **Huyan XH y col. (2011)**. Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice. *International immunopharmacology* 11, 1293-1297.
- [302] **Manepalli S y col. (2013)**. Characterization of a cyclophosphamide-induced murine model of immunosuppression to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *Journal of Medical Microbiology* 62, 1747-1754.
- [303] **Marcinkiewicz J, Bryniarski K, Ptak W (1994)**. Cyclophosphamide uncovers two separate macrophage subpopulations with opposite immunogenic potential and different patterns of monokine production. *Cytokine* 6, 472-477.
- [304] **Santosuosso M y col. (2002)**. Reduced tissue macrophage population in the lung by anticancer agent cyclophosphamide: restoration by local granulocyte macrophage-colony-stimulating factor gene transfer. *Blood* 99, 1246-1252.
- [305] **Yang Z y col. (2011)**. TLRs, macrophages, and NK cells: our understandings of their functions in uterus and ovary. *International immunopharmacology* 11, 1442-1450.
- [306] **Smith MF y col. (2002)**. Ovarian tissue remodeling: role of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Molecular and cellular endocrinology* 191, 45-56.
- [307] **Gaytan F y col. (1998)**. Ovarian follicle macrophages: is follicular atresia in the immature rat a macrophage-mediated event? *Biol Reprod* 58, 52-59.
- [308] **Wu R y col. (2004)**. Macrophage contributions to ovarian function. *Human reproduction update* 10, 119-133.
- [309] **Figueroa F y col. (2015)**. Role of macrophage secretions on rat polycystic ovary: its effect on apoptosis. *Reproduction* 150, 437-448.
- [310] **Arici A y col. (1997)**. Monocyte chemotactic protein-1 expression in human preovulatory follicles and ovarian cells. *Journal of reproductive immunology* 32, 201-219.
- [311] **Dahm-Kahler P y col. (2006)**. Monocyte chemotactic protein-1 in the follicle of the menstrual and IVF cycle. *Molecular human reproduction* 12, 1-6.
- [312] **Baranao RI y col. (1995)**. Human granulosa cells express HLA-DR antigen and are capable of synthesizing interleukin-1. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 27, 495-498.
- [313] **Turner EC y col. (2011)**. Conditional ablation of macrophages disrupts ovarian vasculature. *Reproduction (Cambridge, England)* 141, 821-831.
- [314] **Plowchalk DR, Meadows MJ, Mattison DR (1992)**. Reproductive toxicity of cyclophosphamide in the C57BL/6N mouse: 2. Effects on uterine structure and function. *Reproductive toxicology* 6, 423-429.
- [315] **Gook DA, Edgar DH (2007)**. Human oocyte cryopreservation. *Human reproduction update* 13, 591-605.
- [316] **Loren AW y col. (2013)**. Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol* 31, 2500-2510.
- [317] **Lambertini M y col. (2016)**. Cancer and fertility preservation: international recommendations from an expert meeting. *BMC Medicine* 14, 1.
- [318] **Wallace WH y col. (2014)**. Fertility preservation for girls and young women with cancer: population-based validation of criteria for ovarian tissue cryopreservation. *The Lancet. Oncology* 15, 1129-1136.
- [319] **Tan SJ y col. (2010)**. Protective effect of a gonadotropin-releasing hormone analogue on chemotherapeutic agent-induced ovarian gonadotoxicity: a mouse model. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 149, 182-185.
- [320] **Ataya K y col. (1995)**. Luteinizing hormone-releasing hormone agonist inhibits cyclophosphamide-induced ovarian follicular depletion in rhesus monkeys. *Biol Reprod* 52, 365-372.

- 
- [321] **Danforth DR, Arbogast LK, Friedman CI (2005).** Acute depletion of murine primordial follicle reserve by gonadotropin-releasing hormone antagonists. *Fertility and sterility* 83, 1333-1338.
- [322] **Sredni B y col. (1987).** A new immunomodulating compound (AS-101) with potential therapeutic application. *Nature* 330, 173.
- [323] **Kalechman Y y col. (1991).** Protective and Restorative Role of AS101 in Combination with Chemotherapy. *Cancer research* 51, 1499-1503.
- [324] **Hayun R y col. (2007).** Novel involvement of the immunomodulator AS101 in IL-10 signaling, via the tyrosine kinase Fer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1095, 240-250.
- [325] **Kano M y col. (2017).** AMH/MIS as a contraceptive that protects the ovarian reserve during chemotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, E1688-E1697.
- [326] **Goldman KN y col. (2017).** mTORC1/2 inhibition preserves ovarian function and fertility during genotoxic chemotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, 3186-3191.
- [327] **Ferreira SG y col. (2013).** Effects of melatonin on DNA damage induced by cyclophosphamide in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 46, 278-286.
- [328] **Meng Y y col. (2014).** Sphingosine-1-phosphate suppresses cyclophosphamide induced follicle apoptosis in human fetal ovarian xenografts in nude mice. *Fertility and sterility* 102, 871-877 e873.
- [329] **Li S y col. (2017).** Sphingosine-1-phosphate activates the AKT pathway to inhibit chemotherapy induced human granulosa cell apoptosis. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 33, 476-479.
- [330] **Zelinski MB y col. (2011).** In vivo delivery of FTY720 prevents radiation-induced ovarian failure and infertility in adult female nonhuman primates. *Fertil.Steril.* 95, 1440-1445.
- [331] **Bartke N, Hannun YA (2009).** Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *Journal of lipid research* 50 Suppl, S91-96.
- [332] **Simons K, Ikonen E (1997).** Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569.
- [333] **Marchesini N, Hannun YA (2004).** Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. *Biochem.Cell Biol.* 82, 27-44.
- [334] **Boath A y col. (2008).** Regulation and traffic of ceramide 1-phosphate produced by ceramide kinase: comparative analysis to glucosylceramide and sphingomyelin. *J Biol Chem* 283, 8517-8526.
- [335] **Ratajczak MZ y col. (2014).** The role of sphingosine-1 phosphate and ceramide-1 phosphate in trafficking of normal stem cells and cancer cells. *Expert.Opin.Ther.Targets.* 18, 95-107.
- [336] **Hammad SM y col. (2010).** Blood sphingolipidomics in healthy humans: impact of sample collection methodology. *J.Lipid Res.* 51, 3074-3087.
- [337] **Granado MH y col. (2009).** Ceramide 1-phosphate (C1P) promotes cell migration Involvement of a specific C1P receptor. *Cell Signal.* 21, 405-412.
- [338] **Gomez-Munoz A (2006).** Ceramide 1-phosphate/ceramide, a switch between life and death. *Biochim Biophys Acta* 1758, 2049-2056.
- [339] **Gangoiti P y col. (2008).** Ceramide 1-phosphate stimulates macrophage proliferation through activation of the PI3-kinase/PKB, JNK and ERK1/2 pathways. *Cell Signal.* 20, 726-736.
- [340] **Gomez-Munoz A y col. (2005).** Ceramide-1-phosphate promotes cell survival through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *FEBS Lett.* 579, 3744-3750.
- [341] **Gomez-Munoz A y col. (2004).** Ceramide-1-phosphate blocks apoptosis through inhibition of acid sphingomyelinase in macrophages. *J.Lipid Res.* 45, 99-105.
- [342] **Mitra P y col. (2007).** Ceramide kinase regulates growth and survival of A549 human lung adenocarcinoma cells. *FEBS letters* 581, 735-740.

- [343] **Browne HN y col. (2011)**. Is anti-Mullerian hormone a marker of acute cyclophosphamide-induced ovarian follicular destruction in mice pretreated with cetrorelix? *Fertility and sterility* 96, 180-186 e182.
- [344] **Goldman KN y col. (2017)**. mTORC1/2 inhibition preserves ovarian function and fertility during genotoxic chemotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, 3186-3191.
- [345] **Tilly JL (2003)**. Ovarian follicle counts--not as simple as 1, 2, 3. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 1, 11.
- [346] **Fujiwara Y y col. (1994)**. Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila vasa* and its specific expression in germ cell lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 12258-12262.
- [347] **Castrillon DH y col. (2000)**. The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 9585-9590.
- [348] **Zarate-Garcia L y col. (2016)**. FACS-sorted putative oogonial stem cells from the ovary are neither DDX4-positive nor germ cells. *Scientific reports* 6, 27991.
- [349] **Gomez-Elias MD y col. (2016)**. In vitro and in vivo effects of ulipristal acetate on fertilization and early embryo development in mice. *Human reproduction* 31, 53-59.
- [350] **D'Herde K, De Pestel G, Roels F (1994)**. In situ end labeling of fragmented DNA in induced ovarian atresia. *Biochem Cell Biol* 72, 573-579.
- [351] **Andreu C y col. (1998)**. Regulation of follicular luteinization by a gonadotropin-releasing hormone agonist: relationship between steroidogenesis and apoptosis. *Mol.Reprod.Dev.* 51, 287-294.
- [352] **Falcone T, Bedaiwy MA (2005)**. Fertility preservation and pregnancy outcome after malignancy. *Current opinion in obstetrics & gynecology* 17, 21-26.
- [353] **Blumenfeld Z y col. (1999)**. Preservation of fertility and ovarian function and minimizing chemotherapy-induced gonadotoxicity in young women. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 6, 229-239.
- [354] **Stefansdottir A y col. (2014)**. Use of ovary culture techniques in reproductive toxicology. *Reproductive toxicology* 49, 117-135.
- [355] **Jarrell J y col. (1987)**. Ovarian toxicity of cyclophosphamide alone and in combination with ovarian irradiation in the rat. *Cancer research* 47, 2340-2343.
- [356] **Tsai-Turton M y col. (2007)**. Cyclophosphamide-induced apoptosis in COV434 human granulosa cells involves oxidative stress and glutathione depletion. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 98, 216-230.
- [357] **Strauss SJ y col. (2007)**. The proteasome inhibitor bortezomib acts independently of p53 and induces cell death via apoptosis and mitotic catastrophe in B-cell lymphoma cell lines. *Cancer research* 67, 2783-2790.
- [358] **Hancke K y col. (2007)**. Sphingosine 1-phosphate protects ovaries from chemotherapy-induced damage in vivo. *Fertil.Steril.* 87, 172-177.
- [359] **Budihardjo I y col. (1999)**. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol* 15, 269-290.
- [360] **Morita Y y col. (2000)**. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nat.Med.* 6, 1109-1114.
- [361] **Oktem O, Oktay K (2007)**. Quantitative assessment of the impact of chemotherapy on ovarian follicle reserve and stromal function. *Cancer* 110, 2222-2229.
- [362] **Zhao SY y col. (2010)**. Expression of growth differentiation factor-9 and bone morphogenetic protein-15 in oocytes and cumulus granulosa cells of patients with polycystic ovary syndrome. *Fertility and sterility* 94, 261-267.



- [363] **Castrillon DH y col. (2003)**. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science* 301, 215-218.
- [364] **Schmidt D y col. (2004)**. The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* 131, 933-942.
- [365] **La Marca A y col. (2009)**. Anti-Mullerian hormone (AMH): what do we still need to know? *Human reproduction* 24, 2264-2275.
- [366] **Anderson RA, Cameron DA (2011)**. Pretreatment serum anti-mullerian hormone predicts long-term ovarian function and bone mass after chemotherapy for early breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 96, 1336-1343.
- [367] **Ataya KM, Valeriote FA, Ramahi-Ataya AJ (1989)**. Effect of cyclophosphamide on the immature rat ovary. *Cancer research* 49, 1660-1664.
- [368] **Jarrell JF y col. (1991)**. The short-term reproductive toxicity of cyclophosphamide in the female rat. *Reproductive toxicology* 5, 481-485.
- [369] **Bokser L, Szende B, Schally AV (1990)**. Protective effects of D-Trp6-luteinising hormone-releasing hormone microcapsules against cyclophosphamide-induced gonadotoxicity in female rats. *British journal of cancer* 61, 861-865.
- [370] **Roness H y col. (2013)**. Ovarian follicle burnout: a universal phenomenon? *Cell Cycle* 12, 3245-3246.
- [371] **Adhikari D y col. (2010)**. Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. *Human molecular genetics* 19, 397-410.
- [372] **Adhikari D y col. (2009)**. Disruption of Tsc2 in oocytes leads to overactivation of the entire pool of primordial follicles. *Molecular human reproduction* 15, 765-770.
- [373] **Li J y col. (2010)**. Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 10280-10284.
- [374] **Kawamura K y col. (2013)**. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 17474-17479.
- [375] **Roness H, Cyclophosphamide triggers follicle activation causing ovarian reserve 'burnout'; AS101 preserves fertility.**, ESHRE, London, UK., 2013.
- [376] **Strauss G y col. (2008)**. 4-hydroperoxy-cyclophosphamide mediates caspase-independent T-cell apoptosis involving oxidative stress-induced nuclear relocation of mitochondrial apoptogenic factors AIF and EndoG. *Cell Death Differ* 15, 332-343.
- [377] **Doll DC, Ringenberg QS, Yarbrow JW (1986)**. Vascular toxicity associated with antineoplastic agents. *J Clin Oncol* 4, 1405-1417.
- [378] **Bar-Joseph H y col. (2011)**. In vivo bioimaging as a novel strategy to detect doxorubicin-induced damage to gonadal blood vessels. *PloS one* 6, e23492.
- [379] **Meirow D y col. (2007)**. Cortical fibrosis and blood-vessels damage in human ovaries exposed to chemotherapy. Potential mechanisms of ovarian injury. *Human reproduction* 22, 1626-1633.
- [380] **Kim C y col. (2013)**. Ceramide-1-phosphate regulates migration of multipotent stromal cells and endothelial progenitor cells--implications for tissue regeneration. *Stem Cells* 31, 500-510.
- [381] **Gomez-Munoz A y col. (2016)**. Caged ceramide 1-phosphate (C1P) analogs: Novel tools for studying C1P biology. *Chemistry and physics of lipids* 194, 79-84.
- [382] **Lankalapalli RS y col. (2009)**. Caged ceramide 1-phosphate analogues: synthesis and properties. *The Journal of organic chemistry* 74, 8844-8847.
- [383] **Winkelstein A (1973)**. Mechanisms of Immunosuppression: Effects of Cyclophosphamide on Cellular Immunity. *Blood* 41, 273-284.
- [384] **V Gadeberg O, M Rhodes J, Larsen S (1975)**. The effect of various immunosuppressive agents on mouse peritoneal macrophages and on the in vitro phagocytosis of *Escherichia coli* O4:K3:H5 and degradation of 125I labelled HSA antibody complexes by these cells.

- [385] **Santosuosso M y col. (2002).** Reduced tissue macrophage population in the lung by anticancer agent cyclophosphamide: restoration by local granulocyte macrophage-colony-stimulating factor gene transfer. *Blood* 99, 1246-1252.
- [386] **Tingen CM y col. (2011).** A macrophage and theca cell-enriched stromal cell population influences growth and survival of immature murine follicles in vitro. *Reproduction* 141, 809-820.