

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**

---



**“EFECTO DE FSH SOBRE LAS CÉLULAS DE LA GRANULOSA HUMANAS CULTIVADAS  
EN CONDICIONES HIPERINSULÍNICAS E HIPERANDROGÉNICAS”**

**LINDA LIEN-ALE QUILAQUEO ITURRIETA**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE  
MAGISTER EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN**

Director de Tesis: Prof. Dr. Luigi Devoto Canessa

**2017**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER**

**Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por la candidata**

**LINDA LIEN-ALE QUILAQUEO ITURRIETA**

**ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Biología de la Reproducción en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 20 octubre de 2017**

**Prof. Dr. Luigi Devoto Canessa  
Director de Tesis**

Instituto de Investigaciones Materno Infantil,  
Facultad de Medicina, Universidad de Chile

**COMISION INFORMANTE DE TESIS**

**Prof. Dr. Alfonso Paredes V.**

**Prof. Dr. Nicolás Crisosto K.**

**Prof. Dr. Rodrigo Carvajal G.**

**Prof. Dra. Margarita Vega  
Presidenta Comisión**

*Dedico esta tesis a:*

***Laura y Roberto, mis padres, quienes me dieron la vida***  
***Angelito, mi hermano, por sorprenderme con su música***  
***Nelson Muñoz, mi esposo, por amarme y apoyarme siempre***  
***Maita, por regalónearme y entregarme su cariño.***

## **Agradecimientos:**

Cuando yo tenía 3 años me diagnosticaron leucemia mieloide promielocítica, y me hospitalizaron en el Hospital San Borja Arriaran. Por motivos académicos y sin querer, las vueltas de la vida me hicieron volver a este hospital puesto que el IDIMI se encuentra dentro de este. Ha sido muy emotivo y nostálgico el volver al hospital, de hecho, ya me he topado varias veces con mi oncóloga en los pasillos del hospital, la Dra. Irina Ocheretin, quien está muy orgullosa de mi y se emociona cada vez que nos vemos.

Quisiera agradecer a mis padres Laurel y Roberto, quienes me dieron la vida y siguieron creyendo en mi hasta hoy, tanto en la salud como académicamente, sin ustedes yo no estaría aquí, todos mis logros se los debo a ellos, los amo con el corazón. Después de las radioterapias y quimioterapias se suponía que yo no iba ser capaz ni de terminar el colegio, sin embargo, salí adelante gracias a su apoyo y aquí estoy ahora terminando un postgrado, quien lo iba a imaginar. Quiero agradecer también a mi hermano ñoño flautista a quien amo y estimo demasiado. Agradezco a mi Mayta (Mayo) quien me cuidó durante mi infancia y me regaló hasta el día de hoy, la amo mucho. Muchas veces le pedí buena vibra e inspiración a mi abuelita Sonia y a mi bis-abueli Elena quienes descansan en el cielo y estarán por siempre en mi corazón. Agradezco especialmente a mi esposo quien ha sido fundamental en este proceso, ha tenido mucha paciencia y comprensión, siempre me acompaña y apoya en todos mis proyectos, él es el hombre con quien decidí estar toda la vida, mi amado Nelsin <3.

Agradecer a mis tutoras: a la Srta Paulina quien siempre tuvo un tiempo para ayudarme con la tesis, sus sabios consejos, su paciencia y dedicación; A la Sole que siempre andaba tan alegre, y me ayudaba con la tesis, gracias por los datos para hacerse las manos XD; Agradecer por supuesto a mi tutor el Dr. Devoto quien me aceptó en su laboratorio y me permitió hacer mi tesis de magister.

Quiero agradecer a la gente del IDIMI: A la Sra. Noe que siempre fue muy amable y servicial al reponer el material de laboratorio, muy tierna en su trato, recordare cuando compartíamos la bolsa del té; A Don Alex que tenía muy buena disposición para ayudar en lo que sea en el laboratorio; A Gisela que siempre fue tan conversadora, risueña y simpática; Keyla mi compañera de escritorio con quien podía conversar de todo y también aclarar alguna dudas de la tesis, ahora que no está el laboratorio se siente vacío; La Cami Aguirre muy humilde y buena persona se extraña su compañía en el lab; la Andrea Poch siempre tan culta, lo que le preguntabas ella sabía y lo mejor de todo es que era muy amable y simpática si querías consultarle sobre algo, desde consejos de la vida hasta cosas académicas, compartía su sabio conocimiento; Roció quien me enseñó todos los protocolos del laboratorio, que en un principio yo sentía que yo no le agradaba pero luego fue muy amable conmigo, me enseñó además muchas cosas académicas para realizar mi tesis; Felipe, quien siempre era tan gracioso con sus comentarios, fue muy buena onda conmigo; Eli y Marta con quienes compartía a la hora del almuerzo, este era un espacio para compartir y reír un rato; y por supuesto agradecer a Johanna quien me trajo al IDIMI, sin ella no podría haber llegado hasta acá, ella fue mi compañera durante el magister, estudiábamos juntas y hasta el día de hoy carreamos con nuestras familias. Finalmente quiero agradecerle a la vida por tener buena salud y gente me ama.

*...Y vivir cada día intensamente como si fuera el último, Carpe diem.*

## ÍNDICE DE CONTENIDO

1. RESÚMENES DE CONGRESOS GENERADOS POR LA TESIS .....	8
2. RESUMEN .....	9
3. ABSTRACT .....	10
4. INTRODUCCIÓN.....	11
4.1. Hormona Folículo Estimulante. Foliculogénesis normal. ....	11
4.2. Esteroidogénesis .....	14
4.3. Angiogénesis.....	15
4.4. Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP) .....	16
4.4.1. Definición del SOP .....	16
4.4.2. Criterios clínicos - ecográficos y bioquímicos en diagnóstico del SOP.....	17
4.4.3. Esteroidogénesis en el SOP .....	17
4.4.4. Hiperandrogenismo e hiperinsulinismo en el SOP .....	18
4.4.5. Foliculogénesis en el SOP.....	19
4.4.6. Angiogénesis en el SOP.....	20
4.5. Vías de señalización de FSH en SOP .....	21
5. HIPÓTESIS .....	22
6. OBJETIVOS .....	23
6.1. Objetivo general .....	23
6.2. Objetivos específicos.....	23
7. MATERIAL Y MÉTODOS .....	24
7.1. Incorporación de pacientes y obtención de la muestra.....	24
7.2. Cultivo primario de CG en medio control.....	25
7.3. Cultivo primario de CG en medio I+T .....	26
7.4. Análisis de las vías de señalización activadas por FSH.....	27
7.5. Efecto de FSH sobre la esteroidogénesis y la angiogénesis.....	28

7.5.1. Determinación de la participación de las vías activadas por FSH involucradas en la esteroidogénesis y la angiogénesis.....	28
7.5.2. Determinación de progesterona (P) y estradiol (E2).....	29
7.5.3. Análisis del Potencial Angiogénico .....	30
7.5.4. Cuantificación de los niveles de VEGF .....	32
7.6. Análisis estadístico .....	32
8. RESULTADOS .....	33
8.1. Efecto de FSH sobre las vías de señalización PKA/CREB, MAPK/ERK1/2, PI3K/AKT y PKC/MARCKS, en CG cultivadas en medio control y medio I + T. ....	33
8.2. Efecto de FSH sobre la secreción de progesterona y estradiol en CG cultivadas en medio control y en medio I + T. ....	35
8.3. Acción de FSH sobre el potencial angiogénico y los niveles de VEGF en CG cultivadas en medio control y en medio I + T. ....	38
8.4. Participación de la vía de señalización PKA/CREB, activada por FSH, sobre la angiogénesis y esteroidogénesis en CG luteinizadas humanas. ....	41
8.5. Vía de señalización MAPK/ERK, activada por FSH, sobre la angiogénesis y la esteroidogénesis en CG luteinizadas humanas. ....	43
9. DISCUSIÓN .....	45
10. CONCLUSIÓN .....	52
11. BIBLIOGRAFIA .....	53
12. ANEXOS .....	63
12.1. Consentimiento informado.....	63
12.2. Viabilidad de las CG cultivadas en diferentes concentraciones de testosterona e insulina.....	65
12.3. Modelo experimental. ....	66
12.4. Abreviaciones.....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°1: Evaluación del índice de potencial angiogénico en base a fórmula .....	31
Figura N°2: Efecto de FSH sobre las vías de señalización PKA/CREB, MAPK/ERK1/2, PI3K/AKT y PKC/MARCKS, en CG cultivadas en medio control y medio I + T. ....	34
Figura N°3: Efecto de FSH sobre la secreción de progesterona en CG cultivadas en medio control, medio I + T y en CG de mujeres SOP.....	36
Figura N°4: Efecto de FSH sobre la secreción de estradiol en CG cultivadas en medio control, medio I + T y en CG de mujeres SOP.....	37
Figura N°5: Efecto de FSH sobre el potencial angiogénico in vitro de CG en medio control y en medio I + T. ....	39
Figura N°6: Acción de FSH sobre los niveles de VEGF de CG en medio control y medio I + T.....	40
Figura N°7: Participación de la vía de señalización PKA/CREB, activada por FSH sobre la angiogénesis y la esteroidogénesis en CG. ....	42
Figura N°8: Contribución de la vía de señalización MAPK/ERK, activada por FSH, sobre la angiogénesis y la esteroidogénesis en CG. ....	43
Figura N°8: Resumen de resultados.....	50

## 1. RESÚMENES DE CONGRESOS GENERADOS POR LA TESIS

XXVII Reunión anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo (SCHR) 2016, poster: "Efecto de FSH sobre las células de granulosa humana cultivadas en un ambiente hiperandrogénico e hiperinsulínico" **Quilaqueo L.**, Henríquez S., Kohen P., y Devoto L.

3er Congreso de la Federación Latina de Endocrinología Ginecológica, FLEG, 11as Jornadas Anuales de Endocrinología Ginecológica, Reproducción y Andrología y 15ª Reunión anual de SAGACH 2017, poster: "Efecto de FSH sobre las células de granulosa humana cultivadas en medio tipo SOP" **Quilaqueo L.**, Henríquez S., Kohen P., Godoy A., Orge F., Devoto L. **Primer Premio área científica.**

XXVIII Reunión anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo (SCHR) 2017, poster: "Metabolitos de estrógenos en la regulación de la angiogénesis en pacientes con Síndrome de Ovario Poliquístico" Henríquez S., Kohen P., **Quilaqueo L.**, Godoy A., Orge F., Devoto L.



## 2. RESUMEN

El Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP), es una disfunción endocrino-ginecológica de alta prevalencia en mujeres en edad fértil (5 al 10%). Se estima que el 64% de estas pacientes pueden presentar hiperandrogenismo e hiperinsulinemia. Antecedentes de literatura sugieren que elevados niveles de andrógenos e insulina conducirían a una desregulación en la señalización de FSH, lo que explicaría en parte la disfunción en los procesos de esteroidogénesis y angiogénesis en el SOP. Las vías de señalización activadas por FSH no han sido completamente dilucidadas en esta patología, por esto su evaluación podría contribuir a explicar la disfunción en el desarrollo folicular de las mujeres con SOP. La hipótesis de este trabajo propone: "FSH activa las vías de señalización PKA, MAPK, PI3K y PKC modulando la esteroidogénesis y el potencial angiogénico en células de la granulosa luteinizadas humanas. El efecto estimulador de FSH sobre las vías de señalización esta desregulado en las células de la granulosa luteinizadas cultivadas en condiciones hiperinsulínicas e hiperandrogénicas, disminuyendo la esteroidogénesis y aumentando la angiogénesis". Este estudio se realizó en células de la granulosa (CG) provenientes de mujeres normales que participan del Programa IVF debido a infertilidad por factor masculino exclusivo. Las CG, fueron cultivadas en medio control y en medio hiperinsulínico e hiperandrogénico (medio I+T), y estimuladas con FSH a diferentes tiempos. Los resultados muestran que FSH estimula la fosforilación de las vías PKA y MAPK, y la secreción de progesterona, las cuales disminuyeron significativamente en CG cultivadas en medio I + T comparado con el medio control ( $P < 0,05$ ). La presente investigación destaca que el potencial angiogénico y los niveles del factor pro-angiogénico, VEGF, fueron significativamente mayores en CG estimuladas con FSH en medio I + T comparándolas con el medio control ( $P < 0,05$ ). FSH regula el potencial angiogénico, la secreción de VEGF y progesterona, a través de la vía de señalización MAPK, mientras que la vía de señalización PKA, dependiente de FSH, solo estaría regulando la producción de progesterona. Estos resultados sugieren, que el exceso de andrógenos e insulina alteran el microambiente folicular, modificando el efecto de FSH sobre las vías de señalización que regulan la esteroidogénesis y la angiogénesis.

### 3. ABSTRACT

Polycystic Ovarian Syndrome (PCOS) is an endocrine-gynecological dysfunction with high prevalence in fertile women (5 to 10%). It is estimated that 64% of these patients may present hyperandrogenism and hyperinsulinemia. It is believed that high levels of androgens and insulin would lead to deregulation of FSH signaling. This notion could explain a dysfunction in the processes of steroidogenesis and angiogenesis in PCOS. The signaling pathways activated by FSH have not been completely elucidated in this pathology, therefore its evaluation could contribute to explain the dysfunction in the follicular development of women with PCOS. The hypothesis of this work was: "FSH activates the signaling pathways PKA, MAPK, PI3K and PKC that are involved in steroidogenesis and angiogenic potential in human luteinized granulosa cells. The FSH stimulatory effect on signaling pathways is deregulated in luteinized granulosa cells cultured under hyperinsulinic and hyperandrogenic conditions, decreasing steroidogenesis and increasing angiogenesis ". This study was performed on granulosa cells (GC) collected from normal women participating in the IVF Program due to exclusive male factor infertility. GC, were cultured in control medium and in hyperinsulinic and hyperandrogenic medium (I + T medium), and stimulated with FSH at different times. The results show that FSH stimulates phosphorylation of the PKA and MAPK pathways, and progesterone secretion, which decreased significantly in GC cultivated in I + T medium compared to the control medium ( $P < 0.05$ ). Interestingly, angiogenic potential and VEGF, pro-angiogenic factor levels, were significantly higher in GC stimulated with FSH in I + T medium compared to the control medium ( $P < 0.05$ ). FSH regulates the angiogenic potential, secretion of VEGF and progesterone through the MAPK signaling pathway, whereas the PKA signaling pathway, FSH dependent, only regulates the production of progesterone. These results suggest that excess androgens and insulin alter the follicular microenvironment, modifying the effect of FSH on the signaling pathways that regulate steroidogenesis and angiogenesis.

## **4. INTRODUCCIÓN**

### **4.1. Hormona Folículo Estimulante. Foliculogénesis normal.**

El eje hipotálamo-hipófisis-gonadal controla la función reproductiva, a través de la kisspeptina, neuropéptido hipotalámico asociado a la liberación pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la que actúa sobre las células gonadotropas de la adenohipófisis estimulando la liberación de las gonadotropinas: Hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH). En el ovario, LH y FSH, se unen a sus receptores en las células de la granulosa (CG) y las células de la teca (CT), respectivamente, estimulando el desarrollo folicular y la producción ovárica de estradiol (E2), progesterona (P), andrógenos y factores de crecimiento. Entre otras funciones, estos factores derivados del ovario retroalimentan el hipotálamo y la hipófisis para inhibir o aumentar la secreción de GnRH y gonadotropinas (Barbieri 2014).

El folículo ovárico es la unidad básica de la endocrinología reproductiva y está constituido por distintas células somáticas: CT, CG y células del cúmulo, las cuales envuelven al ovocito. El desarrollo folicular es un proceso que incluye diferenciación endocrino – molecular de las células del folículo, incluyendo proliferación e incremento de la biosíntesis esterooidal, posibilitando el progreso de los folículos desde su estadio primordial-primario hasta el estadio pre-ovulatorio maduro (Eppig 2001).

La transición de folículo primordial a folículo primario se caracteriza por cambios morfológicos en las CG las cuales varían de una forma aplanada a una forma cuboidal. Durante el desarrollo del folículo secundario, el ovocito continúa desarrollándose, las

CG proliferan y se forma una capa de CT por fuera de la membrana basal que rodea al folículo ovárico. Estas etapas son independientes de la acción de las gonadotropinas, pero requieren de una comunicación bidireccional entre el ovocito y las células somáticas lo cual está mediado por diferentes factores de crecimiento (Eppig 2001).

En etapas avanzadas del desarrollo folicular, pequeñas cavidades emergen en el estrato de las CG las cuales son ocupadas por líquido folicular fusionándose y formando una cavidad única, conocida como antro. El antro define dos poblaciones separadas de CG: las CG del cúmulo adyacentes al ovocito y las CG murales que recubren la pared del folículo cuya función es la biosíntesis de hormonas esteroideas y de diversos péptidos (Edson et al. 2014). En esta etapa las CG mantienen una proliferación continua y adquieren la capacidad de expresar receptores para la hormona folículo estimulante (RFSH), mientras que las CT se diferencian y expresan el receptor de la hormona luteinizante (RLH). El desarrollo folicular en esta etapa depende de las gonadotropinas, FSH y LH. La mayoría de los folículos antrales sufrirán atresia (proceso de selección), mientras que la dominancia será liderada generalmente por sólo uno de ellos, transformándose posteriormente en el folículo pre-ovulatorio (Rimon-Dahari N. 2016).

Elevados niveles de FSH inducen la expresión y actividad de la enzima citocromo P450 aromatasa en las CG aumentando la síntesis de E2 y el crecimiento folicular. Las CG de estos folículos antrales expresan gran número de RLH que son dependientes de FSH y E2. Simultáneamente se produce el alza preovulatoria de FSH y LH, que activa una secuencia de eventos que culminan en la ovulación del folículo dominante (Johnson et al. 1997). Estos eventos incluyen la reanudación meiótica del ovocito, la expansión del cúmulo, la ruptura folicular y la liberación del complejo cúmulo-ovocito.

Una vez que se libera el ovocito, las CG y las CT restantes experimentan la diferenciación a células lúteas para la formación del cuerpo lúteo (CL). El CL produce elevados niveles de P y E2, esenciales para mantener el embarazo, si este no ocurre se produce la regresión del CL (Papkoff and Ekblad 1970).

El alza de LH en fase preovulatoria es un evento clave asociado al proceso de ovulación. En esta etapa del ciclo ovárico, también ocurre un alza de FSH la cual ha recibido escasa importancia. FSH es una glicoproteína heterodimérica secretada por la adenohipófisis cuyo peso molecular es de 37,3 kDa y está compuesta por dos subunidades: una alfa, que es estructuralmente similar a la LH y una beta, responsable de la actividad biológica específica (Papkoff and Ekblad 1970). FSH se une y activa al RFSH, el cual pertenece a la familia de receptores acoplados a proteína G (Simoni, Gromoll, and Nieschlag 1997) y está ubicado en la membrana externa de las CG. La vía canónica de señalización de FSH, G $\alpha$ s/AMPC/PKA, ha sido considerada por décadas el mecanismo clave de su acción biológica (Dattatreyamurty, Figgs, and Reichert Jr. 1987). Además, se ha documentado que el RFSH también puede señalizar a través de otras vías como MAPK, PKC, y la activación de la vía PI3K que conduce a la activación de AKT (Yamashita et al. 2014). La principal función de FSH es estimular el desarrollo folicular.

La acción de FSH sobre las CG induce una gran cantidad de factores de transcripción y kinasas involucradas en la proliferación y supervivencia celular (Wayne et al. 2007). FSH regula la expresión y actividad de componentes de la maquinaria esteroideogénica principalmente a través de la vía PKA/CREB en células del cúmulo de bovino y a través de la vía MAPK/ERK en CG humanas (Casarini et al. 2015). Además, FSH a través de la vía MAPK/ERK, regula la angiogénesis e induce el aumento de la producción de

VEGF en CG humanas (Kawano et al. 2012). Se ha documentado que la vía PKC/MARCKS está relacionada con la ruptura folicular y luteinización de CG porcinas (Yamashita et al. 2014). Por otro lado la vía PI3K/AKT, estimulada por FSH, regula la transcripción de los genes de la proliferación en CG de rata (Y. Han, Xia, and Tsang 2013). Estos hallazgos asociados al incremento plasmático de la FSH sugieren un rol fisiológico de esta hormona concomitante al alza de LH pre-ovulatoria.

#### **4.2. Esteroidogénesis**

Durante el ciclo ovárico, la secreción de hormonas esteroidales está predeterminada por el patrón pulsátil de secreción de las gonadotrofinas LH y FSH. En respuesta a LH, las CT sintetizan andrógenos que son convertidos a E2 en las CG por la acción de la enzima citocromo P450 aromatasa, la que es inducida y activada por FSH. La coordinación funcional bi-celular entre CT y CG permite la producción de E2 y el crecimiento folicular (Devoto et al. 2009). Por otro lado, la P es una hormona esteroidea sintetizada por el ovario cuya secreción depende de los niveles de gonadotropinas y del estado fisiológico del ovario. La P se sintetiza a partir de pregnenolona por acción de la enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD) la cual se expresa en las células de la corteza adrenal, CT interna y CG del ovario (Hunzicker-Dunn et al. 2012). Se ha documentado que la P inhibe la proliferación y la diferenciación de las CG humanas *in vitro* (Chaffkin et al.1993). Otros antecedentes muestran que la P inhibe la actividad de la enzima aromatasa en CG de rata *in vitro*, por lo que disminuye la secreción de E2 (Fortune and Vincent 1983). Resultados de nuestro laboratorio indican que FSH regula

la expresión del receptor de P a través de las vías PKA, MARCKS y PKC modulando en parte la ruptura folicular, participando en la expresión de metaloproteasas (Henríquez et al. 2017).

### **4.3. Angiogénesis**

La angiogénesis es el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de la proliferación de las células endoteliales y el crecimiento de vasos sanguíneos pre-existentes. Este proceso es regulado por la interacción de factores de crecimiento (pro-angiogénicos y anti-angiogénicos) y está asociado con cambios en la matriz extracelular. La angiogénesis es importante para la foliculogénesis ovárica, ruptura folicular, formación del cuerpo lúteo y desarrollo endometrial. La pre-existencia de células endoteliales sobre la capa de células externas del folículo, las CT, forman una red vascular. El factor pro-angiogénico mas estudiado es el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), el cual es producido y secretado principalmente por las CG y CT del ovario, cuya principal función es incrementar la permeabilidad vascular y la angiogénesis, procesos importantes para el desarrollo folicular y la oxigenación del ovocito (Tamanini and De Ambrogi 2004). VEGF es un potente mitógeno para las células endoteliales y su acción esta mediada por los receptores tirosina quinasa VEGFR-1 y VEGF-2 (Tal, Seifer, and Arici 2015). Estudios han demostrado que el aumento de la secreción de VEGF, por las CG, está regulado preferentemente por LH (Herr et al. 2013). Se ha descrito que FSH aumenta la secreción de VEGF en CG, estimulando procesos pro-angiogénicos en células endoteliales tales como: la

formación de estructuras tipo tubo, migración celular, proliferación celular, inhibición de la apoptosis y el aumento de la producción de óxido nítrico (Stilley et al. 2014).

#### **4.4. Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP)**

##### **4.4.1. Definición del SOP**

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es una endocrinopatología común que afecta a un 5-10% de las mujeres en edad fértil asociándose a una disfunción ovulatoria lo cual compromete la fertilidad (Bacallao et al. 2016). Las principales características de esta patología son: i) exceso en la producción de andrógenos, lo que lleva a una oligo-anovulación crónica, asociado generalmente con hiperinsulinemia y alteraciones en la secreción pulsátil de gonadotrofinas; ii) sangrado menstrual irregular o ausente; y iii) fenotipo de ovarios poliquístico al ultrasonido (Azziz 2006). La oligo-anovulación crónica se produce debido a un desarrollo folicular anormal, que se debe a un arresto de los folículos antrales. El mecanismo responsable del arresto folicular permanece desconocido, sin embargo, se ha observado que la respuesta ovárica a terapia con gonadotrofinas, particularmente FSH, tiene como resultado el desarrollo folicular, esto sugiere una inadecuada estimulación de FSH en el SOP , posiblemente debido a los bajos niveles de FSH plasmáticos (Chang and Cook-Andersen 2013).



#### **4.4.2. Criterios clínicos - ecográficos y bioquímicos en diagnóstico del SOP**

Los criterios para el diagnóstico del SOP son: 1) Criterio de National Institutes of Health/National Institute of Child Health and Human Disease (NIH) de 1990, 2) Criterio de European Society for Human Reproduction and Embryology/American Society for Reproductive Medicine (ESHRE/ASRM) en Rotterdam de 2004 y 3) Criterio de Androgen Excess Society (AES) de 2006-2009.

El primer criterio NIH considera la presencia de anovulación crónica más un hiperandrogenismo clínico o bioquímico; el segundo criterio de Rotterdam, considera las mismas características del criterio de NIH, pero además incluye la disfunción menstrual: tales como oligomenorrea ovulatoria y perfil ecográfico de ovarios poliquísticos, sin embargo, se requieren la presencia de dos o más de estas características para el diagnóstico (Norman et al. 2007); finalmente, el tercer criterio de AES da importancia al hiperandrogenismo clínico y/o bioquímico, más que al fenotipo ultrasonográfico de ovario poliquístico y la disfunción ovárica (Goodman et al. 2015).

#### **4.4.3. Esteroidogénesis en el SOP**

Se han documentado reducidos niveles de E2 en CG porcinas y líneas celulares de granulosa humanas incubadas en un ambiente con altos niveles de andrógenos e insulina comparado con CG cultivadas en un ambiente normal (Salih et al. 2008). Otros estudios in vitro en CG de mujeres SOP demostraron una reducida expresión de la

enzima P450 aromatasa, la cual metaboliza testosterona a E2, lo que también conduciría a la disminución de E2 (Yang et al. 2015).

Además, se ha descrito una reducción en los niveles P tanto en CG en cultivo como en suero (S. Huang et al. 2016; Arduc et al. 2015), sugiriendo una alteración de la capacidad esteroideogénica debido a la reducida expresión de la proteína StAR en CG humanas (Maruthini et al. 2014; Doldi et al. 1998).

#### **4.4.4. Hiperandrogenismo e hiperinsulinismo en el SOP**

El hiperandrogenismo es la principal característica para el diagnóstico del SOP, cuya prevalencia es entre 70-80% (R. Huang et al. 2015; Baptiste et al. 2010), se trata de un estado causado por un exceso en la secreción de andrógenos, alcanzando niveles mayores a 60 ng/dL en el plasma (Goodman et al. 2015), cuyas manifestaciones clínicas usuales son acné, hirsutismo o alopecia frontal.

Por otro lado existen alteraciones metabólicas en el SOP tales como la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia, que si bien no son considerados dentro de los criterios diagnóstico del SOP, tienen una prevalencia del 64% en estas pacientes (DeUgarte, Bartolucci, and Azziz 2005). La resistencia a la insulina es una condición en la cual el músculo, tejido adiposo y las células del hígado son menos sensibles a los efectos metabólicos de la insulina. Las acciones fisiológicas de la insulina están inhibidas, en presencia de insulino resistencia, las células beta pancreáticas en un intento de compensar la captación de glucosa, incrementan la secreción de insulina (mayor a 20  $\mu$ UI/mL) (Esteban B. 2000).

Estudios demuestran que niveles elevados de andrógenos están relacionados con el aumento de la secreción de insulina, anormalidad en la fosforilación del receptor de insulina y disminución de la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) (Baillargeon and Nestler 2006; Baptiste et al. 2010).

#### **4.4.5. Foliculogénesis en el SOP**

La disfunción folicular en mujeres con SOP se caracteriza por: aumento del número de folículos preantrales y arresto folicular en folículos de 5 a 10 mm. Se han observado modificaciones en las CT las cuales contribuyen al aumento en la producción de andrógenos, lo que se asocia con una morfología anormal del ovario; además, se ha demostrado que en primates, la administración de dosis altas de testosterona aumentan el tamaño del ovario producto del aumento de desarrollo de folículos antrales y pre-antrales (Vendola et al. 1998).

Por otro lado, la hormona antimulleriana (AMH), es un péptido producido por las CG de folículos antrales pequeños y folículos pre-antrales en crecimiento, cuya función es regular negativamente el desarrollo del folículo, disminuir la expresión del mRNA del receptor de FSH y la expresión de la enzima aromatasa (Dewailly et al. 2016). En ovarios SOP, la hipersecreción de AMH, esta dada por la acumulación de folículos antrales, lo que conduciría a una menor respuesta a la FSH (Catteau-Jonard et al. 2008). Además se ha descrito que el exceso de AMH disminuye la acción de FSH a través de la inhibición de la enzima p450 aromatasa disminuyendo la aromatización de los andrógenos aumentando la secreción de andrógenos. Otros factores que estimulan

la hipersecreción de andrógenos, en las CT, son los altos niveles de insulina y la hipersecreción de LH (Azziz et al. 2016).

En ciclos de estimulación ovárica de pacientes SOP, se ha descrito que el aumento de los andrógenos contribuye al incremento en la expresión del receptor de FSH, determinando un aumento de la sensibilidad a FSH (Homburg 2009), también se ha observado en estas pacientes una sobreexpresión del receptor de LH/hCG en CG (Kanamarlapudi, Gordon, and López 2016).

#### **4.4.6. Angiogénesis en el SOP**

En el estroma ovárico de mujeres SOP se ha observado un incremento en el flujo sanguíneo determinado mediante Doppler, comparado con el control (Delgado-Rosas et al. 2009). Se ha observado también niveles altos de VEGF, tanto en suero como en fluido folicular durante la inducción de la ovulación en estas pacientes, junto con una fuerte inmunodetección de VEGF en el estroma ovárico y las CT (Tal et al. 2013). Este incremento en la vascularización podría conducir a un crecimiento anormal de las CT interna, alterando la síntesis y secreción de andrógenos (Peitsidis and Agrawal 2010). Así mismo se ha observado que en CG de ratón tratadas con testosterona hay un aumento en los niveles de VEGF (Zhang et al. 2016). Otras investigaciones muestran que la secreción de VEGF, por CG de pacientes SOP en cultivo, es dependiente de gonadotropinas (hCG, LH y FSH) y es incrementada por insulina (Peitsidis and Agrawal 2010).

En contraste, otros estudios observaron una vascularización reducida en la periferia de los folículos de mujeres SOP, esta restricción en el flujo sanguíneo podría favorecer al arresto folicular característico de estas pacientes (Järvelä et al. 2004).

#### **4.5. Vías de señalización de FSH en SOP**

La vía de señalización MAPK juega un importante rol en la patogénesis del SOP; análisis de microarreglos de DNA, muestran que la fosforilación de ERK1/2 esta disminuida en CG de pacientes con SOP (Lan et al. 2015). Existe información que las vías de señalización dependientes de FSH, modulan los procesos de esteroidogénesis y angiogénesis en CG humanas.

En resumen, este estudio contribuiría a mejorar la comprensión de la fisiopatología del SOP, lo que podría deberse a una alteración en las vías de señalización intracelular dependientes de FSH. Una ineficiente respuesta a FSH podría explicar el arresto folicular, el aumento en los niveles de andrógenos y la alteración en la vascularización del folículo ovárico, lo que en conjunto contribuirían al desarrollo del SOP.

## **5. HIPÓTESIS**

FSH activa las vías de señalización PKA, MAPK, PI3K y PKC modulando la esteroidogénesis y el potencial angiogénico en células de la granulosa luteinizadas humanas. El efecto estimulador de FSH sobre las vías de señalización está desregulado en las células de la granulosa luteinizadas cultivadas en condiciones hiperinsulínicas e hiperandrogénicas, disminuyendo la esteroidogénesis y aumentando la angiogénesis.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1. Objetivo general**

Determinar las vías de señalización por las cuales FSH regula la esteroidogénesis y el potencial angiogénico en células de la granulosa luteinizadas humanas cultivadas en condiciones hiperinsulínicas/hiperandrogénicas comparado con la condición control.

### **6.2. Objetivos específicos**

1. Evaluar la activación de las vías de señalización PKA, MAPK, PI3K y PKC estimuladas por FSH en CG cultivadas en medio I+T y medio control.
2. Determinar el efecto de FSH sobre la secreción de Progesterona y Estradiol en CG cultivadas en medio I+T y medio control.
3. Evaluar el efecto de FSH sobre el potencial angiogénico y los niveles de VEGF en CG cultivadas en medio I+T y medio control.
4. Determinar la participación de las vías de señalización PKA, MAPK, PI3K y PKC activadas por FSH en la esteroidogénesis y angiogénesis de CG luteinizadas humanas, mediante inhibidores específicos de cada vía.

## **7. MATERIAL Y MÉTODOS**

Este trabajo se desarrolló en el marco del proyecto “Metabolitos de los estrógenos y su importancia en la fisiología y fisiopatología ovárica humana. Implicaciones clínicas en el síndrome de ovario poliquístico” (Fondecyt N° 1140693), realizado en el Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

### **7.1. Incorporación de pacientes y obtención de la muestra**

Las células de la granulosa luteinizadas humanas se obtuvieron de folículos pre-ovulatorios de mujeres sanas (n=16) que participan en el Programa de Fertilización *in vitro* (FIV) del Instituto de Investigaciones Materno Infantil debido a infertilidad por factor masculino, quienes fueron invitadas a colaborar en este estudio de forma voluntaria, previa firma de un consentimiento informado (Anexo 11.1). El tratamiento estándar de inducción de ovulación incluye FSHr-HMG, antagonista de GnRH y hCG. La aspiración folicular se realizó 36 horas post administración de hCG. La obtención de las CG no implica un procedimiento adicional, habitualmente estas células son desechadas sin ser analizadas.

Criterios de inclusión: mujeres sanas, con edades comprendidas entre 25 y 38 años, que participaron en nuestro programa de FIV debido a infertilidad por factor masculino.

Criterios de exclusión: diabetes, resistencia a la insulina y/o endometriosis.



Adicionalmente, se realizaron cultivos de CG provenientes de pacientes SOP con diagnóstico de hiperandrogenismo e hiperinsulinismo como control del medio de cultivo I+T.

## **7.2. Cultivo primario de CG en medio control.**

Se realizaron cultivos primarios de CG de cada muestra obtenida a partir de aspiraciones foliculares según el protocolo utilizado previamente en estudios in vitro (Olivero et al. 2008). El aspirado folicular se centrifugo a 1800 rpm por 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue tratado con Verseno (EDTA 1 mM en PBS) para disgregar las células. Posteriormente el pellet se resuspendió en medio de cultivo básico (medio M199 que contiene NaHCO<sub>3</sub> 26 mmol/L, HEPES 25 mmol/L, penicilina 50 U/mL, BSA 0,1% wt/vol, sin rojo fenol, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) para realizar la gradiente de Histopaque (Sigma-Aldrich, polisacarosa y diatrizoato de sodio ajustado a una densidad de 1,077 g/ML) con la finalidad de separar los glóbulos rojos de la muestra. La columna se centrifugó a 1800 rpm por 30 minutos a 4°C. Una vez finalizada la columna, delicadamente se aspiró la interface, que contenía las células de la granulosa. Estas células fueron lavadas en medio básico y pre-plaqueadas en medio de crecimiento (medio básico suplementado con suero fetal bovino 10%) por 30 minutos para eliminar los macrófagos y fibroblastos. Las células, se cuantificaron en la cámara de Neubauer y se evaluó la viabilidad celular mediante el método de exclusión con Azul Tripán. Para cada experimento se sembraron aproximadamente de 100 mil a 200 mil células por pocillo en medio de crecimiento durante 72 horas a 37°C bajo

atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> con el objetivo de que las células se adhirieran a la placa de cultivo, seguido de 24 horas en medio básico (medio libre de suero fetal bovino). Posteriormente se realizaron los estímulos con las gonadotrofinas de acuerdo al diseño experimental.

### **7.3. Cultivo primario de CG en medio I+T**

Se realizaron cultivos primarios de CG con medios de cultivo suplementados con insulina (20 nM, Insulin human – recombinant, Sigma-Aldrich) y testosterona (20 nM, Testosterone-DEA Schedule III, Sigma-Aldrich), para simular las condiciones hiperinsulínicas e hiperandrogénicas de un ambiente tipo SOP. Las células se cultivaron en medio de crecimiento I+T desde el inicio del cultivo.

Las concentraciones de insulina y testosterona utilizadas en este estudio fueron obtenidas desde la literatura (Wu et al. 2003; Rice et al. 2005; Salih et al. 2008). Se evaluó la viabilidad celular mediante ensayos de MTS (The CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega Corp, Wisconsin, USA) con diferentes dosis de insulina (0,08; 0,4; 4; 20 y 40 nM) y testosterona (1, 10, 25, 100 nM y 1 uM) a fin de determinar que las concentraciones utilizadas no afectaran la viabilidad celular (Anexo 11.2).

#### **7.4. Análisis de las vías de señalización activadas por FSH**

Las CG cultivadas en medio control y medio I+T, fueron estimuladas con FSH (10 IU/ml, GONAL-f: Merck-Serono) por tiempos cortos: 5, 15 y 30 minutos, para evaluar las vías de señalización activadas por FSH, a través de la detección de la fosforilación de los factores de transcripción CREB, ERK1/2, AKT y MARCKS de las vías de señalización PKA, MAPK, PI3K y PKC respectivamente, mediante Western blot de extractos proteicos de CG.

Luego de la estimulación de las CG se realizó la extracción de proteínas en frío en presencia de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Fluoruro de fenilmetilsulfonilo Fluoruro de sodio y Ortovanadato sódico) luego se cuantificaron las proteínas mediante el método de Bradford: (Bio-Rad Lab. Inc., California, EE. UU). Se separaron por electroforesis 10 ug de proteína total en geles PAGE-SDS 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Estas membranas fueron bloqueadas con BSA 5 % en T-TBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, Tween 20 mM 0,01 %) durante 1 hora y se incubaron toda la noche a 4°C con anticuerpos primarios: (1) anti-fosfo o total ERK1/2 (anticuerpo policlonal Mouse, Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA, dilución 1:2000); (2) anti-fosfo o total AKT (anticuerpo policlonal Rabbit, Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA, dilución 1:3000); (3) anti-fosfo o total CREB (anticuerpo policlonal Rabbit, Cell Signaling Technology, dilución 1:2000); (4) anti-fosfo o total MARCKS (anticuerpo policlonal Rabbit, Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA, dilución 1:3000).

Los productos de la inmunoreacción se detectaron utilizando un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano. El sistema de detección de quimioluminiscencia

(ECL Western Blot reactivos) se visualizó usando el lector de imágenes Ultra Quant 6.2. El análisis densitométrico de las bandas inmunorreactivas se realizó con el software Image Quant 5.2 (Molecular Dynamics Inc., Sunnyvale, CA) y fue normalizado en unidades arbitrarias de proteína fosforilada / proteína total.

### **7.5. Efecto de FSH sobre la esteroidogénesis y la angiogénesis**

La evaluación del efecto de FSH sobre la secreción de P, E2, VEGF y el potencial angiogénico, se llevó a cabo en CG cultivadas en medio control y medio I+T en presencia de FSH (10 UI, FSH recombinante Gonol-F: Merck-Serono) o hCG (10 UI, Gonacor, Ferring) durante 24 horas. Posteriormente los medios condicionados de CG fueron almacenados a -20°C.

#### **7.5.1. Determinación de la participación de las vías activadas por FSH involucradas en la esteroidogénesis y la angiogénesis.**

Para evaluar si las vías de señalización PKA, MAPK, PI3K y PKC, activadas por FSH, participan en la regulación de la esteroidogénesis y la angiogénesis, las CG fueron cultivadas en medio control en presencia de inhibidores específicos de las vías de señalización: H89 (10µM) inhibidor de PKA, UO126 (10 µM) inhibidor de ERK1/2, LY294002 (20µM) inhibidor de PI3K, y BIM (2,5µM) inhibidor de PKC (Calbiochem, Merk milipore, Darmstadt, Germany).

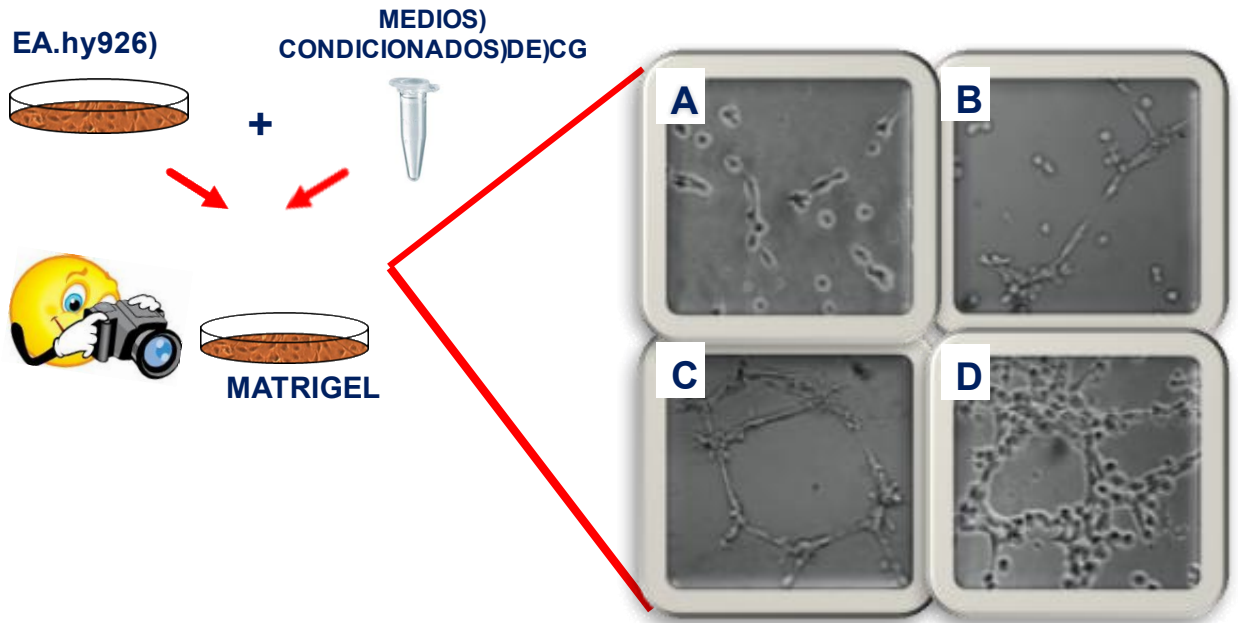
Las CG fueron pre-incubadas por 20 minutos con los inhibidores y luego fueron estimuladas con FSH o hCG durante 24 horas, posteriormente se obtuvieron los medios condicionados de las células, los cuales fueron utilizados para: determinar la secreción de P, determinar los niveles de VEGF y evaluar el potencial angiogénico. Las concentraciones de inhibidores fueron seleccionados basados en curvas dosis-respuesta de estudios previos (Kong et al. 2005; García et al. 2012).

#### **7.5.2. Determinación de progesterona (P) y estradiol (E2)**

La determinación de P y E2 se realizó por duplicado, en medios condicionados provenientes de CG cultivadas en medio control y medio I+T en presencia de las gonadotrofinas e inhibidores, mediante Radioinmunoensayo (RIA) específicos desarrollados en el laboratorio (Devoto et al. 1995). El coeficiente de variación inter-ensayo para P fue de 6,7% y para E2 fue de 8%.

### **7.5.3. Análisis del Potencial Angiogénico**

El potencial angiogénico fue determinado en medios condicionados obtenidos de CG cultivadas en presencia de FSH o hCG durante 24 horas. Las células EA.hy926, provenientes de una hibridación entre células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) y una línea celular de cáncer pulmonar humano (A549/8). Se incubaron 40.000 células EA.hy926 sobre una matriz de matrigel (Corning Matrigel Matrix, Life Sciences, USA) en presencia de 500 uL de medios condicionados. Se realizaron incubaciones entre 3-6 horas a 37°C hasta que las células EA.hy926 formaron diferentes estructuras de conexión y migración (figura N°1). Las células endoteliales EA.hy926 fueron periódicamente fotografiadas (Cámara: Mini VID USB, LW Scientific) y analizadas utilizando un microscopio de fase invertida (Lab-tec), 10 imágenes representativas por pocillo fueron analizadas y transferidos a un computador para el análisis de las imágenes mediante la siguiente fórmula (Aranda and Owen 2009):



Índice Angiogénico por campo:

$\frac{(\text{N}^\circ \text{ de c\u00e9ls. en "sprouting"} * 1) + (\text{N}^\circ \text{ de c\u00e9ls. unidas} * 2) + (\text{N}^\circ \text{ pol\u00edgonos} * 3)}{\text{N}^\circ \text{ c\u00e9lulas totales}} + 1(2-3 \text{ c\u00e9ls.}) \text{ \u00f3 } + 2(3 \text{ \u00f3 } + \text{ c\u00e9ls.})$
---

**Figura N\u00b01: Evaluaci\u00f3n del \u00edndice de potencial angiog\u00e9nico en base a f\u00f3rmula:**

Las im\u00e1genes representan c\u00e9lulas endoteliales EAHy926 sobre una matriz de matrigel. El panel A caracteriza c\u00e9lulas en brote "sprouting", panel B caracteriza c\u00e9lulas unidas, panel C caracteriza c\u00e9lulas endoteliales que forman estructuras tipo capilares (pol\u00edgonos) y el panel D caracteriza pol\u00edgonos rodeado de varias capas de c\u00e9lulas.

#### **7.5.4. Cuantificación de los niveles de VEGF**

El factor de crecimiento endotelial vascular, isoforma VEGF165, se determinó en duplicado directamente en 200 uL de medios condicionados de CG cultivadas en medio control y medio I+T con los estímulos ya mencionados. Los niveles de VEGF se cuantificaron mediante ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, R & D Systems, Inc) según el protocolo del fabricante. Este ensayo utilizó anticuerpos monoclonales. La concentración se determinó a una absorbancia de 450 nm. El coeficiente de variación intra-ensayo fue 2.4%-10.2%; el coeficiente de variación inter-ensayo fue 5.1%-8,7%.

#### **7.6. Análisis estadístico**

El análisis estadístico fue realizado con el análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del Test de comparación múltiple no paramétrico Bonferroni's mediante el software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego CA). La significancia se definió como  $P < 0,05$ . Los datos fueron presentados como promedio  $\pm$  SEM (error estándar de la media).

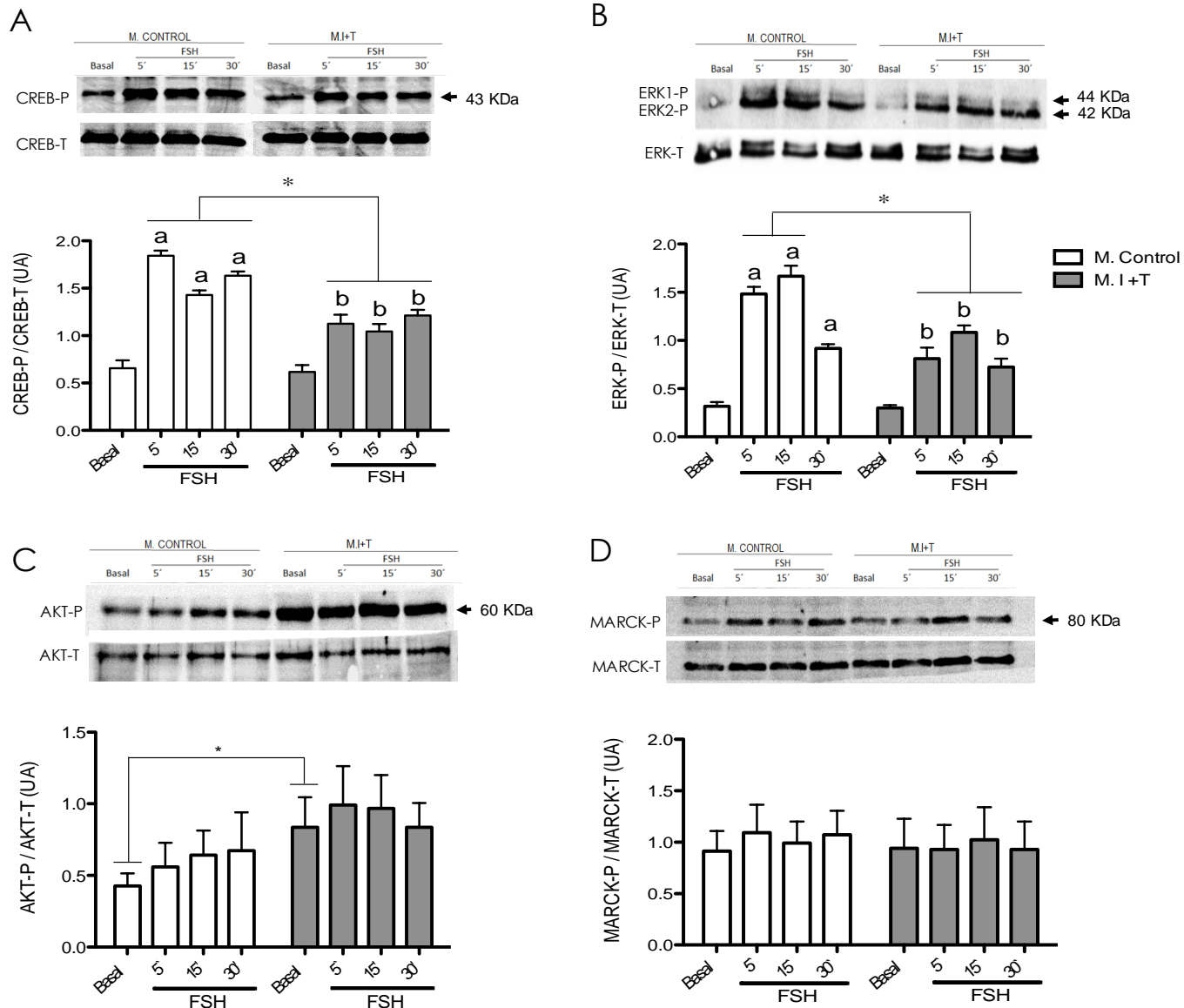
El número de participantes necesarios para este estudio fue calculado con un nivel  $\alpha$  del 5% y  $\beta$  del 20% de poder estadístico y considerando una desviación estándar de 0,20 unidades.



## 8. RESULTADOS

### 8.1. Efecto de FSH sobre las vías de señalización PKA/CREB, MAPK/ERK1/2, PI3K/AKT y PKC/MARCKS, en CG cultivadas en medio control y medio I + T.

FSH estimula diferentes vías de señalización intracelular, que pueden ser afectadas en condiciones patológicas como es el caso del SOP, donde el exceso de andrógenos e insulina podrían influir en la señalización de FSH. En la figura N°2 panel A y B se observó que FSH estimula en forma significativa las vías PKA y MAPK por el aumento en la fosforilación de CREB y ERK1/2, desde los 5 minutos de estimulación con FSH, tanto en medio control como en medio I+T ( $P<0,05$ ). Además, la fosforilación de CREB y ERK1/2 estimulada por FSH disminuye significativamente en medio I + T comparado con el medio control ( $P<0,05$ ). Las vías de señalización PI3K y PCK no fueron estimuladas en forma significativa por FSH con respecto a su condición basal en ninguno de los medios de cultivo (figura N°2 panel C y D).

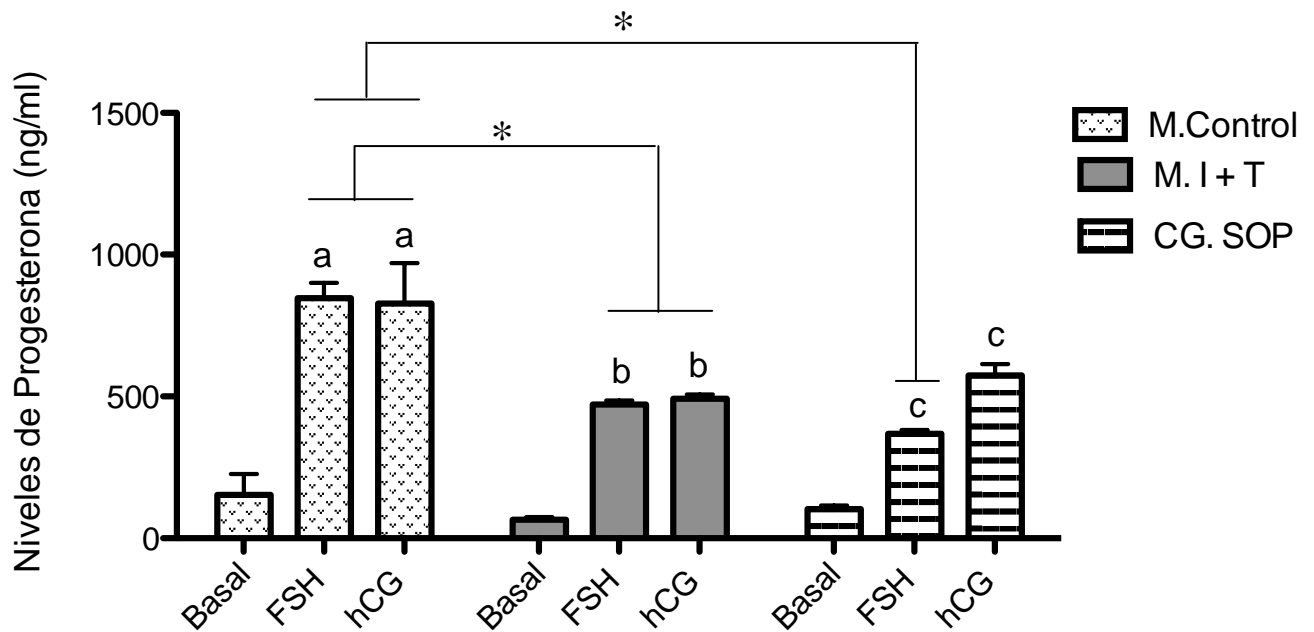


**Figura N°2: Efecto de FSH sobre las vías de señalización PKA/CREB, MAPK/ERK1/2, PI3K/AKT y PKC/MARCKS, en CG cultivadas en medio control y medio I + T.** Western blot representativo de los niveles de CREB, ERK, AKT y MARCKS, isoforma fosforilada y total, realizados a partir de extractos proteicos de CG estimuladas con FSH 10 UI, (5, 15 y 30 minutos). Los gráficos representan el análisis densitométrico, expresado en unidades arbitrarias (UA). A-B) FSH estimula significativamente la fosforilación de CREB y ERK1/2 en ambos medios de cultivo respecto del basal  $P < 0,05$  a= respecto del basal del medio control, b= respecto del basal medio I+T. La fosforilación de CREB y ERK1/2 estimulada por FSH es significativamente menor en el medio I+T comparado con el medio control  $*P < 0,05$  (n=3). C-D) FSH no estimula la fosforilación de AKT y MARCKS en los medios de cultivo. Los valores están expresados en promedio  $\pm$  SEM. Test ANOVA, post test Bonferroni.

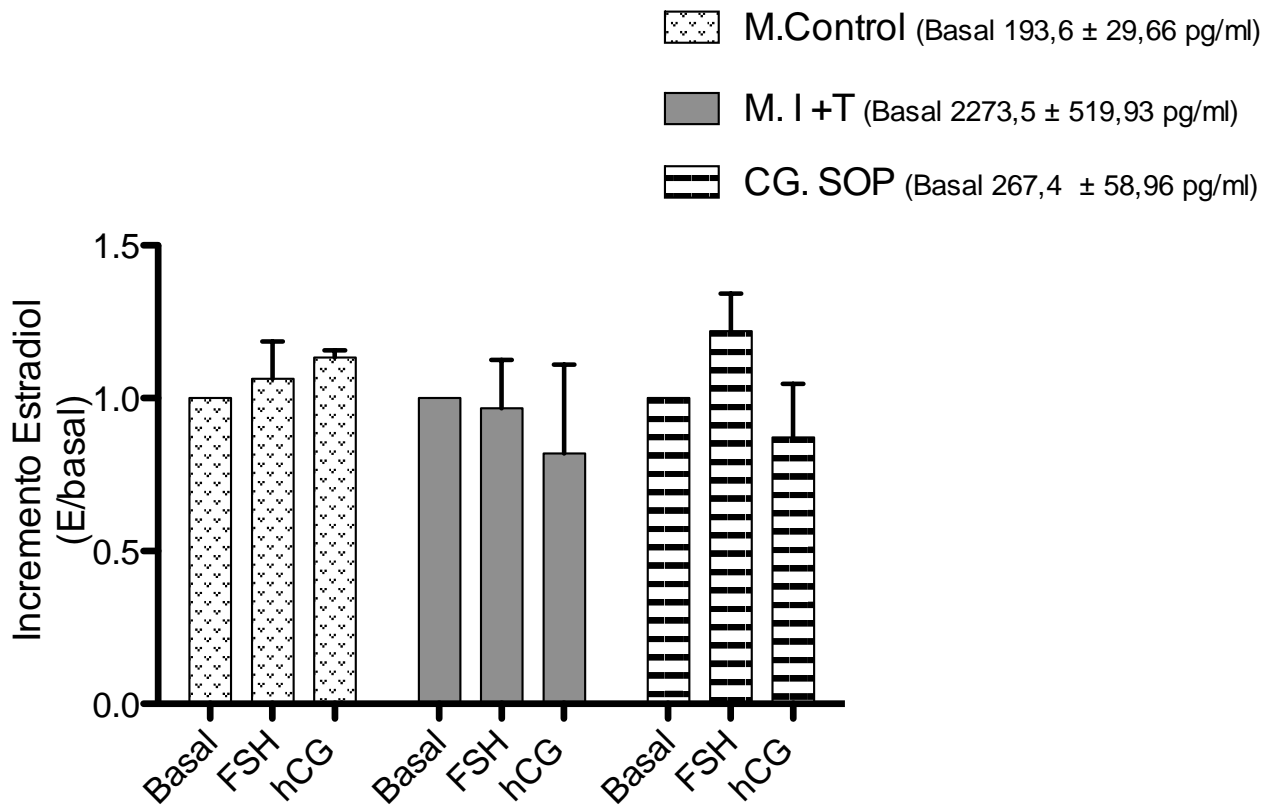
## **8.2. Efecto de FSH sobre la secreción de progesterona y estradiol en CG cultivadas en medio control y en medio I + T.**

Una vez analizadas las vías de señalización activadas por FSH en CG en presencia de un exceso de andrógenos e insulina, se determinó si este efecto se traduce en un cambio de actividad esteroideogénica de las CG. Con este propósito se evaluó el efecto de FSH y hCG sobre la secreción de P en medio control y medio I+T. En la figura N°3, se observa que FSH y hCG incrementan la secreción de P en los medios de cultivo control e I + T a las 24 horas respecto de la condición basal ( $P < 0.05$ ). El efecto estimulador de FSH y hCG sobre la producción de P fue menor en el medio I + T comparado con el medio control ( $P < 0,05$ ). Los niveles basales de P son similares entre los medios de cultivo control e I+T. Adicionalmente, como control del medio I + T, se utilizaron medios condicionados de CG provenientes de pacientes SOP, comportándose en forma similar al medio I + T. En CG SOP, FSH y hCG estimularon en forma significativa la secreción de P respecto a la condición basal.

La secreción de E2 (figura N°4) no fue estimulada en forma significativa por FSH y hCG, en los medios de cultivo control y medio I+T. Los niveles basales de E2 determinados en el medio I+T (2273,5 pg/mL) son significativamente mayores que en el medio control (193,6 pg/mL) y en pacientes SOP (267,4 pg/mL) ( $P < 0,05$ ). Este incremento de E2 se debe a la conversión de testosterona en E2 en el medio I+T.



**Figura N°3: Efecto de FSH sobre la secreción de progesterona (P) en CG cultivadas en medio control, medio I + T y en CG de mujeres SOP.** El gráfico representa los niveles de P en medios condicionados de CG basal y estimuladas con FSH o hCG (10 UI) durante 24 horas. La producción de P aumenta significativamente en presencia de FSH y hCG en los medios de cultivo control y medio I+T. En el medio I+T los niveles de P estimulados por las gonadotropinas son significativamente menores comparado con el medio control (n=5). La secreción de P de CG SOP aumenta en forma significativa en presencia de FSH y hCG con respecto a la condición basal y su respuesta es similar al medio I+T (n=3). \* $P < 0,05$  a= respecto al basal medio control; b= respecto al basal medio I+T; c=respecto al basal CG.SOP. Los valores están expresados en promedio  $\pm$  SEM, Test ANOVA, Post test Bonferroni.



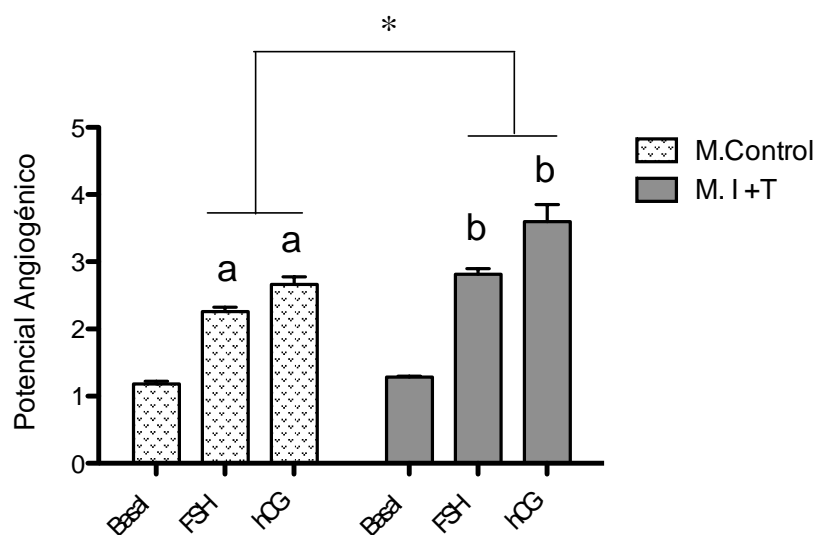
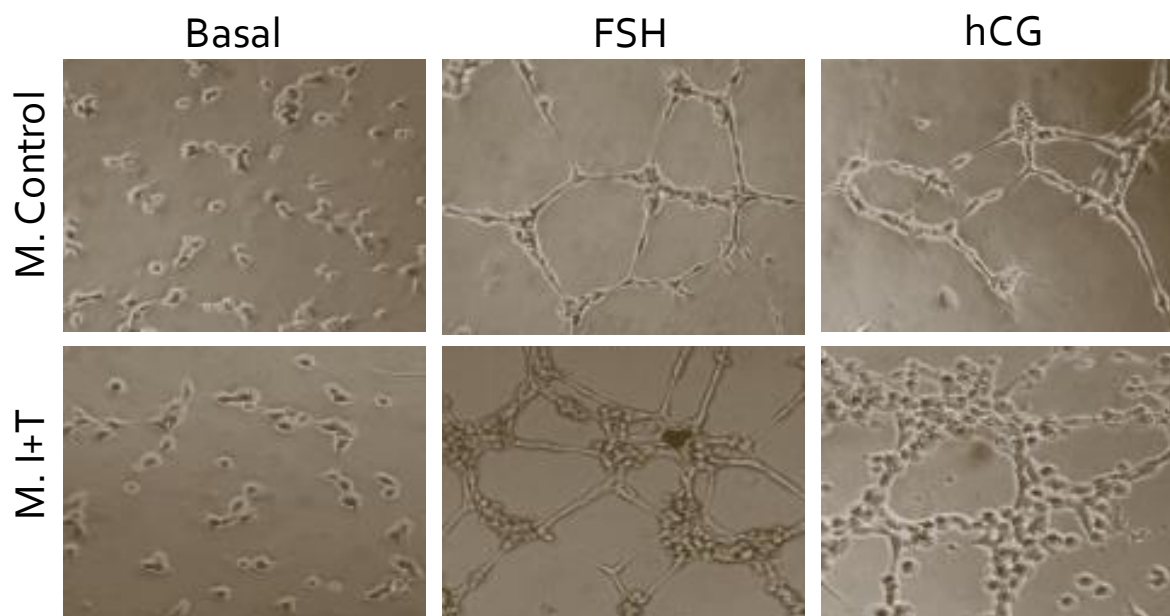
**Figura N°4: Efecto de FSH sobre la secreción de estradiol (E2) en CG cultivadas en medio control, medio I + T y en CG de mujeres SOP.** El gráfico representa el incremento de E2 (estímulo/basal) en medios condicionados de CG en estado basal y estimuladas con FSH o hCG (10 UI) durante 24 horas. FSH y hCG no estimulan en forma significativa la secreción de E2.  $P > 0.05$  (n=3), Test ANOVA.

### **8.3. Acción de FSH sobre el potencial angiogénico y los niveles de VEGF en CG cultivadas en medio control y en medio I + T.**

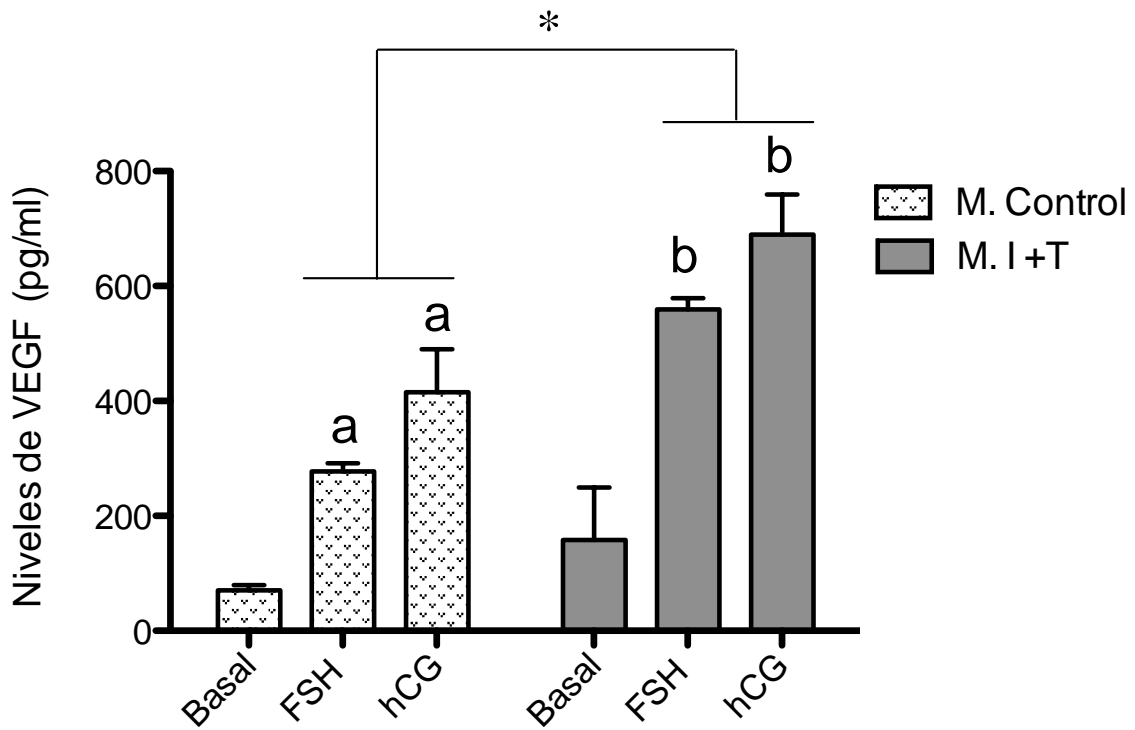
Se ha documentado un aumento de la angiogénesis ovárica en mujeres con SOP sometidas a protocolos de estimulación ovárica las cuales responden con mayor sensibilidad al tratamiento con gonadotrofinas exógenas (Tal et al. 2013). Basado en estos antecedentes se determinó el efecto de FSH sobre el potencial angiogénico de las CG en presencia de un exceso de testosterona e insulina.

En la figura N°5, se observó que FSH y hCG estimulan el potencial angiogénico de las CG en medio control y medio I + T, además, el potencial angiogénico aumentó significativamente en presencia de testosterona e insulina comparado con el medio control ( $P < 0.05$ ).

El principal factor de crecimiento que regula la angiogénesis ovárica es VEGF (Peitsidis and Agrawal 2010), por este motivo se determinó el efecto de FSH sobre la secreción de VEGF de CG en ambos medios de cultivo I + T y control. En la figura N°6 se observa que FSH y hCG incrementaron significativamente los niveles de VEGF165 en el medio control y en el medio I + T comparado con su condición basal ( $P < 0,05$ ). La secreción de VEGF estimulada por FSH y hCG es significativamente mayor en el medio I+T comparado con el medio control ( $P < 0,05$ ).



**Figura N°5: Efecto de FSH sobre el potencial angiogénico *in vitro* de CG en medio control y en medio I + T.** Las imágenes corresponden a fotografías representativas de un ensayo de angiogénesis *in vitro* de medios condicionados de CG cultivadas en condición basal y estimuladas con FSH 10 UI o hCG 10 UI durante 24 horas. El gráfico representa la cuantificación del potencial angiogénico. FSH y hCG estimulan significativamente el potencial angiogénico en ambos medios de cultivo con respecto al basal. El potencial angiogénico estimulado por las gonadotropinas es significativamente mayor en el medio I+T comparado con el medio control. \* $P < 0,05$  a= respecto al basal medio control, b= respecto al basal medio I+T; (n=3), Test ANOVA, post test Bonferroni.

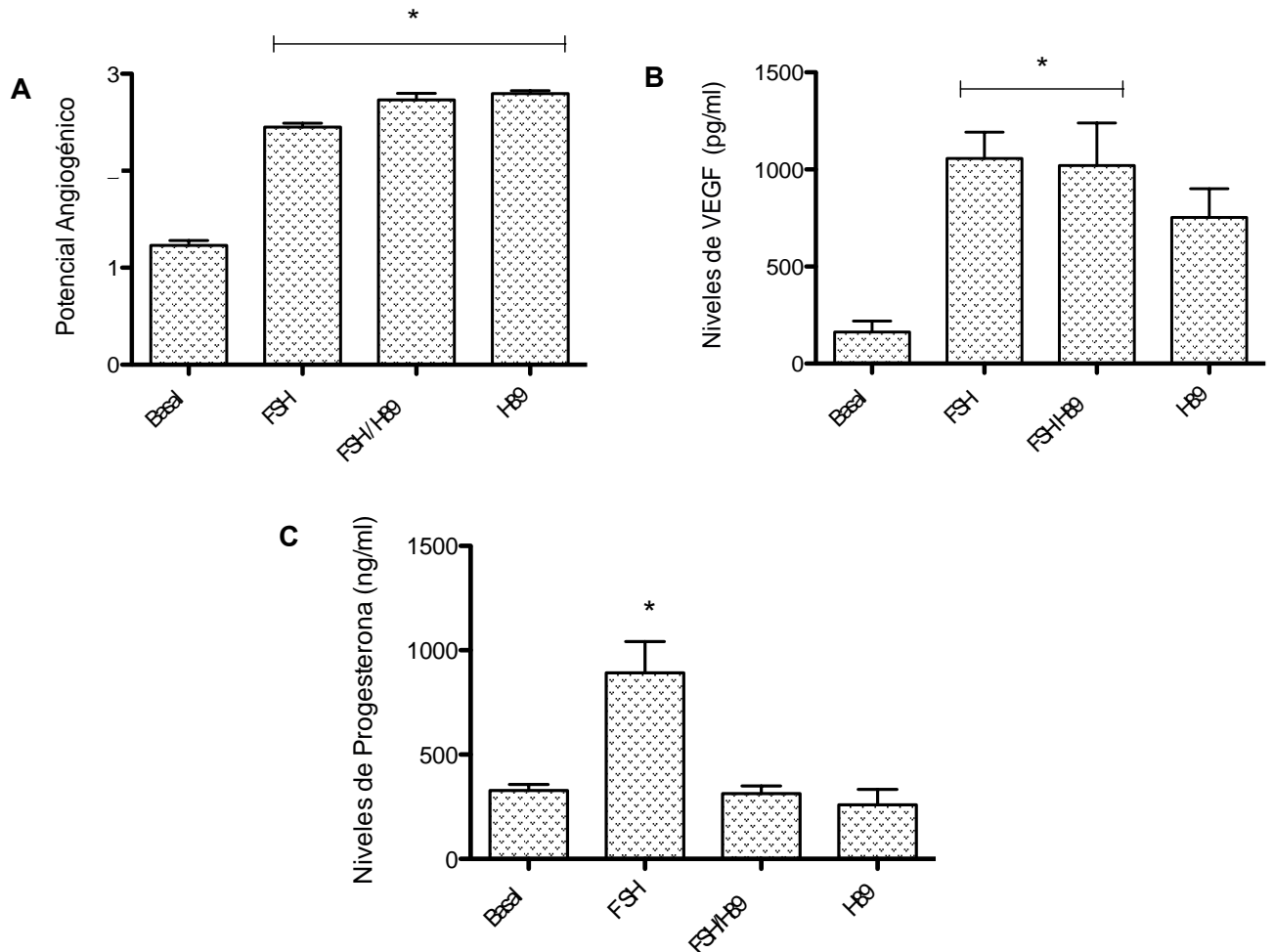


**Figura N°6: Estímulo de FSH sobre los niveles de VEGF de CG en medio control y medio I + T.** El gráfico representa los niveles de VEGF en medios condicionados de CG en estado basal y estimuladas con FSH (10 UI) o hCG (10 UI) durante 24 horas. FSH y hCG incrementan en forma significativa la secreción de VEGF en ambos medios de cultivo. El efecto de las gonadotropinas sobre la secreción de VEGF es significativamente mayor en el medio I+T comparado con el control. Diferencias significativas: a=respecto al basal medio control; b=respecto al basal medio I+T; M.Control y M.I+T (n=3) \*P <0,05 Test ANOVA, post test Bonferroni.



#### **8.4. Participación de la vía de señalización PKA/CREB, activada por FSH, sobre la angiogénesis y esteroidogénesis en CG luteinizadas humanas.**

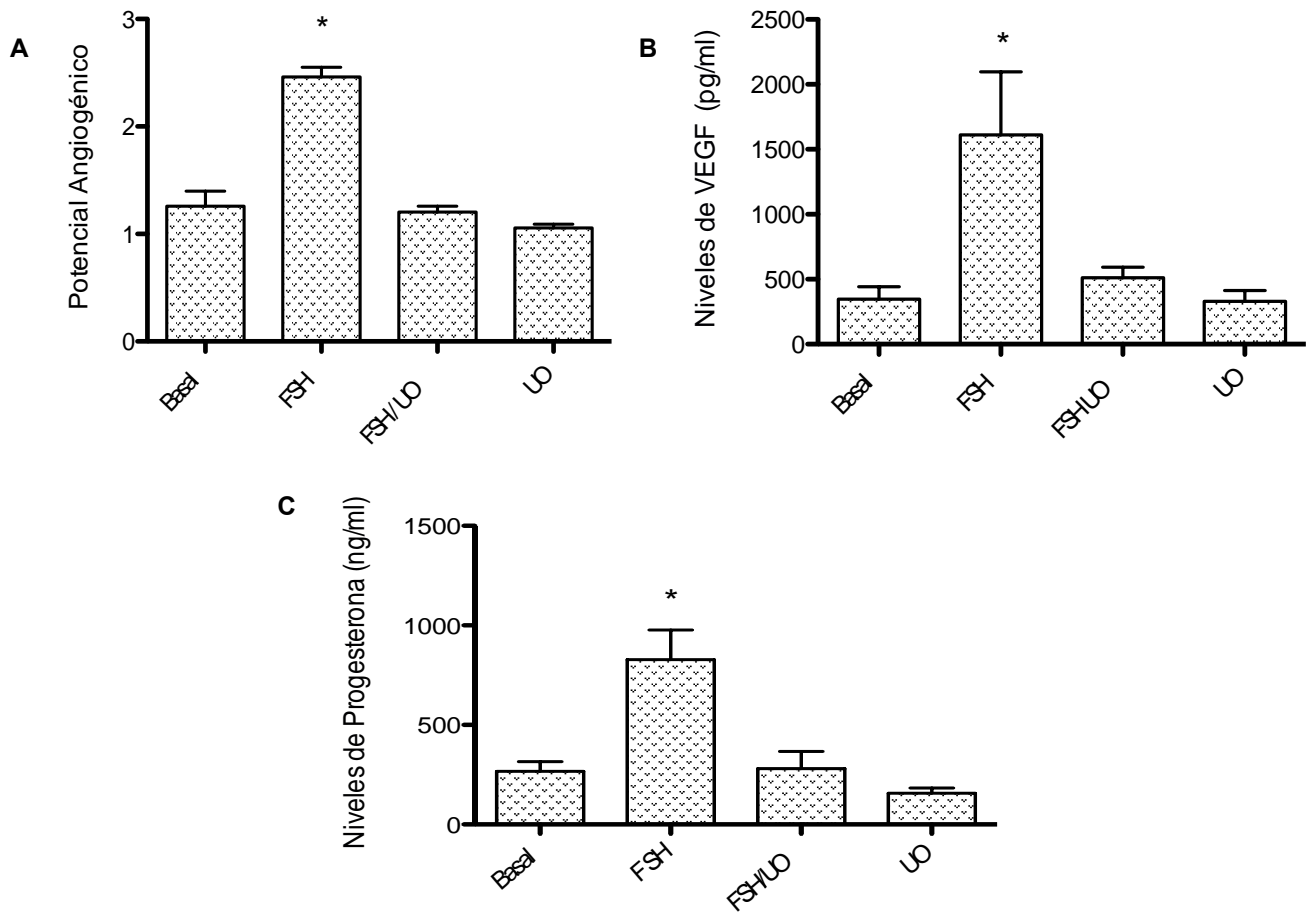
Se conoce que la vía de transducción de señales PKA/CREB es el mecanismo de acción de FSH más estudiado en las CG (Dattatreymurty, Figgs, and Reichert Jr. 1987). Dado estos antecedentes, en este trabajo se determinó si esta vía participa en la regulación del potencial angiogénico y los niveles de VEGF. La figura N°7 panel A, muestra que esta vía de señalización, no media el aumento del potencial angiogénico regulado por FSH, ya que el tratamiento con H89, inhibidor de PKA, no reduce el efecto estimulador de FSH. Un resultado similar se observa en los niveles de VEGF estimulados por FSH, los cuales no se modificaron en presencia de H89 (figura N°7 panel B). Por el contrario, y en relación a estudios que indican que FSH, a través de PKA/CREB, regula los genes que codifican para las enzimas que forman parte de la maquinaria esteroidogénica en CG de bovino (Khan et al. 2015). En la figura N°7 panel C, se observa que FSH incrementa los niveles de P mediado por la vía PKA, ya que en presencia de su inhibidor H89 se reduce el efecto estimulador de FSH.



**Figura N°7: Participación de la vía de señalización PKA/CREB activada por FSH sobre la angiogénesis y la esteroidogénesis en CG.** Los gráficos representan el potencial angiogénico (A), los niveles de VEGF (B) y los niveles de P (C) de los medios condicionados de CG en estado basal y tratadas con FSH (10UI) y H89 (inhibidor específico de la vía PKA) durante 24 horas. H89 reduce en forma significativa el efecto de FSH sobre la secreción de progesterona y no modifica el efecto estimulador de FSH sobre el potencial angiogénico y la secreción de VEGF. \* $P < 0,05$  (n=3), Test ANOVA, post test Bonferroni.

### **8.5. Vía de señalización MAPK/ERK, activada por FSH, sobre la angiogénesis y la esteroidogénesis en CG luteinizadas humanas.**

Se ha documentado que la vía de FSH, MAPK/ERK, regula la esteroidogénesis en CG de rata (Yu et al. 2005); además regula la producción de VEGF y los genes que codifican para la proliferación celular en CG humanas (Kawano et al. 2012). Se evaluó si la vía MAPK está involucrada en la regulación del potencial angiogénico, la secreción de VEGF y la secreción de P. Estos resultados indican que al inhibir la vía ERK con UO se redujo significativamente el potencial angiogénico, los niveles de VEGF y la secreción de P estimulados por FSH, figura N°8 panel A, B y C respectivamente.



**Figura N°8: Vía de señalización MAPK/ERK, activada por FSH, sobre la angiogénesis y la esteroidogénesis en CG.** Los gráficos representan el potencial angiogénico (A), los niveles de VEGF (B) y los niveles de progesterona (C) de medios condicionados de CG en estado basal y tratadas con FSH (10UI) y UO (inhibidor específico de la vía MAPK) durante 24 horas. UO reduce significativamente el efecto estimulador de FSH sobre el potencial angiogénico, la secreción de VEGF y la secreción de progesterona. \*P <0,05 (n=3), Test ANOVA, Post test Bonferroni.

## 9. DISCUSIÓN

La acción de la FSH es crítica en la proliferación celular, desarrollo fisiológico y diferenciación del folículo ovárico. Las vías de señalización intracelular activadas por FSH en las células de la granulosa humanas no están bien dilucidadas, por este motivo su estudio es importante tanto en fisiología ovárica como en el diseño de terapéuticas de inducción de ovulación en patologías anovulatoria como el SOP.

Diversos trabajos indican que un exceso de andrógenos e insulina, alteran las vías de señalización dependientes de FSH, afectando de esta manera los procesos de angiogénesis y esteroidogénesis. (Yang et al. 2015; Salih et al. 2008; Zhang et al. 2016; Agrawal et al. 2002). Los resultados obtenidos en esta investigación confirman antecedentes reportados en la literatura respecto del efecto de FSH sobre la fosforilación de CREB y ERK1/2, reduciendo significativamente la activación de estas vías en el medio I + T comparado con el medio control (figura N°2- A y B). Este resultado demuestra que el exceso de testosterona e insulina modifican la señalización celular dependiente de FSH, y es consistente con una publicación anterior donde se muestra que la fosforilación de ERK1/2 esta disminuida en CG de pacientes con SOP (Lan et al. 2015).

Con respecto a la vía de transducción de señales PKC/MARCKS, esta no fue activada por FSH en nuestras condiciones experimentales, dado que esta vía ya fue activada *in vivo* por FSH-LH regulando la expresión de proteasas que participan en la ruptura folicular y posterior luteinización de las CG (Yamashita et al. 2014).

En relación a la vía de señalización PI3K, se observó que FSH no estimula la fosforilación de AKT en ninguno de las condiciones estudiadas, solamente se observó

que la condición basal es mayor en el medio I+T comparado con el medio control (figura N°2 panel C). En la literatura se ha descrito que insulina media su actividad metabólica, principalmente a través de la vía de señalización PI3K/AKT, estimulando la captación de glucosa a través de la translocación del transportador de glucosa 4, GLUT4, desde vesículas intracelulares hacia la superficie de la célula (Khoramt S. et al. 2015). Estos antecedentes permiten explicar cómo el exceso de insulina, en el medio I+T, aumenta los niveles basales de AKT fosforilado.

Así mismo se ha reportado que la vía PI3K regula la transcripción de genes que participan en la proliferación de CG de rata (Y. Han, Xia, and Tsang 2013). Las CG luteinizadas, utilizadas en este trabajo, no tienen la capacidad de proliferar en cultivo, esto podría explicar porque la vía de señalización PI3K/AKT no fue activada en forma significativa por FSH en este modelo de estudio.

Un concepto tradicional en la endocrinología ovárica tanto fisiológica como experimental es que LH/hCG estimula la biosíntesis de P en CG luteinizadas humanas *in vivo-vitro*, (Moravek, Shang, and Menon 2016); también se ha descrito que hCG promueve la secreción de VEGF en cultivo de CG humanas (Kohen et al. 2013), sustentado en dicho conocimiento, las CG fueron estimuladas con hCG como control positivo, para evaluar la respuesta del cultivo celular al estímulo de FSH.

Reportes previos muestran una reducida producción de P en CG de mujeres SOP que participan en protocolos de inducción de ovulación por FIV, lo que potencialmente se asocia a la falla ovulatoria presente en el SOP (Maruthini et al. 2014; Doldi et al. 1998). En el presente trabajo se determinó el efecto de FSH sobre la secreción de P en CG humanas cultivadas en medio hiperinsulínico /hiperandrogénico y se observó que FSH estimula significativamente la producción de P en ambos medios de cultivo, sin

embargo, este efecto, se reduce significativamente en presencia de un exceso de testosterona e insulina (figura N°3). Este resultado es concordante con la menor producción de P observada en CG proveniente de mujeres SOP lo que explicaría en parte las altas tasa de aborto en esta patología. En relación a la secreción de E2, no se observó un efecto estimulador de FSH. Adicionalmente se observó que los niveles de E2 en el medio I+T, fueron mayores comparado con el medio control, esto se atribuye a que el exceso de testosterona presente en estas condiciones, es convertida a E2 por la acción de la enzima P450 aromatasa dependiente de FSH en su expresión.

La evaluación ultrasonográfica del flujo sanguíneo en el ovario de mujeres SOP es controversial, por un lado, existen estudios que muestran una reducida angiogénesis en la periferia del folículo (Järvelä et al. 2004; Peitsidis and Agrawal 2010), y otros reportes indican un aumento de la angiogénesis en el estroma ovárico (Delgado-Rosas et al. 2009).

En humano se han identificado diferentes isoformas derivadas de un solo gen de VEGF: VEGF121, VEGF165, VEGF189 y VEGF206. Las isoformas VEGF121 y VEGF165 son más ácidas y no se unen fácilmente a heparina, por lo tanto, llegan fácilmente a la célula endotelial. En contraste, las isoformas VEGF189 y VEGF206 son básicas y se unen a heparina con mayor facilidad, permaneciendo completamente secuestradas en la matriz extracelular. Las isoformas ácidas inician el proceso angiogénico promoviendo la activación de proteasas que degradan la matriz y con ello la liberación de las isoformas básicas que se encuentran secuestradas en la matriz extracelular para potenciar la proliferación y migración de las células endoteliales (Torres et al. 2011). En esta investigación se cuantificaron principalmente los niveles de VEGF165 en medio de cultivo de CG, puesto que es la isoforma soluble más

abundante en ovario. Se ha reportado, que los niveles de VEGF aumentan posterior a la administración de hCG en suero y fluido folicular de pacientes con hiperestimulación ovárica (Wang et al. 2002), por este motivo se utilizó hCG como control positivo en los experimentos. En CG cultivadas en medio I+T, se observó que los niveles de VEGF, estimulados por FSH y hCG, fueron significativamente mayores comparado con el medio control (figura N°6). Estos resultados se relacionan directamente con el trabajo que señala un aumento de los niveles de VEGF en fluido folicular proveniente de mujeres SOP que participan de ciclos de FIV (Tal et al. 2013).

Paralelamente se evaluó el efecto de FSH sobre el potencial angiogénico en CG cultivadas en medio hiperinsulínico e hiperandrogénico, observándose que tanto FSH como hCG estimulan significativamente el potencial angiogénico *in vitro* con respecto a la condición basal, además se observó un incremento significativo del potencial angiogénico, estimulado por las gonadotrofinas, en el medio I + T comparado con el medio control (figura N°5), este resultado es consistente con los elevados niveles de VEGF obtenidos con el estímulo de FSH y hCG en el medio I + T (figura N°6).

Cabe destacar el efecto pro-angiogénico de hCG y FSH, donde ambas gonadotrofinas utilizan diferentes receptores, pero comparten las mismas vías de señalización. Adicionalmente se ha reportado que FSH potencia la acción de la hCG en CG *in vitro* (Casarini et al. 2015).

Este trabajo demuestra que solo las vías PKA/CREB y MAPK/ERK fueron activadas por FSH tanto en el medio I+T como en el medio control y participan en los procesos de angiogénesis y esteroidogénesis en las CG luteinizadas humanas. Existe evidencia en la literatura que la vía MAPK/ERK participa en la regulación de VEGF (Kawano et al. 2012) y que la activación de ERK1/2 se incrementa por la inhibición de la vía PKA en



CG de bovino tratadas con H89 (Khan et al. 2015). Estos antecedentes explicarían porque el tratamiento con un inhibidor de PKA (H89) no redujo el potencial angiogénico y la producción de VEGF estimulado por FSH, pues al inhibir la vía PKA/CREB aumenta la fosforilación de ERK1/2 y con ello se activa la vía MAPK que regula la angiogénesis.

Por otro lado, la vía PKA estaría regulando en parte la esteroidogénesis, pues el tratamiento con H89 reduce significativamente los niveles de P estimulado por FSH.

La inhibición de la vía MAPK/ERK disminuye significativamente la secreción de VEGF, el potencial angiogénico y los niveles de P (figura N°8), lo que sugiere que la esta vía participaría en la regulación de la esteroidogénesis y la angiogénesis regulado por FSH en este modelo.

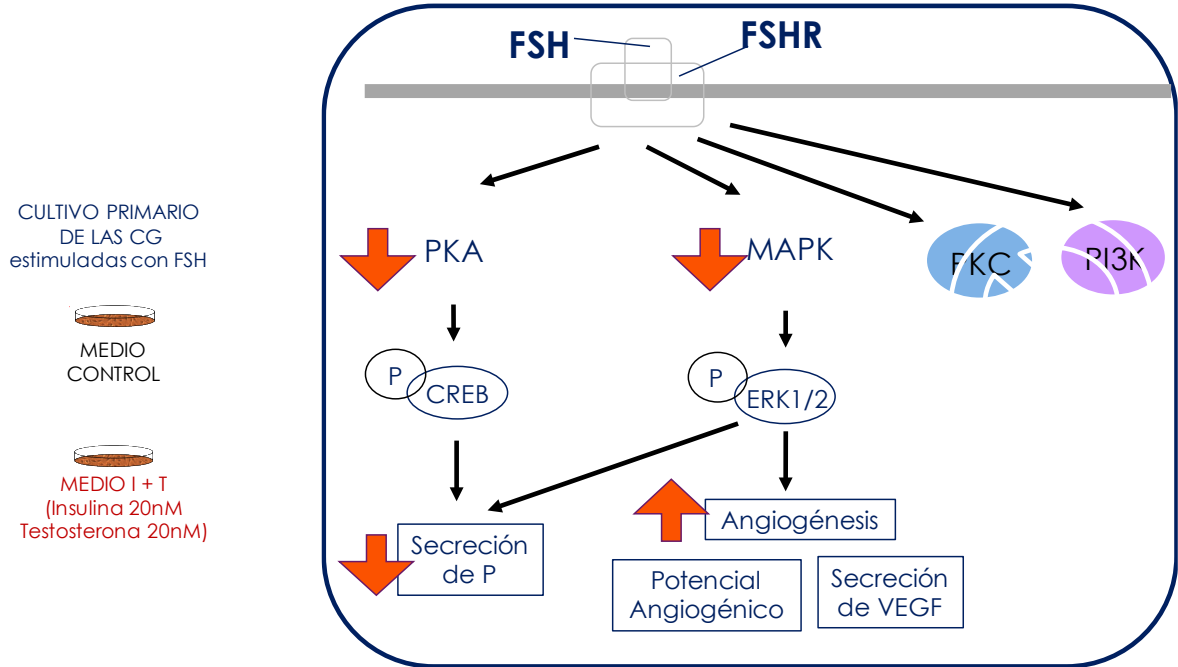
Se ha reportado que la activación de la vía MAPK/ERK regula la producción de VEGF en línea celular de granulosa humana KGN (Kawano et al. 2012). En el presente trabajo, se demostró que la activación de la vía MAPK/ERK estimulada por FSH, esta disminuida en el medio I+T (figura N°2-B), sin embargo, tanto el potencial angiogénico como los niveles de VEGF están aumentados en el medio I+T comparado con el control (figura N°5 y N°6). Antecedentes indican que la vía de señalización PI3K regula positivamente la expresión de HIF-1 y la secreción de VEGF en CG de rata (Alam et al. 2009). En este trabajo el aumento en la condición basal de PI3K/AKT en el medio hiperandrogénico e hiperinsulínico podría estar regulando positivamente la angiogénesis, lo que explicaría porque el potencial angiogénico y los niveles VEGF siguen incrementados en medio I+T (figura N°5 y N°6), cuando la activación de la vía MAPK/ERK esta disminuida (figura N° 2 panel B). Otro factor que puede explicar el aumento de la angiogénesis en el medio I+T, aun cuando la activación de la vía MAPK

esta reducida, es el aumento de los niveles de E2. Recientemente se ha demostrado que E2 tiene un efecto pro-angiogénico, estimulando factores de crecimiento tales como VEGF y el factor de crecimiento neural (NGF) en células de cáncer de ovario epiteliales (Valladares et al. 2017).

Las CG luteinizadas humanas utilizadas en este estudio, se obtienen de procedimientos de FIV, sus características no son completamente similares a las CG pre-ovulatorias, pues están diferenciadas. Antecedentes de nuestro laboratorio demuestran que las CG luteinizadas después de 48 horas de cultivo en medio con suero y 24 horas adicionales privadas de suero, vuelven a su estado basal y recuperan la capacidad de producir esteroides y de expresar enzimas involucradas en la ruptura folicular al ser estimuladas con gonadotrofinas (Henríquez et al. 2017).

Estos resultados sugieren que FSH es importante en la regulación de la angiogénesis y producción de P en este sistema. Experimentalmente un medio suplementado con testosterona e insulina genera alteraciones en la angiogénesis las cuales podrían explicar los cambios en la foliculogénesis del SOP.

Finalmente, la información generada en esta tesis demuestra la acción de FSH en la angiogénesis y esteroidogénesis ovárica, procesos que también son modulados por LH/hCG, a través de las vías PKA y MAPK. Es interesante recordar que los niveles circulantes de FSH en el SOP son inferiores a los de las mujeres con función ovulatoria normal. Esta disminución de FSH en el SOP en presencia de testosterona - insulina contribuyen a generar una desregulación del proceso de foliculogénesis comprometiendo la fertilidad de la mujer.



**Figura N°9: Resumen de resultados.** FSH estimula significativamente la vía de señalización PKA y MAPK. El efecto de FSH sobre las vías PKC y PI3K no fue significativo. La vía de señalización PKA regula la secreción de progesterona (P), mientras que la vía MAPK participa tanto en la secreción de P como en el potencial angiogénico y la secreción de VEGF. El medio I+T, disminuye la activación de la vía PKA estimulada por FSH, disminuyendo la secreción de P; además disminuye la activación de la vía MAPK, estimulada por FSH, conduciendo a la disminución de la secreción de P y a un aumento de la angiogénesis.

## **10. CONCLUSIÓN**

Los resultados de este trabajo permiten comprender como un exceso de andrógenos e insulina, característicos del fenotipo SOP, alteran el microambiente folicular desregulando el efecto de FSH sobre las vías de señalización PKA y MAPK, aumentando los procesos de angiogénesis y reduciendo la producción de progesterona.

Estos resultados potencialmente pudiesen contribuir a mejorar los esquemas farmacológicos de inducción de ovulación en las mujeres con disfunción ovulatoria.

## 11. BIBLIOGRAFIA

Agrawal R, Jacobs H, Payne N, Conway G (2002) Concentration of vascular endothelial growth factor released by cultured human luteinized granulosa cells is higher in women with polystic ovaries than in women with normal ovaries. *Fertility and Sterility* 78(6): 1164-1169.

Alam H, Weck J, Maizels E, Park Y, Lee E, Ashcroft M, Hunzicker-Dunn M (2009) Role of the phosphatidylinositol-3-kinasa and extracelular regulated kinase pathways in the induction of Hipoxia-Inducible Factor (HIF)-1 activity and the HIF-1 target Vascular Endothelial Growth Factor in ovarian granulosa cells in response to Follicle-Stimulating Hormone. *Endocrinology*, 150(2):915-928.

Aranda E, Owen G (2009) A semi-quantitative assay to screen for angiogenic compounds and compounds with angiogenic potential using the EA.hy926 endothelial cell line. *Biological Research*, 42(56):377–389.

Arduc A, Dogan B, Bilmez S (2015) High prevalence of Hashimoto ' s thyroiditis in patients with polycystic ovary syndrome : does the imbalance between estradiol and progesterone play a role ?. *Endocrine Research*, 40(4):204–10.

Azziz R (2006) Diagnosis of polycystic ovarian syndrome: The Rotterdam criteria are premature. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(3):781-785.

Azziz R, Carmina E, Chen Z (2016). Polycystic ovary syndrome. *Nature Review, Disease Primers*, 2:1-18.

Bacallao K, Plaza F, Parrochia A, Cerda A (2016) Levels of regulatory proteins associated with cell proliferation in endometria from untreated patients having polycystic ovarian syndrome with and without endometrial hyperplasia. *Reproductive Sciences*, 23(2):211–218.

Baillargeon J, Nestler J (2006) Commentary : Polycystic Ovary Syndrome : A syndrome of ovarian hypersensitivity to insulin?. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91(1):1–5.

Baptiste C, Battista M, Trottier A (2010) Insulin and hyperandrogenism in women with polycystic ovary syndrome. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 122(1–3):42–52.

Barbieri, R (2014) Chapter 7 The endocrinology of the menstrual cycle. *Human Fertility: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 1154: 145-169.

Casarini L, Riccetti L, De Pascali F, Nicoli A, Tagliavini S, Trenti T, Battista La Sala G, Simoni M (2015) Follicle-stimulating hormone potentiates the steroidogenic activity of chorionic gonadotropin and the anti-apoptotic activity of luteinizing hormone in human granulosa-lutein cells in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 422:103-114.

Catteau-Jonard S, Jamin S, Leclerc A, Gonzales J, Dewailly D, Di Clemente N (2008) Anti-Mullerian hormone, its receptor, fsh receptor, and androgen receptor genes are overexpressed by granulosa cells from stimulated follicles in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 93(11):4456–4461.

Chaffkin L, Luciano A, Peluso J (1993) The role of progesterone in regulating human granulosa cell proliferation and differentiation in vitro. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 76(3):696–700.

Chang R, Cook-Andersen H (2013) Disordered follicle development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 373(1–2):51–60.

Dattatreyamurty B, Figgs L, Reichert Jr (1987) Physical and functional association of follitropin receptors with cholera toxin-sensitive guanine nucleotide-binding protein. *J Biol Chem.* 262(24):11737–11745.

Delgado-Rosas F, Gaytán M, Morales C, Gómez R, Gáytan F (2009) Superficial ovarian cortex vascularization is inversely related to the follicle reserve in normal cycling ovaries and is increased in polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*, 24(5):1142–1151.

DeUgarte C, Bartolucci A, Azziz R (2005) Prevalence of insulin resistance in the polycystic ovary syndrome using the homeostasis model assessment. *Fertility and Sterility*, 83(5):1454–1460.

Devoto L, Kohen P, Castro O, Vega M, Troncoso J, Charreau E (1995) Multihormonal regulation of progesterone synthesis in cultured human midluteal cells. *Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 80(5): 1566-1570.

Devoto L, Fuentes A, Kohen P, Céspedes P, Palomino A, Pommer R, Muñoz A, Strauss J (2009) The human corpus luteum : life cycle and function in natural cycles. *Fertility and Sterility*, 92(3):1067-1079.

Dewailly D, Robin G, Peigne M, Decanter C, Pigny P, Catteau-Jonard S (2016) Interactions between androgens, FSH, anti-Mullerian hormone and estradiol during folliculogenesis in the human normal and polycystic ovary. *Human Reproduction Update*, doi:10.1093/humupd/dmw027

Doldi N, Gessi A, Destefani A, Calzi F, Ferrari A (1998) Polycystic ovary syndrome : anomalies in progesterone production. *Human Reproduction*, 13(2):290–293.

Edson M, Nagaraja A, Matsuk M (2014) The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation, *Endocrine Review*, 30(6):624–712.

Eppig J (2001) Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 122:829–838.

Esteban B, Megías S, Hernández J (2000) *Obesidad: La epidemia del siglo XXI*. Ediciones Díaz de Santos, 2ª Edición, 12:192.

Fortune J, Vincent S (1983) Progesterone inhibits the induction of aromatase activity in rat granulosa cells in vitro. *Biology of Reproduction*, 28:1078–1089.

Goodman N, Cobin R, Futterweit W, Glueck J, Legro R, Carmina E (2015) American association of clinical endocrinologists, American college of endocrinology, and Androgen excess and PCOS Society disease state clinical review: Guide to the best practices in the evaluation and treatment of polycystic ovary syndrome-part 1. *Endocrine Practice*, 21(11):1291–1300.

Han Y, Xia G, Tsang B (2013) Regulation of cyclin D2 expression and degradation by follicle-stimulating hormone during rat granulosa cell proliferation in vitro. *Biology of Reproduction*, 88 (3):1–11.

Henríquez S, Kohen P, Muñoz A, Godoy A, Orge F, Strauss J, Devoto L (2017) In vitro study of gonadotrophin signaling pathways in human granulosa cells in relation to progesterone receptor expression. *Reproductive BioMedicine Online*, doi: 10.1016/j.rbmo.2017.06.011

Herr D, Fraser H, Konrad R, Holzheu I, Kreienberg R, Wulff C (2013) Human chorionic gonadotropin controls luteal vascular permeability via vascular endothelial growth factor by down-regulation of a cascade of adhesion proteins. *Fertility and Sterility*, 99(6):1749-1758.e6.

Homburg R (2009) Androgen circle of polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*, 24(7):1548–1555.



Huang R, Zheng J, Li S, Tao T, Ma J, Lui W (2015) Characteristics and contributions of hyperandrogenism to insulin resistance and other metabolic profiles in polycystic ovary syndrome. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 94:494–500.

Huang S, Pang Y, Yang J, Lin S, Zhao Y, Lei L, Yan L, Li R, Ma C, Qiao J (2016). Fractalkine restores the decreased expression of StAR and progesterone in granulosa cells from patients with polycystic ovary syndrome. *Nature Scientific Reports*, 6(26205):1–9.

Hunzicker-Dunn M, Lopez-Biladeau B, Law N, Fiedler S, Carr D, Maizels E (2012) PKA and GAB2 play central roles in the FSH signaling pathway to PI3K and AKT in ovarian granulosa cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(44):E2979–E2988.

Järvelä I, Sladkevicius P, Kelly S, Ojha K, Campbell S, Nargund G (2004) Comparison of follicular vascularization in normal versus polycystic ovaries during in vitro fertilization as measured using 3-dimensional power Doppler ultrasonography. *Fertility and Sterility*, 82(5):1358–1363.

Johnson M.C, Vega M, Vantman D, Troncoso J.L, Devoto L (1997) Regulatory role of angiotensin II on progesterone production by cultured human granulosa cells. Expression of angiotensin II type-2 receptor. *Molecular Human Reproduction* 3(8):663–668.

Kanamarlapudi V, Gordon U.D, López A (2016) Luteinizing hormone / chorionic gonadotrophin receptor overexpressed in granulosa cells from polycystic ovary syndrome ovaries is functionally active. *Reprod Biomed Online*, 32(6):635–641.

Kawano Y, Utsunomiya-Kai Y, Kai K, Miyakawa I, Ohshiro T, Narahara H (2012) The production of VEGF involving MAP kinase activation by low level laser therapy in human granulosa cells. *Laser therapy*, 21(4):269–74.

Khan, D.R. et al., 2015. Characterization of FSH signalling networks in bovine cumulus cells: a perspective on oocyte competence acquisition. *Molecular Human Reproduction*, 21(9), pp.688–701.

Khoramt S, Movahedi A, Huzwah K, Sokhini A (2015) PI3K/AKT pathway in modulating glucose homeostasis and its alteration in diabetes. *Annals of Medical and Biomedical Sciences*, 1(2):46-55.

Kohen P, Henríquez S, Rojas C, Gerk Phillip, Palomino W, Strauss J, Devoto L (2013) 2-Methoxyestradiol in the human corpus luteum throughout the luteal phase and its influence on lutein cell steroidogenesis and angiogenic activity. *Reproductive endocrinology*, 100(5):1397-1404e1.

Kong D, Park E, Sthephen A, Calvani M, Cardellina J, Monks A, Fisher R, Shoemaker R, Melillo G (2005) Echinomycin, a small-molecule inhibitor of Hypoxia-Inducible Factor-1 DNA-Binding Activity Factor-1 DNA-Binding Activity. *Cancer Res* 65(19):9047–9055.

Lan C-W, Chen M-J, Tai K, Yu D, Yang Y-C, Jan P, Yang Y-S, Chen H-F, Ho H-N (2015) Functional microarray analysis of differentially expressed genes in granulosa cells from women with polycystic ovary syndrome related to MAPK/ERK signaling. *Nature Scientific Reports*, 5(14994):1-10.

Maruthini D, Harris S, Barth J, Balen A, Campbell B, Picton H (2014) The effect of metformin treatment in vivo on acute and long-term energy metabolism and progesterone production in vitro by granulosa cells from women with polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*, 29(10):2302–2316.

Moravek M, Shang M, Menon B, Menon K (2016) HCG-mediated activation of mTORC1 signaling plays a crucial role in steroidogenesis in human granulosa lutein cells. *Endocrine* 54:217–224.

Norman R, Dewailly D, Legro R, Hickey T (2007) Polycystic ovary syndrome. *Lancet*, 370:685–697.

Olivero P, Leiva-Salcedo E, Devoto L, Stutzin A (2008) Activation of Cl<sup>-</sup> channels by human chorionic gonadotropin in luteinized granulosa cells of the human ovary modulates progesterone biosynthesis. *Endocrinology*, 149(9):4680–4887.

Papkoff H, Ekblad M (1970) Ovine follicle stimulating hormone: Preparation and characterization of its subunits. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 40(3):614–621.

Peitsidis P, Agrawal R (2010) Role of vascular endothelial growth factor in women with PCO and PCOS: a systematic review. *Reproductive Biomedicine Online*, 20(4):444–52.

Rice S, Christoforidis N, Gadd C, Nikolaou D, Seyani L, Donaldson A, Margara R, Hardy K, Franks S (2005) Impaired insulin-dependent glucose metabolism in granulosa-lutein cells from anovulatory women with polycystic ovaries. *Human reproduction*, 20(2):373–381.

Rimon-Dahari N, Yerushalmi-Heinemann L, Alyagor L, Dekel N (2016) Ovarian folliculogenesis. Springer International Publishing Switzerland, *Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development, Result nad Problems in Cell differentiation* 58, Chapter 7:167–190.

Salih S, Jamaluddin M, Salama S, Fadl A, Nagamani M, Al-Hendy A (2008) Regulation of catechol O-methyltransferase expression in granulosa cells: a potential role for follicular arrest in polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 89(Suppl3):1414–1421.

Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E (1997) The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocrine Reviews*, 18(6):739–73.

Stilley J, Guan R, Duffy D, Segaloff D (2014) Signaling through FSH receptors on human umbilical vein endothelial cells promotes angiogenesis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 99(5):E813–E820.

Tal R, Seifer D, Shohat-Tat A, Grazi R, Malter H (2013) Transforming growth factor- $\beta$ 1 and its receptor soluble endoglin are altered in polycystic ovary syndrome during controlled ovarian stimulation. *Fertility and Sterility*, 100(2):538–543.

Tal R, Seifer D, Arici A (2015) The emerging role of angiogenic factor dysregulation in the pathogenesis of polycystic ovarian syndrome. *Seminars in Reproductive Medicine*, 33(3):195–207.

Tamanini C, De Ambrogi M (2004) Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reproduction in Domestic Animals*, 39(4):206–216.

Torres A, Sánchez A (2011) Role of Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor during the ovarian cycle. Review. *Rev Mex Cienc Pecu*, 3(1):89-111.

Valladares M, Palza-Parrochia F, Lépez M, López D, Gabler F, Gayan P, Selman A, Vega M, Romero C (2017) Effect of estradiol on the expression of angiogenic factors in epithelial ovarian cancer. *Histol Histopathol*, 32(11):1187.1196.

Vendola K, Zhou J, Adesanya O, Well S, Bondy C (1998) Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. *The Journal of Clinical Investigation*, 101(12):2622–2629.

Wang T, Horng S, Chang C, Wu H, Tsai Y, Wang H, Soong Y (2002) Human chorionic gonadotropin-induced ovarian hyperstimulation syndrome is associated with up-regulation of vascular endothelial growth factor. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87(7):3300–3308.

Wayne C, Fan H, Cheng X, Richards J (2007) Follicle-stimulating hormone induces multiple rous sarcoma oncogene , RAS , and the epidermal growth factor receptor are critical for granulosa cell differentiation, *Molecular Endocrinology* 21(8):1940–1957.

Wu X, Zhou S, Liu J, Pollanen P, Sallinen K, Makinen M, Errkola R (2003) Selective ovary resistance to insulin signaling in women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 80(4):954-965.

Yamashita Y, Okamoto M, Ikeda M, Okamoto A, Masatoshi S, Gunji Y, Nishimura R, Hishinuma, Shimada M (2014) Protein Kinase C (PKC) increases TACE/ADAM17 enzyme activity in porcine ovarian somatic cells, which is essential for granulosa cell luteinization and oocyte maturation. *Endocrinology*, 155(3):1080–1090.

Yang F, Ruan Y, Yang Y, Wang K, Liang S, Han Y, Teng X, Yang J (2015) Follicular hyperandrogenism downregulates aromatase in luteinized granulosa cells in polycystic ovary syndrome women. *Reproduction*, 150(4): 89–296.

Yu F, Han C, Yang W, Jin X, HuZ, Liu Y (2005) Role of ERK1 / 2 in FSH induced PCNA expression and steroidogenesis in granulosa cells. *Frontiers in Bioscience*, 10:896-904.

Zhang Y, Wang S, Zheng J, Zhao c, Zhang Y, Lui L, Huang J (2016) Effects of testosterone on the expression levels of AMH , VEGF and HIF-1  $\alpha$  in mouse granulosa cells. *Experimental and therapeutic medicine*, 12:883–888.

## 12. ANEXOS

### 12.1. Consentimiento informado



Consentimiento Informado para la donación de una muestra de células de granulosa y líquido folicular

En relación a este estudio:

El estudio incluye mujeres que participan en el programa de fertilización asistida del Instituto de Investigaciones Materno Infantil.

La aspiración folicular se realiza rutinariamente como parte del procedimiento de fertilización asistida para la obtención del óvulo, el cual queda indemne para su fecundación. En este procedimiento se obtiene el líquido folicular que contiene el óvulo y las células de la granulosa. La separación de las células de granulosa no implican un procedimiento adicional a la obtención del ovulo y que no forme parte del proceso quirúrgico. Habitualmente estas células son desechadas sin ser analizadas.

Esta investigación no involucra riesgos para la paciente, no obstante en caso de posibles complicaciones que pudiera haber durante el tratamiento el equipo médico tratante será responsable.

Las muestras obtenidas de la paciente así como su información se utilizarán solo para la investigación descrita en este consentimiento y no se incluirán en ningún otro estudio. Una vez finalizada la investigación, las muestras que se le hayan tomado serán adecuadamente eliminadas y no serán utilizadas para estudios genéticos ni otra investigación.

Este estudio no reportará beneficio directo para el tratamiento, sin embargo podría contribuir a comprender las causas de la infertilidad, particularmente para SOP.

Este proceso se realizará siempre manteniendo la confidencialidad de la participante, no incluyendo su nombre o información alguna que pueda identificar a la participante de este estudio. Su identidad no será revelada en presentaciones clínicas, informes o publicaciones relacionadas con la investigación, ni entregados a terceros que no formen parte del equipo de investigadores.

La paciente es libre de negarse a participar en este estudio o de arrepentirse en cualquier momento de continuar en esta investigación sin tener que dar explicaciones. Esto en ningún caso afectará la atención o tratamiento médico que pueda requerir.

Las muestras e información de las pacientes que se retirasen del estudio no serán incorporadas en la investigación y serán eliminadas de forma adecuada.

Este consentimiento informado será firmado en duplicado, siendo uno de los ejemplares entregado a la participante del estudio.

Consentimiento Informado para la donación de una muestra de células de granulosa y liquido folicular

En caso de tener alguna duda relacionada a este estudio me puedo dirigir a los siguientes investigadores: Doctor Luigi Devoto C (teléfono: 29770856) o a quien él designe de la Unidad de Medicina Reproductiva del IDIMI para resolver cualquier duda acerca de sus derechos como participante en este estudio. Además, el paciente podrá dirigirse al presidente del comité de ética institucional que corresponda: Comité Ético Científico del Servicio de Salud Metropolitano Central, Doctor Emiliano Soto Romo, dirección: Victoria Subercaseaux 381, Santiago Centro. Fono: 25746943 o al Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, cuyo presidente es el Dr. Manuel Oyarzún. Dirección: Av. Independencia 1031, Independencia - Fono: 29786923.

El día de la aspiración folicular es un evento necesario en mi tratamiento primario, por lo cual, no constituye un costo adicional. Después de haber leído el consentimiento y haber recibido información clara y detallada de la Unidad de Medicina Reproductiva del IDIMI, acerca del uso con fines científicos de las muestras que se obtienen en el proceso de aspirado folicular, acepto ser invitada a participar en el estudio “Metabolitos de Estrógenos y su significado en fisiología y fisiopatología ovárica humana. Implicaciones clínicas en Síndrome de Ovario Poliquístico”.

Nombre del participante: .....

RUT:..... Fecha..... Firma:.....

Nombre de la persona que obtuvo este consentimiento:.....

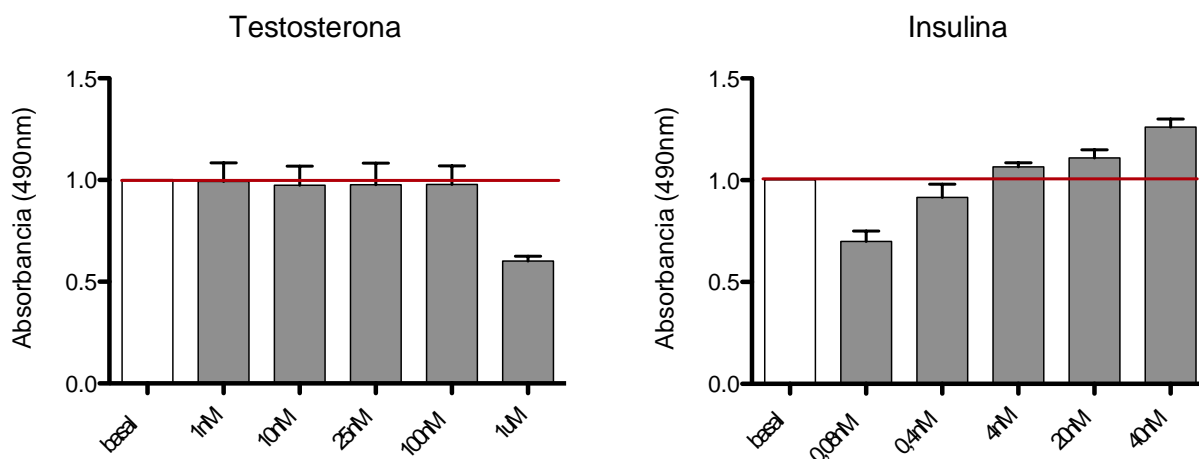
RUT:..... Fecha..... Firma:.....

Nombre del director, del delegado del director o del ministro de Fe del estudio:..... RUT:..... Fecha.....

Firma:.....

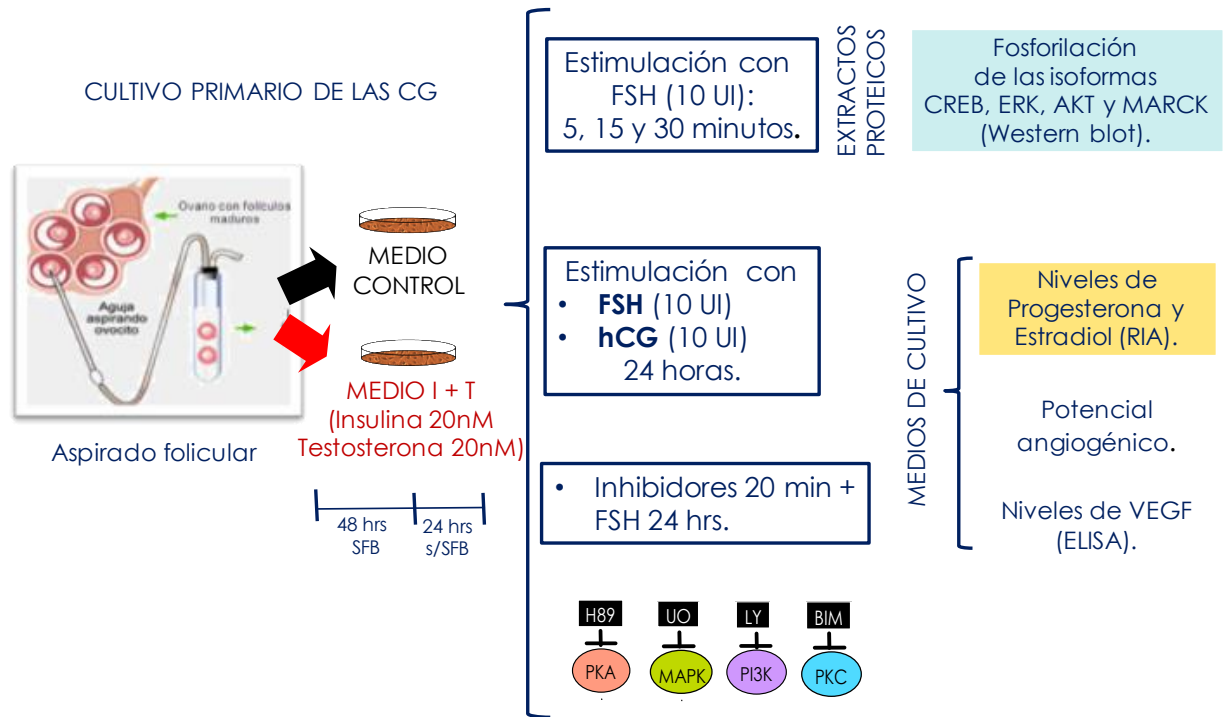


## 12.2. Viabilidad de las CG cultivadas en diferentes concentraciones de testosterona e insulina.



Ensayo de Proliferación Celular CellTiter 96® AQueous One (MTS), a diferentes concentraciones de testosterona e insulina. Este es un método colorimétrico para determinar el número de células viables en ensayos de proliferación o citotoxicidad. El reactivo se agrega directamente a los pocillos de cultivo, se incuba durante 1 - 4 horas y luego se registra la absorbancia a 490 nm con un lector de placa de ELISA de 96 pocillos. El gráfico representa las absorbancias normalizadas con respecto al basal, en quintuplicado de cada concentración de testosterona e insulina (n=2).

### 12.3. Modelo experimental.



Se utilizaron CG luteinizadas humanas provenientes de mujeres que participan de los programas de FIV debido a infertilidad por factor masculino exclusivo. Las células fueron cultivadas, en medio control y medio I+T, durante 48 horas con suero fetal bovino (SFB) y luego deprivadas de SFB durante 24 horas. A continuación, se realizaron estímulos cortos con FSH para determinar la activación de las vías de señalización: PKA/CREB, MAPK/ERK, PI3K/AKT y PKC/MARCKS, mediante Western blot. También se realizaron estímulos con FSH y hCG durante 24 horas, para evaluar la secreción de P, E2, el potencial angiogénico y la secreción de VEGF. Además, las células fueron preincubadas con inhibidores de las vías activadas por FSH, para determinar la participación de estas vías en los procesos de angiogénesis y esteroidogénesis.

## 12.4. Abreviaciones

- AKT: Tirosina quinasa A
- CG: Células de la granulosa
- CREB: Proteína de unión a elementos respuesta de AMPc
- E2: Estradiol
- ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares
- FIV: Fertilización *in vitro*
- FSH: Hormona folículo estimulante
- GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas
- hCG: Gonadotrofina coriónica humana
- LH: Hormona luteinizante
- MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos
- MARCKS: Sustrato de quinasa C rico en alanina miristoilada
- I + T: Insulina + Testosterona
- NGF: Factor del crecimiento neural
- P: Progesterona
- PKA: Proteína quinasa A
- PKC: Proteína quinasa C
- PI3K: Fosfatidil inositol 3 quinasa
- RFSH: Receptor de la hormona folículo estimulante
- RIA: Radioinmunoensayo
- SFB: Suero bovino fetal
- SOP: Síndrome de ovario poliquístico
- VEGF: Factor del crecimiento endotelial vascular