

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS



PARTICIPACIÓN DEL FACTOR INHIBITORIO DE LEUCEMIA EN LOS NIVELES DE ACETILCOLINA Y EN LA FOLICULOGÉNESIS OVÁRICA EN RATA

Presentada a la Universidad de Chile
para optar al Grado de Doctora en Farmacología

Por:

SARA INÉS PEÑA DÍAZ

Director de Tesis

Dr. Alfonso Paredes Vargas

SANTIAGO- CHILE

2023

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas que me han acompañado en este proceso que resultó mucho más largo de lo que esperaba. A la profesora Leticia Luna por creer en mi y haberme motivado y persuadido a llevar a cabo esta hazaña. Al profesor Lara y al profesor Alfonso por haberme aceptado en el laboratorio y permitido ser parte de este gran grupo de científicos y sobre todo personas. Estoy muy agradecida por todo lo que me enseñaron.

Quisiera también agradecer a mis amigos, a los de toda la vida y a los que hice en este proceso de doctorado. Creo que sin ustedes me hubiese caído a pedazos. Muchas gracias por sostenerme, contenerme y alentarme a nunca desertar.

Finalmente agradecer a mi familia. En este proceso una vez más pude aplicar todo lo que me han enseñado durante la vida: a ser perseverante, a trabajar duro y siempre dar lo mejor de mí. Creo que nunca había sido tan consciente del crecimiento propio en tantos ámbitos de la vida, ni de lo doloroso que puede llegar a ser la gran parte del tiempo. La disciplina que siempre me inculcaron, me permitió seguir adelante a pesar de la desmotivación que se siente muchas veces.

Solo agradecerles por contribuir de diferentes maneras en esta etapa que llega a su fin y que, a pesar de todo pude disfrutar. Como escuche hace mucho tiempo en una película independiente: “un artista debe encontrar el significado en el proceso”. Creo que esto también aplica para el científico.

FINANCIAMIENTO

La realización de esta tesis fue posible gracias al financiamiento de:

- Proyecto PII-2018, Investigador Responsable Alfonso Paredes, otorgado por la Dirección de Investigación de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.
- Proyecto FONDECYT: N°1170291. Investigador Responsable: Dr. Hernán Lara Peñaloza.
- Beca de apoyo a la realización de tesis doctoral ANID N°21201326– Becaria Sara Inés Peña Díaz.
- Beca de Doctorado que otorga la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile
- Beca de rebaja de arancel de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile

Fue realizada bajo la dirección del Dr. Alfonso Paredes en el Laboratorio de Neurobioquímica del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

PRESENTACIÓN EN CONGRESOS

2021 Peña S. y Paredes A.H. “El factor Inhibitorio de Leucemia regula la foliculogénesis en un modelo in vivo de rata” XXXII Reunión Anual Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo, congreso on-line.

2019 Peña S. Vargas C., Rubio M., Paredes A. H. “Leukemia Inhibitory Factor, a New Modulator of the Ovarian Cholinergic System in Subfertile Rat”. Congreso Anual de La Sociedad de Farmacología de Chile, Concepción, Chile.

2019 Peña S., Paredes A.H “Efecto del Factor Inhibitorio de Leucemia Sobre el Sistema Colinérgico Ovárico de la Rata”. Congreso Latino Americano Conjunto de Reproducción, Santiago, Chile.

2018 Peña S., Vargas C., Rubio M., Paredes A.H. “Effect of Kisspeptin on the Expression of Leukaemia Inhibitory Factor in Rat Ovaries During the Subfertility Period”. XXIX Reunión Anual Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo, Concón, Chile.

PUBLICACIONES

Parte de los resultados de esta tesis han dado origen a un artículo científico que ha sido publicado en la revista Journal of Endocrinology. Este artículo se titula:

“PARTICIPATION OF LIF IN FOLLICULAR DEVELOPMENT AND STEROIDOGENESIS IN RAT OVARIES”

Autores: Peña, Sara; Rubio, Matías; Vargas, Constanza; Alanis, Constanza y Paredes Alfonso.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del desarrollo folicular en roedores.....	16
Figura 2. Esquema representativo de la vía canónica de señalización de LIF.....	21
Figura 3.- LIFR y gp130 están presentes en las diferentes estructuras foliculares del ovario de rata.....	35
Figura 4.- LIF aumenta la forma fosforilada de STAT3 en ovarios de ratas fértiles.	36
Figura 5.- LIF aumenta la liberación de ACh a las 3 horas de incubación, ex vivo.	38
Figura 6.- LIF disminuye los niveles de Chat y Ache en ovarios incubados por 3h.	39
Figura 7.- LIF aumenta los niveles séricos de progesterona en ratas fértiles.	43
Figura 8.- LIF disminuye la actividad AChE en ovario de ratas fértiles, in vivo.	44
Figura 9.- LIF disminuye el reclutamiento inicial y el crecimiento de folículos preantrales en ratas fértiles, in vivo.....	47
Figura 10.- LIF disminuyó el número de folículos antrales sanos, sin producir cambios en el número de folículos antrales atrésicos en ratas fértiles, in vivo.....	48
Figura 11.- LIF aumenta el número de cuerpos lúteos grandes y los niveles de progesterona en ratas fértiles, in vivo.....	49
Figura 12.- LIF no produce cambios en folículos tipo III ni en quistes en ratas fértiles, in vivo. ...	50
Figura 13.- LIF no produce cambios en el desarrollo folicular de ovarios de ratas subfértiles, in vivo.	51
Figura 14.- LIF produce un aumento de los cuerpos lúteos pequeños en ovarios de ratas subfértiles, in vivo.	52
Figura 15.- LIF no produce cambios en los niveles séricos de progesterona, testosterona y estradiol en ratas subfértiles, in vivo.	53
Figura 16.- LIF no produce cambios en el número de estructuras quísticas en ratas subfértiles, in vivo.	53
Figura 17.- LIF no tiene efectos sobre la fertilidad de la rata fértil, cuando es administrado directamente al ovario.....	54
Figura 18. LIF disminuye el reclutamiento inicial y aumenta el número de cuerpo lúteos en ovario de rata.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Figura suplementaria 1.....	82
Figura suplementaria 2.....	83
Figura suplementaria 3.....	84
Figura suplementaria 4.....	85
Figura suplementaria 5.....	86
Figura suplementaria 6.....	87
Figura suplementaria 7.....	88
Figura suplementaria 8.....	89
Figura suplementaria 9.....	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Partidores usados en RT- qPCR	29
Tabla 2.- Condiciones para cada gen para qPCR.	29

ABREVIATURAS

3 β -HSD: 3 beta Hidroxi esteroide deshidrogenasa
AChE: Acetilcolina esterasa
AMH: Hormona anti-Mülleriana
CG: Células de granulosa
CNTF: Factor neurotrófico ciliar
CT: Células de la teca
ChAT: Colina acetiltransferasa
CHT: Transportador de colina
CL: Cuerpo Lúteo
FSH: Hormona folículo estimulante
GAPDH: Gliceraldehído Fosfato Deshidrogenasa
G-CSF: Factor estimulante de colonias
GH: Hormona del crecimiento de granulocitos
Gp130: glicoproteína 130
hCG: hormona gonadotrofina coriónica humana.
IL-6: Interleuquina 6
JAK1: Janus quinasas 1
KP: Kisspeptina
LIF: Factor inhibitorio de leucemia
LIFR β : Receptor beta del factor inhibitorio de leucemia
LH: Hormona luteinizante
NA: Noradrenalina
NOS: Nervio ovárico superior
PI3K: Fosfoinositol 3 kinasa
PO: Plexo ovárico
StAR: Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda
STAT3: Transductor de señales y activador de la transcripción 3
SNA: Sistema nervioso autónomo

SOP: Síndrome de ovario poliquístico

vAChT: Transportador vesicular de acetilcolina

RESUMEN

En las últimas décadas, se ha observado una tendencia de las mujeres a postergar su maternidad hacia edades más tardías, después de los 32 años. Este periodo de la vida reproductiva es denominado etapa de subfertilidad y corresponde al inicio del envejecimiento ovárico, caracterizado por una disminución logarítmica del número de folículos ováricos junto con una disminución simultánea en la calidad de los ovocitos, lo que se refleja en un mayor porcentaje de embriones con aneuploidías y una menor probabilidad de llevar a cabo embarazos exitosos. Por estos motivos es importante entender el funcionamiento ovárico, sobre todo, los mecanismos involucrados en la pérdida progresiva de sus funciones, como ocurre en contextos fisiológicos tales como el envejecimiento reproductivo.

Uno de los factores involucrados en la función ovárica y que ha sido poco descrito es el Factor Inhibitorio de Leucemia (LIF), una citoquina proinflamatoria perteneciente a la familia de interleuquina 6 (IL-6), necesaria para la implantación del blastocisto en útero. LIF ha sido identificada a nivel ovárico y se presume que participaría en el desarrollo folicular y en la ovulación, pero a la fecha, se desconoce cómo regula localmente estas funciones en la etapa fértil de la rata. Por otro lado, estudios *in vitro* han demostrado que LIF favorece la síntesis de acetilcolina (ACh), la expresión de la enzima colin acetil transferasa (ChAT) y el aumento de la actividad de esta enzima en el ganglio cervical superior. En nuestro laboratorio, se ha demostrado que el ovario posee un sistema colinérgico no neuronal, que participa en la regulación de las funciones ováricas, favoreciendo la foliculogénesis y esteroidogénesis.

En esta tesis se ha propuesto la siguiente hipótesis: LIF produce un aumento en los niveles de ACh ovárica, inhibe el reclutamiento inicial y favorece la ovulación en ovario de rata fértil y subfértil. Como objetivo general se propuso evaluar el rol del LIF sobre los niveles de acetilcolina ovárica, el reclutamiento inicial y ovulación en ovario de rata fértil y subfértil. Para esto, se llevaron a cabo experimentos *in vivo* e *in vitro* para evaluar el sistema colinérgico intraovárico de origen no neuronal, luego de tratar ovarios con 100 ng/ml de LIF, e *in vivo* para evaluar el desarrollo folicular y la fertilidad, en ratas fértiles y subfértiles. Los resultados muestran que, al evaluar el sistema colinérgico *in vitro*, LIF induce un aumento significativo de ACh en el medio de incubación, sin observar cambios en los niveles de ACh ovárica *in vitro* ni *in vivo*. Por otro lado, disminuye significativamente el contenido de mRNA de las enzimas ChAT y AChE, luego de 3h de incubación en ratas fértiles. Cuando evaluamos la foliculogénesis observamos que LIF disminuye el desarrollo folicular e induce un aumento de la hormona anti-mülleriana (AMH) sérica, pero también se

favorece la formación de cuerpos lúteos (CL), lo que se ve reflejado en los altos niveles de progesterona sérica observados en ratas fértiles. En ratas subfértiles se observó que LIF no afecta el desarrollo folicular, pero si aumenta los CL pequeños, sin observarse cambios en los niveles de progesterona. Finalmente, al estudiar la fertilidad, se observó que LIF no afecta el número de implantaciones en los cuernos uterinos, ni crías vivas por rata en la etapa fértil.

Los resultados permiten concluir que LIF participa en la función ovárica, regulando el desarrollo folicular y la esteroidogénesis en ratas fértiles y subfértiles. Los resultados sugieren que LIF favorece el proceso de ovulación, reflejado por el aumento del número de cuerpos lúteos y de los niveles séricos de progesterona. Finalmente, LIF participa en la regulación del sistema colinérgico en estudios *ex vivo* de ovario de ratas fértiles, pero para determinar si el efecto de LIF sobre las funciones ováricas es mediado por los niveles de ACh ováricos debe ser confirmada con futuros estudios.

ABSTRACT

PARTICIPATION OF THE LEUKEMIA INHIBITORY FACTOR IN ACETYLCHOLINE LEVELS AND IN OVARIAN FOLLICULOGENESIS DURING THE FERTILE AND SUB-FERTILE PERIOD OF THE RAT

In recent decades there has been a tendency for women to postpone childbearing until later in life, after the age of 32. This period of reproductive life is called the subfertility stage and corresponds to the beginning of ovarian aging, characterized by a logarithmic decrease in the ovarian follicles number together with a simultaneous decrease in the oocyte quality, which is reflected in a higher percentage of embryos with aneuploidy and a lower probability of successful pregnancies. For these reasons it is important to understand ovarian function, especially the mechanisms involved in the progressive loss of its functions as occurs in physiological contexts such as reproductive aging.

One of the factors involved in ovarian function that has been little described is LIF, a proinflammatory cytokine belonging to the IL-6 family, necessary for blastocyst implantation in the uterus. LIF has been identified at the ovarian level and is presumed to participate in follicular development and ovulation, but to date, it is not known how it locally regulates these functions in the rat fertile stage. On the other hand, in vitro studies have shown that LIF favors the synthesis of ACh, the expression of the ChAT enzyme and the increase of the activity of this enzyme in the superior cervical ganglion. In our laboratory, it has been demonstrated that the ovary possesses a non-neuronal cholinergic system, which participates in the regulation of ovarian functions, favoring folliculogenesis and steroidogenesis.

In this thesis it has been proposed as a hypothesis: leukemia inhibitory factor produces an increase in ovarian ACh levels, which favors ovarian folliculogenesis and fertility in rats in fertile and subfertile period. The general objective was to evaluate the role of LIF in ovarian function and its participation in the regulation of the cholinergic system in the ovary of fertile and subfertile rats. For this purpose, in vivo and in vitro experiments were carried out to evaluate the non-neuronal cholinergic system after treating ovaries with 100 ng/ml of LIF, and in vivo to evaluate follicular development and fertility in fertile and subfertile rats. The results show that, when evaluating the non-neuronal cholinergic system, LIF induces a significant increase of ACh in the incubation medium, without observing changes in ovarian ACh levels in vitro or in vivo. On the other hand, it significantly decreases the mRNA content of ChAT and AChE enzymes after 3h of incubation in fertile rats. When we evaluated folliculogenesis we observed that LIF decreases follicular development and induces an increase in serum AMH, but also favors the formation of corpora lutea, which is reflected in the high

serum progesterone levels observed in fertile rats. In subfertile rats, it was observed that LIF does not affect follicular development, but it does increase small corpora lutea, without changes in progesterone levels. Finally, when studying fertility, it was observed that LIF does not affect the number of implantation of uterine bodies, nor live pups per rat in the fertile stage.

It can be concluded that LIF participates in ovarian function, regulating follicular development and steroidogenesis in fertile and subfertile rats. The results suggest that LIF favors the ovulation process, reflected by the increase in the number of corpora lutea and serum progesterone levels. Finally, LIF participates in the regulation of the cholinergic system in ex vivo ovarian studies of fertile rats, but whether the effect of LIF on ovarian functions is mediated by ovarian ACh levels needs to be confirmed by future studies.

INTRODUCCIÓN

FERTILIDAD Y FECUNDIDAD EN LA ACTUALIDAD

La postergación de la maternidad en las últimas décadas ha sido recurrente tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, y se debe en gran medida, a que las mujeres están teniendo mayores y mejores oportunidades que permiten su desarrollo en diferentes ámbitos, priorizando de esta forma, por ejemplo, su desarrollo en lo académico y/o profesional. Además, están teniendo un mayor conocimiento y acceso a métodos de control de natalidad (Larrañaga, 2006) lo que les ha permitido organizar y programar su maternidad. Varios estudios muestran que la tasa global de fecundidad disminuye con la edad (Larrañaga, 2006; Farquhar et al., 2019). Por otro lado, las mujeres están postergando la maternidad hacia edades más tardías (Larrañaga, 2006; Mathews & Hamilton, 2016) en donde Chile no es la excepción (“Anuario de Estadísticas Vitales, 2019,” 2021).

En nuestro país, los datos muestran que la tasa de fecundidad en el tramo de 20-24 años ha disminuido respecto a lo observado 20 años atrás, mientras que en los tramos de 30-34 y 35-39 ha aumentado (“Anuario de Estadísticas Vitales, 2019,” 2021). Esta situación es relevante, ya que cercana a la edad de 32 años, las mujeres comienzan una etapa de la vida reproductiva conocida como etapa de subfertilidad (Mathews & Hamilton, 2016; Farquhar et al., 2019). Este periodo corresponde al inicio del envejecimiento ovárico y se caracteriza por una disminución logarítmica del número de folículos ováricos y a una disminución simultánea de la calidad de los ovocitos, lo que se refleja en un mayor porcentaje de embriones con aneuploidías y una menor probabilidad de llevar a cabo embarazos exitosos (Cruz et al., 2017; Farquhar et al., 2019).

Debido a estos antecedentes, resulta importante entender el funcionamiento ovárico, sobre todo, los mecanismos involucrados en la pérdida progresiva de sus funciones. Entender estos mecanismos cobra mayor relevancia en contextos fisiopatológicos o fisiológicos como en el envejecimiento reproductivo. Para poder dilucidar y comprender estos mecanismos es necesario entender cómo opera la dinámica folicular en el ovario y cómo se regulan estos procesos durante el periodo fértil. Para esto, se utilizó como modelo de estudio, la rata Sprague-Dawley, donde se han descrito casi todos los procesos que regulan la función ovárica en el ser humano. Además, este modelo por su corto ciclo de vida permite hacer un seguimiento experimental durante toda su vida reproductiva, incluido el periodo de subfertilidad (Cruz et al., 2017).

FOLICULOGÉNESIS

La foliculogénesis o desarrollo folicular, es el proceso que da lugar al desarrollo y maduración de la unidad funcional del ovario conocida como folículo, estructura que cumple dos funciones principales: la producción de hormonas esteroidales y el crecimiento del ovocito para que este pueda ser ovulado y posteriormente fecundado (Drummond, 2006; Palma et al., 2012). El desarrollo folicular en roedores (fig. 1) se inicia durante el periodo perinatal, siendo la primera etapa la formación del folículo primordial, estructura distinguida morfológicamente por el ovocito y una capa de células escamosas rodeándolo conocida como pregranulosa (PG) (Mcgee & Hsueh, 2000). Luego de la acción de señales paracrinas, los folículos salen de su estado de quiescencia y ocurre la transición de folículo primordial a folículo primario, etapa en la que el ovocito crece y las células PG que lo rodean adquieren una morfología cuboidal, pasando a células de granulosa (CG) (Nilsson & Skinner, 2009). En la etapa siguiente, ocurre la formación del folículo secundario, en la cual se distinguen dos o más capas de CG rodeadas por células de la teca (CT). Estos dos tipos celulares descritos en el folículo son muy importantes para su funcionalidad, ya que son los encargados de la síntesis de hormonas esteroidales y peptídicas, participantes en la coordinación de las funciones foliculares (Palma et al., 2012). Es importante destacar, que hasta esta etapa la regulación del desarrollo folicular es independiente de gonadotropinas (Mcgee & Hsueh, 2000). Debido a la proliferación de las CG, el folículo crece y se forma la cavidad antral dando lugar al folículo antral o terciario. Este tipo de folículo puede ser encontrado desde la etapa peripuberal de la hembra. El crecimiento y maduración del folículo se hace dependiente de las hormonas gonadotropinas folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) (Hirshfield & Midgley, 1978; Mcgee & Hsueh, 2000; Kovacs & Ojeda, 2011). Finalmente, cuando la cavidad antral crece y el folículo alcanza su máximo tamaño, se está en presencia del folículo preovulatorio o folículo maduro, el cual puede ser observado en cada ciclo estral de la etapa fértil de la hembra y, si este folículo maduro responde al aumento de los niveles de LH, se produce la ovulación y el folículo remanente, dará lugar al cuerpo lúteo (CL) (Mcgee & Hsueh, 2000; Kovacs & Ojeda, 2011). Es importante destacar que durante todo el desarrollo folicular ocurre un proceso conocido como atresia, que corresponde a la degeneración de estructuras foliculares, asegurando que solo folículos saludables y que conservan al ovocito en óptimas condiciones sean ovulados (fig.1). Aunque la atresia folicular está presente en las diferentes etapas de la foliculogénesis, presenta una mayor incidencia cuando el desarrollo de los folículos es dependiente de FSH, en estadios tempranos del crecimiento de los folículos antrales (fig. 1). Los folículos preantrales y preovulatorios raramente presentan atresia folicular (Chun et al., 1996).

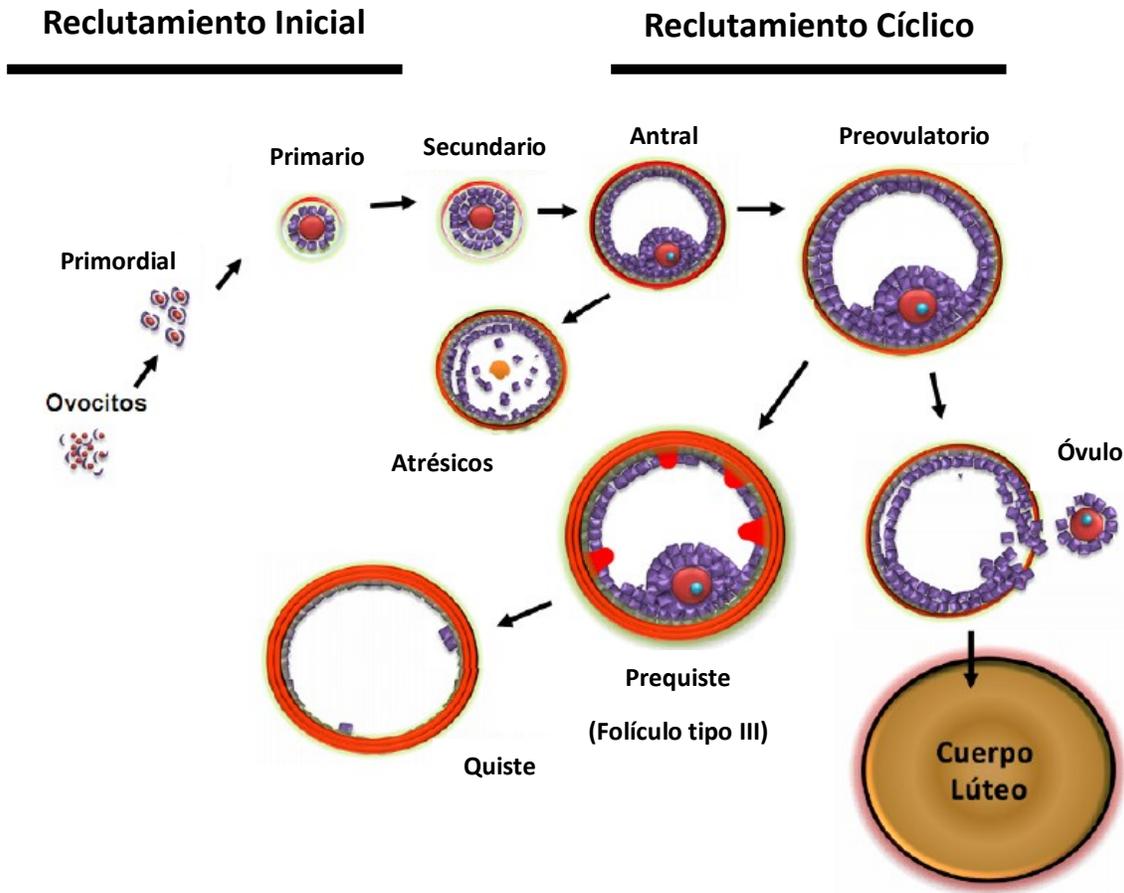


Figura 1. Esquema del desarrollo folicular en roedores.

Representación de los distintos estados de desarrollo de los folículos ováricos en roedores. Cada flecha indica el siguiente paso o alternativas en el desarrollo del folículo. Modificado de Fernandois et al., 2014.

REGULACIÓN NEUROENDOCRINA Y NERVIOSA DE LA FOLICULOGÉNESIS

El desarrollo folicular es un proceso altamente regulado durante todo el periodo reproductivo de la hembra. Esta regulación está dada por diferentes señales, siendo las más estudiadas las de tipo neuroendocrina (Greiner M et al., 2005; Kovacs & Ojeda, 2011). Durante el periodo fértil de la hembra, desde la etapa puberal, el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (HHO) cumple un rol predominante en la regulación de la foliculogénesis, principalmente de aquellos folículos antrales y preovulatorio, para poder inducir su crecimiento, maduración y finalmente la ovulación (Kumar et al., 1997). Las hormonas FSH y LH producidas en la adenohipófisis, actúan a nivel de CG y CT respectivamente, estimulando la proliferación de CG e induciendo la expresión de la maquinaria enzimática para la síntesis de hormonas esteroidales sexuales, principalmente andrógenos en CT y estrógenos en CG (Ishimura et al., 1989; Zeleznik et al., 1974). Estas hormonas esteroidales, además

de tener efectos paracrinos en las propias células ováricas, son capaces de estimular e inhibir el eje reproductivo HHO, proporcionando la ciclicidad y pulsatilidad característica del ciclo estral (Rajkovic et al., 2006).

En las últimas décadas, se ha descrito una regulación de tipo nerviosa que está dada por fibras simpáticas que inervan los componentes glandulares del ovario a través del nervio ovárico superior (NOS) (Gerendai et al., 1998) y que se ha visto que cumplen un rol importante en la regulación de foliculogénesis (Greiner M et al., 2005; Cruz et al., 2017). El estudio del eje hipotálamo-ganglio celiaco-ovario (HGO) ha mostrado que la actividad simpática ovárica y la densidad de los receptores β adrenérgicos ováricos, cambia con el ciclo estral de la rata y que la innervación simpática de los folículos ováricos regula el crecimiento y maduración folicular, la secreción de hormonas esteroidales y la ovulación (Barria et al., 1993; Kannisto et al., 1985; Lara et al., 2000; Paredes et al., 2011). En experimentos de inducción de un modelo de la condición de ovario poliquístico por estrés por frío o por valerato de estradiol en ratas, han mostrado que el aumento del tono adrenérgico se ha asociado con la formación de estructuras quísticas y prequísticas (estructuras anómalas ováricas formadas cuando el folículo no sufre atresia por apoptosis, denominados también Folículos tipo III, ver fig. 1), junto con alteraciones en el crecimiento folicular y la ovulación (Lara et al., 2000; Dorfman M. et al., 2003; Rosa-E-Silva et al., 2003), avalando fuertemente el control que tiene el tono simpático sobre las funciones ováricas. Sumado a esto, se ha determinado que las CG pueden comportarse como células simpáticas, mostrando que el ovario tendría su propio sistema adrenérgico (Greiner M et al., 2005).

En gran parte de los tejidos y órganos, las funciones fisiológicas se ven reguladas por las fibras simpática y parasimpática que los inervan, pero en ovario se ha visto que las funciones ováricas están sujetas a una regulación colinérgica similar, pero no directamente nerviosa. Experimentos realizados en nuestro laboratorio, en donde se realizó denervación del NOS o del plexo ovárico (PO) en ratas fértiles, mostraron que los niveles de acetilcolina (ACh) ováricos no decaen como lo observado con noradrenalina (NA) (Cuevas, 2022), indicando que la ACh encontrada en el ovario no es de origen nervioso. Apoyando esto, se ha descrito que colina acetil transferasa (ChAT) y el transportador vesicular de ACh (vAChT) se expresan en células de la granulosa (Fritz et al., 1999; Mayerhofer et al., 2003), mostrando que células ováricas tendrían la enzima capaz de sintetizar ACh y el transportador para su almacenamiento vesicular. En estudios *in vitro* se ha podido observar que en respuesta a FSH se produce un aumento en la producción de ACh (Mayerhofer et al., 2006) y en

estudios *in vivo*, cuando se administra de forma local, mediante una minibomba osmótica, huperzina A, un inhibidor de acetilcolina esterasa (AChE), se produce un aumento en ACh intraovárica y con ello, un aumento en el desarrollo folicular y fertilidad en ratas fértiles (Urrea et al., 2016). En estudios más recientes, en un modelo de rata *in vivo* de estrés por frío para inducción de fenotipo de ovario poliquístico, se observó una activación del sistema colinérgico ovárico, un mes después de someter la rata al protocolo de estrés, induciendo un aumento en el número de estructuras quísticas en el ovario y un predominio del sistema noradrenérgico. Los niveles de ACh disminuyeron (Benitez et al., 2021), situación que es revertida cuando se administra de forma local un agonista colinérgico muscarínico que no es degradado por AChE, como carbacol (Benitez et al., 2021).

REGULACIÓN DEL PERIODO SUBFÉRTIL EN LA RATA

En la adultez de la rata, el periodo de subfertilidad ocurre entre los 8 y 12 meses de edad. Este periodo, que corresponde al inicio de la senescencia reproductiva del animal, se caracteriza por una drástica disminución de la reserva folicular ovárica acompañado de una disminución en la función del ovario (Acuña et al., 2009; Cruz et al., 2017), lo que se traduce finalmente en una disminución en la probabilidad de gestaciones exitosas y una disminución en el número de crías, a medida que el animal envejece (Jones & Krohn, 1961; Acuña et al., 2009). Durante este periodo se presenta una desregulación del ciclo estral y una reducción gradual de CLs, debido a la baja tasa de ovulación, lo que, además, se suma la aparición y aumento de estructuras quísticas y prequísticas en el ovario de rata (Acuña et al., 2009; Westwood, 2008). Respecto a esto último, se ha publicado que la aparición de estructuras quísticas y prequísticas en el periodo de subfertilidad, se relaciona con un aumento en el tono simpático en el ovario, caracterizado por un aumento en el contenido y liberación de NA ovárica (Acuña et al., 2009; Cruz et al., 2017). Cuando se utiliza un bloqueador beta-adrenérgico como propranolol (Fernandois et al., 2012) o se realiza una denervación química simpática con guanetinida (Chávez-Genaro et al., 2007; Garrido et al., 2018) la morfología poliquística y la desregulación de ciclicidad estral en ratas subfértiles es revertida, sugiriendo un importante rol del tono adrenérgico en la formación de estructuras quísticas en la etapa subfértil de la rata.

El papel que podría jugar el sistema colinérgico intraovárico durante el periodo de subfertilidad femenina aún no ha sido dilucidado, lo que se suma a las incógnitas subyacentes a los mecanismos involucrados en la sucesión de todos estos eventos en el periodo de subfertilidad que conlleven a una senescencia reproductiva.

FACTOR INHIBITORIO DE LEUCEMIA

Las funciones ováricas son reguladas por un componente neuroendocrino, un componente nervioso y además por factores intrínsecos, ya que el ovario también sintetiza proteínas que regulan sus propias funciones. Una molécula que ha despertado interés respecto a la regulación de las funciones ováricas es el Factor inhibitorio de Leucemia (LIF), citoquina perteneciente a la familia de interleuquina 6 (IL-6), considerada como una molécula pleiotrópica, ya que se expresa en diferentes tejidos y tipos celulares, cumpliendo funciones específicas (Bazan, 1991). El primer efecto atribuido a LIF fue como inductor de diferenciación e inhibidor de la proliferación de la línea celular leucémica mieloide M1 a macrófagos, en modelo *in vitro* (Gearing et al., 1987). Posteriormente se demostró que participa en la reabsorción ósea (Palmqvist et al., 2002; Sims & Johnson, 2012), que actúa como transdiferenciador en neuronas neonatas (Yamamori et al., 1989; Lecomte et al., 2005), mejora la función cardíaca (Fahmi et al., 2013; Zgheib et al., 2012) y participa en la foliculogénesis, y espermatogénesis (Murphy et al., 2016; Curley et al., 2018). Actualmente, el estudio de esta citoquina en el sistema reproductor femenino es de interés, ya que ha sido localizado en útero, participando en el proceso de implantación del blastocisto (Lass et al., 2001; Calder et al., 2014); y en ovario, sin conocer del todo el papel que juega LIF en este órgano.

NATURALEZA QUÍMICA DE LIF

LIF es una proteína que tiene un peso aproximado de 20 (kDa), pero su peso molecular oscila entre los 38-67 kDa debido a las diferentes modificaciones post-traduccionales (Robinson et al., 1994; Aikawa et al., 1998; Nicola & Babon, 2015; Sasai et al., 1998; Taupin et al., 1998). Dentro de las modificaciones que sufre, están las glicosilaciones en la proteína madura, observándose principalmente en residuos de asparagina. Si bien las glicosilaciones explican de cierta forma las variaciones en el peso molecular de LIF (38-67 kDa) (Aikawa et al., 1998; Sasai et al., 1998; Taupin et al., 1998), aún no permite establecer cómo el patrón de glicosilación afectaría la función y estabilidad de la proteína *in vitro* e *in vivo* (Hilton, 1992). Cada especie mamífera presenta su “propio” LIF y las secuencias de ratón, rata, humano, cerdo y oveja ya han sido determinadas (Lass et al., 2001). En algunos casos la difícil detección de la proteína ha llevado a postular que su expresión es altamente controlada y que sus acciones son locales y acotadas en el tiempo (Hilton, 1992).

Mediante cristalografía de rayos X (Robinson et al., 1994) y resonancia magnética nuclear (RMN) (Hinds et al., 1998) se ha demostrado que LIF tiene similitud con otras citoquinas de la familia IL-6,

descrita como una citoquina de cadena larga de cuatro hélices α en una configuración up-up-down-down, como se evidencia también para IL-6, factor neurotrófico ciliar (CNTF), hormona del crecimiento (GH), Factor estimulante de colonias (G-CSF) y leptina (Somers et al., 1997; McDonald et al., 1995; Ultsch et al., 1994; Lovejoy et al., 1993; Zhang et al., 1997). Si bien se observa un bajo grado de homología en sus estructuras primarias, muestran una alta homología en sus estructuras terciarias y en sus epítomos de receptores funcionales (Panayotatos et al., 1995).

RECEPTOR DE LIF COMO HETERODÍMERO Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ASOCIADAS

Para que LIF pueda llevar a cabo su acción, debe interactuar con un heterodímero el cual, por un lado, lo conforma el receptor beta de LIF (LIFR β) que también puede interactuar con otras citoquinas de la familia de IL-6 como Factor neurotrófico ciliar (CNTF), Oncostatina M, y con la glicoproteína 130 (gp130), subunidad común para todas las citoquinas de la familia de IL-6, ambos ubicados en la superficie de la membrana plasmática (Lass et al., 2001; Nicola & Babon, 2015). La cadena LIFR β se une específicamente a LIF, pero con una afinidad relativamente baja ($Kd = 1 * 10^9$). Cuando la cadena gp130 interactúa con el complejo LIF-LIFR β , se forma el complejo trimérico LIF-LIFR β -gp130 de alta afinidad ($Kd = 1 * 10^{10}$), necesario para la activación del receptor y, por lo tanto, de la señalización (Lass et al., 2001; Auernhammer & Melmed, 2000). La interacción de LIF con LIFR β es 80 veces más estrecha que con gp130, lo cual no sorprende dado que gp130 interactúa con más citoquinas que LIFR β (Nicola & Babon, 2015).

Todos los receptores asociados a las citoquinas de familia de IL-6 no presentan actividad kinasa. La unión de LIF con su heteroreceptor provoca cambios conformacionales en las subunidades que permiten la activación de Janus kinasas citoplasmáticas (JAK), la fosforilación de tirosina en el receptor y del transductor de señal y activador de la transcripción (STAT) (Nicola & Babon, 2015). Se ha observado que LIF puede activar la vía de JAK1/STAT3, considerada como su vía de señalización canónica (fig. 2), pero es importante destacar que la cascada de señalización JAK/STAT es una vía de señalización común, compartida por varios receptores de citoquinas (Auernhammer & Melmed, 2000; Taupin et al., 1998). Además de activar la vía JAK/STAT, se ha visto que LIF puede activar otras vías de señalización como la vía MAPK y PI3K. Sin embargo, los efectos varían, llegando a ser incluso opuestos, dependiendo del tipo celular del que se trate, pudiendo por ejemplo en algunos casos inducir y en otros inhibir la diferenciación celular (Nicola & Babon, 2015).

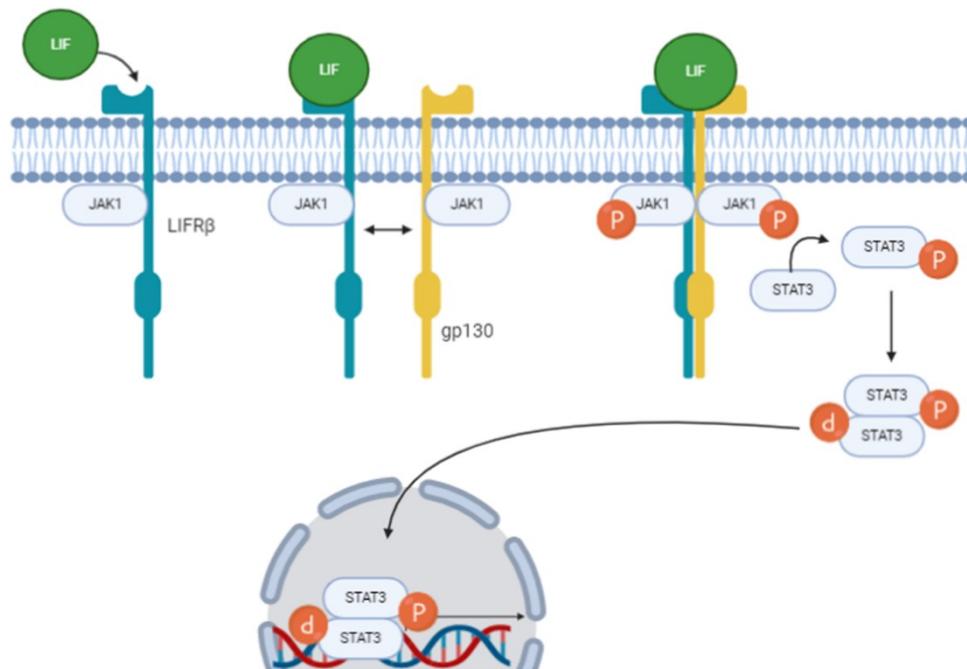


Figura 2. Esquema representativo de la vía canónica de señalización de LIF.

En verde se representa la molécula de LIF. En celeste se representa la subunidad LIFR β y en amarillo la subunidad gp130. Al interactuar LIF con la subunidad LIFR β del receptor de LIF se recluta a la subunidad gp130 para formar el heterotrímero. Al ocurrir esto se desencadena la cascada de señalización en donde se induce la fosforilación de JAK1 para ser activado. JAK1 al ser activado posteriormente fosforila a STAT3 para que de esta forma pueda homodimerizar y de esta forma poder traslocar al núcleo para poder actuar como un factor de transcripción.

LIF COMO FACTOR REGULADOR DE LA FOLICULOGÉNESIS

En las últimas décadas, se han realizado algunas investigaciones en ovario, en donde se ha relacionado a LIF con diferentes etapas de la foliculogénesis en distintos modelos animales. Mediante la técnica de inmuno ensayo enzimático (EIA) se pudo evaluar el cambio en los niveles de LIF durante el ciclo estral en ovario de rata, observándose los mayores niveles en la etapa de estro tardío y metaestro temprano (Fukada et al., 1997) lo que podría indicar que LIF ejercería su acción en etapas específicas del ciclo estral de la rata. En experimentos en los cuales se realizaron cultivos de ovarios de ratas de 4 días postnatal tratados con LIF, mostraron un aumento en la transición de folículos primordiales a folículos en desarrollo (que incluyen a folículos primarios y secundarios) (Nilsson et al., 2002), mostrando que LIF favorece el reclutamiento inicial del desarrollo folicular en ovarios neonatales de rata. Por otro lado, datos obtenidos a partir de cultivos de tejido ovárico de

ratones de 4 semanas de edad incubados con LIF recombinante y anticuerpos anti-LIF neutralizantes, muestran que LIF inhibe el crecimiento de folículos primarios, secundarios, y folículos antrales, efecto revertido por anticuerpos anti-LIF (Komatsu et al., 2015). Sumado a estos antecedentes, LIF además ha sido relacionado con la ovulación. En el año 2016, fueron publicados estudios en los cuales, se utilizó un modelo *in vivo*, en donde a Macacos Rhesus hembras fértiles se les indujo la ovulación con un estímulo con hormona gonadotrofina coriónica humana (hCG). Previa inducción de la ovulación se observó en el fluido folicular y en folículos periovulatorios, los niveles de ARNm y proteína de LIF no fueron detectados, pero 12 y 36 horas posterior a la estimulación ovulatoria se observó un aumento significativo de la proteína, sugiriendo que LIF podría ser necesario para el proceso ovulatorio. Esto se comprueba al administrar un antagonista de LIF (receptor soluble de LIF, sLIFR) junto con el estímulo ovulatorio, observándose una inhibición de la ovulación, al no presentarse el estigma ovulatorio en ovario (Murphy et al., 2016). Resultados de nuestro laboratorio (Vargas, 2017; Rubio, 2022), sobre la expresión del mensajero y de la proteína de LIF en ovarios de ratas neonatales, fértiles y subfértiles, muestran que el ARNm de LIF no cambia a lo largo de los diferentes periodos reproductivos, pero los niveles proteicos de LIF si, siendo mayores durante el periodo fértil. Todos estos antecedentes vinculan a LIF con la función folicular ovárica, sugiriendo un potencial rol de LIF en distintas etapas del desarrollo folicular. Pese a estos antecedentes, LIF es un factor que no ha sido estudiado *in vivo* en roedores y, por lo tanto, tampoco durante el periodo de subfertilidad de la hembra en rata.

LIF COMO FACTOR DE DIFERENCIACIÓN COLINÉRGICO

Como se mencionó anteriormente, LIF ha sido descrito como una molécula pleiotrópica, debido a los diferentes efectos que produce en los distintos tejidos o tipos celulares en los que actúa y las células neuronales del sistema nervioso autónomo (SNA) no han sido exentas de sus efectos. Esta citoquina, a nivel de SNA, ha sido descrita como un factor de diferenciación colinérgica principalmente por estudios realizados en cultivos primarios de neuronas simpáticas neonatales (Fukada, 1985; Yamamori et al., 1989). Usando este modelo, se ha observado que LIF favorece la función colinérgica en neuronas simpáticas, induciendo un proceso de diferenciación neuronal, aumentando la síntesis de ACh y suprimiendo la síntesis de catecolaminas (CA), como de noradrenalina (NA) (Patterson & Chun, 1977a; Patterson & Chun, 1977b); Yamamori et al., 1989). Sumado a esto, se ha demostrado en estudios *in situ* en ratas postnatales, que diferentes tipos neuronales incluyendo neuronas del sistema nervioso simpático (SNS) y parasimpático (SNP),

presentan sitios de unión específico para esta citoquina (Qiu et al., 1997), sugiriendo que LIF estaría cumpliendo un rol en el desarrollo y diferenciación de estos tipos neuronales. Por ejemplo, en cultivo de neuronas neonatales simpáticas, la actividad de ChAT se ve aumentada a concentraciones crecientes de LIF y con esto, un aumento en la síntesis de ACh, además una disminución en la expresión de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) enzima limitante en la síntesis de NA (Lecomte et al., 2005).

Haciendo un resumen de los antecedentes planteados en esta introducción, en ovario se ha visto que está presente la maquinaria encargada de la función colinérgica no neuronal y noradrenérgica nerviosa, por lo que, ambos sistemas compiten entre sí para mantener la homeostasis de las funciones ováricas en la rata, pero como se lleva a cabo esta homeostasis a este nivel no ha sido dilucidado. El rol del sistema LIF/LIFR en la diferenciación colinérgica celular ha sido descrito a nivel de neuronas simpáticas en cultivos, sin embargo, no ha sido evaluado su efecto *in vivo* y menos a nivel ovárico. Además, los efectos del sistema LIF/LIFR en la regulación de la foliculogénesis no han sido evaluados *in vivo* durante el periodo de subfertilidad de la rata. En base a estas interrogantes es que en este proyecto se propone que: la activación local del sistema LIF/LIFR actúa durante el desarrollo folicular ovárico y mejora la fertilidad de ratas subfértiles, mediante una activación de la función colinérgica intraovárica.

HIPÓTESIS

El Factor Inhibitorio de Leucemia produce un aumento en los niveles de acetilcolina ovárica y promueve el reclutamiento inicial, y la ovulación en ovario de rata fértil y subfértil.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el rol del Factor Inhibitorio Leucemia sobre los niveles de acetilcolina ovárica, el reclutamiento inicial y ovulación en ovario de rata fértil y subfértil.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la expresión del sistema LIF/LIFR en ovario de rata Fértil y subfértil.
2. Determinar la acción del Factor Inhibitorio de Leucemia sobre los niveles de acetilcolina ovárica y sobre las enzimas encargadas de su síntesis y degradación en ovario de ratas fértiles, *ex vivo*.
3. Evaluar la acción del Factor Inhibitorio de Leucemia en los niveles de acetilcolina ovárica en ratas fértiles y subfértiles, *in vivo*.
4. Determinar la acción del Factor Inhibitorio de Leucemia en el reclutamiento inicial, ovulación y fertilidad de ratas, *in vivo*".

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

Se utilizaron 90 ratas hembra fértiles y subfértiles de la cepa Sprague-Dawley adquiridas en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, las cuales se mantuvieron a una temperatura de 22-23°C con ciclos de 12 h luz y 12 h de oscuridad, además de agua y alimento disponibles *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales en esta investigación fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales (CICUA) de la Universidad de Chile (número de protocolo: CBE2018-13 SP) y cumplieron con los lineamientos nacionales (CONICYT Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio).

Número de animales utilizados por objetivo:

Objetivo específico N° 1: 30

Objetivo específico N° 2: 24

Objetivo específico N° 3: 36.

Para el **objetivo n°1** se utilizaron 6 ratas de 2 meses de edad para realizar incubaciones *ex vivo* de ovarios durante 30 min y 24 ratas de 3 meses de edad para realizar incubaciones *ex vivo* durante 3 y 8 horas.

Para el **objetivo n°2**: 12 ratas fértiles y 12 ratas subfértiles a las cuales se les realizó implantación de bomba miniosmótica Alzet. De este grupo de animales, 6 ratas fértiles y 6 ratas subfértiles se utilizaron como sham (control de cirugía).

Para el **objetivo n°3**: 24 ratas fértiles (2 y 5 meses de edad) y 12 ratas subfértiles (8 meses de edad) a las cuales se les realizó implantación de bomba miniosmótica. De este grupo de animales, 12 ratas fértiles (6 de 2 meses y 6 de 5 meses de edad) y 6 ratas subfértiles se utilizaron como sham. Del grupo de ratas fértiles, 12 ratas (5 meses de edad) se utilizaron para realizar análisis morfométrico y 12 (2 meses de edad) para el experimento de fertilidad. Las 12 ratas subfértiles se utilizaron para realizar análisis morfométrico.

CICLICIDAD ESTRAL

Para determinar y evaluar la ciclicidad estral, se realizaron frotis vaginales diarios y se observaron al microscopio óptico (Fernandois et al., 2012). La ciclicidad estral de los animales fue determinada por lo menos dos semanas antes de la eutanasia de los animales utilizados para las incubaciones y por lo menos 2 semanas previas a la realización la cirugía de implantación de bomba, con la finalidad de conocer y confirmar el estado de la etapa reproductiva de las hembras. Luego de la cirugía de implantación de bomba miniosmótica, se continuó con la determinación de la ciclicidad estral de las hembras hasta el día de su eutanasia. La ciclicidad estral se determinó según el tipo de células encontradas en el frotis vaginal, las etapas del ciclo estral se clasificaron en: proestro, estro, metaestro y diestro, y el número de ciclos se determinó por el paso de proestro (P) a estro (E), seguido de diestro (D).

INCUBACIONES EX VIVO DE OVARIOS CON LIF

En primera instancia, para determinar el efecto de LIF sobre su receptor, se cuantificaron las proteínas STAT3 y pSTAT3. Para esto se utilizaron ovarios extraídos de ratas fértiles (dos meses de edad, n=6), los cuales se preincubaron durante 10 min en 2 mL de buffer krebs bicarbonato albumina (NaCl 118,6 mM; KCl 4,7 mM; KH₂PO₄ 1,2 mM; ácido ascórbico 100 µg/mL; NaHCO₃ 0,15 M; CaCl₂ 25 mM; albúmina 0,1 mg/mL; glucosa 11.2 µg/mL) a 37°C, bajo 95% aire y 5% de CO₂. Se probaron dos condiciones experimentales (6 ovarios por condición): control (tampón de Krebs-albúmina) o tratado farmacológicamente con LIF (tampón de Krebs-albúmina + 100 ng/mL a LIF) durante 30 min, seguido de homogeneización de los ovarios en tampón RIPA con un inhibidor de proteasa (cOmplete™, Roche) y fosfatasas (PhosSTOP™, Roche) y luego almacenamiento a -80°C para posterior determinación de proteínas.

En segunda instancia, para poder determinar el efecto de LIF sobre el sistema colinérgico intraovárico *ex vivo*, se extrajeron ovarios de ratas fértiles (tres meses de edad, n=6). Para este experimento se utilizó un total de 24 ratas, en donde los ovarios derechos se utilizaron como grupo control, mientras que los ovarios izquierdos fueron utilizados como grupo tratado farmacológicamente con 100 ng/mL de LIF. Los ovarios también fueron preincubados en 2 mL de buffer Krebs bicarbonato albumina por 10 min para luego probar las condiciones control y LIF durante 3 h y 8 horas (6 ovarios control y 6 ovarios LIF para cada tiempo de incubación). Finalizadas las incubaciones, los ovarios y los sobrenadantes fueron almacenados a -80° C para la posterior

medición de los transcritos de Chat y Ache (6 ovarios por condición), ACh y actividad AChE intraovárica (6 ovarios por condición) y ACh en medio de incubación (detalle en siguiente párrafo.

CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES INTRAOVÁRICOS DE ACh Y ACTIVIDAD DE AChE

Los ovarios fueron homogenizados en 10 volúmenes de PBS en hielo. Los niveles de ACh y la actividad AChE se determinó en el homogenizado y en sobrenadante utilizando el kit de ensayo Amplex® ACh/AChE (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones recomendadas por el proveedor (Urrea et al., 2016 y Riquelme et al., 2019). Los resultados representan la cantidad total de ACh en μmol por ovario y la actividad de AChE en U por ovario (donde una U se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1,0 μmol de ACh en colina y acetato por minuto a pH 8,0 a 37 °C, según lo indicado por el fabricante). El valor mínimo detectable para AChE fue 0,002 UI/mL y para ACh fue 0,3 mM (rango, 0,3 mM a 100 mM).

IMPLANTACIÓN DE MINIBOMBA OSMÓTICA PARA ADMINISTRACIÓN LOCAL DE LIF

36 ratas fértiles (12 ratas de 2 meses y 24 ratas de 5 meses de edad) y 24 ratas subfértiles (8 meses de edad) fueron sometidas a cirugía de implantación de bomba miniosmótica ALZET (modelo 2004, 0,25 $\mu\text{L/h}$, Alza Corp. Palo Alto, CA, EE. UU.). Los animales fueron anestesiados con dosis intraperitoneales de ketamina (60 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) en solución en condiciones asépticas. Como se describe en Lara et al., 2000, al grupo que se le administró LIF se le realizó una incisión lumbar media transversal, de $\sim 1,5$ cm de largo, en el área del flanco de un lado del animal para acceder a la bursa ovárica, con la finalidad de conectar la bomba a la bursa del ovario izquierdo con una cánula (SILASTIC, 0,64 mm DI \times 1,19 mm DE, CAT 508-003, Dow Corning Corp, Midland, MI, EE. UU.) para que, de esta forma, el ovario recibiera una concentración diaria de 100 ng/mL de LIF, durante 28 días. A hembras control (sham) solo se les implantó la cánula para simular las mismas condiciones que en las ratas del grupo tratado (LIF) (Lara et al., 2000). Para eliminar cualquier posible contribución de la esteroidogénesis ovárica contralateral, todos los animales sham y tratados con LIF fueron hemiovariectomizados en el momento de la implantación de la minibomba, de acuerdo con lo descrito por Ricu et al., 2012.

Finalizado el tratamiento de 28 días, las 24 ratas fértiles (6 meses de edad, luego del tratamiento) y 24 ratas subfértiles (9 meses de edad, luego del tratamiento) fueron eutanasiadas en la etapa de

estro. Del total de ovarios extraídos, un grupo de ovarios fértiles y subfértiles se almacenaron a -80° C para la posterior determinación de ACh intraovárica y actividad AChE, mientras que otro grupo de ovarios fértiles y subfértiles fueron fijados en solución de Bouin alcohólico para la realización de la técnica histológica y morfometría. La sangre fue almacenada a -80° C para la posterior medición de hormonas.

Para las ratas de 3 meses de edad (2 meses más un mes de tratamiento, aproximadamente), se las dejó con el macho durante la primera noche de proestro. Al día siguiente, a las hembras se les realizó frotis vaginal para evaluar espermio positivo, indicativo de que hubo copula y, por lo tanto, preñez (día 1 pc). Finalizada la preñez, 3 días post parto (p.p) las ratas fueron eutanasiadas y se les extrajo cuernos uterinos para evaluar parámetros de fertilidad.

EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL Y REACCIÓN DE RETROTRANSCRIPTASA REVERSA

Se utilizaron ovarios de ratas fértiles en diferentes etapas del desarrollo del ciclo estral y de ratas subfértiles para extraer el ARN total, tal como describen Chomczynski & Sacchi, 1987. La concentración de ARN total y su pureza (proporción de 260/280 nm) se midieron utilizando espectrofotómetro. Para evaluar la integridad del ARN total se realizó una electroforesis en gel de agarosa. Se transcribieron inversamente 5 μ g de ARN total utilizando la enzima SuperScript[®] II (Invitrogen[™], ThermoScientific) en un volumen de reacción final de 20 μ L (Fernandois et al., 2017).

REACCIÓN DE LA POLIMERASA EN CADENA CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL

Para cuantificar los niveles de ARNm, se realizó una reacción de polimerasa en cadena cuantitativa (qPCR, por sus siglas en inglés) utilizando el fluoróforo SybrGreen[™] (Brilliant II SYBR[®] Green QPCR Master Mix, Agilent Technologies) y los genes de interés se cuantificaron utilizando 33,3 ng de cDNA por reacción. Los partidores utilizados para qPCR se describen en la Tabla 1.

La mezcla para la reacción de PCR contenía 10 μ L de fluoróforo SybrGreen[™], 0,125 μ M de cada partidore, 2 μ L de ADNc y agua esterilizada para un volumen final de 20 μ L. Las reacciones de qPCR se realizaron utilizando un termociclador en tiempo real IQ5 (BioRad) en las condiciones indicadas en la Tabla 2. Todas las muestras para el análisis de RT-qPCR se analizaron por duplicado (sin transcriptasa inversa como control negativo) y los valores medios se usaron para determinar los niveles de ARNm. Las cuantificaciones relativas de ARNm de LIF, LIFR β , gp130, ChAT y AChE se realizaron usando ARNm de GAPDH como control de carga.

Tabla 1.- Partidores usados en RT- qPCR

Gen	Secuencias	Número de Acceso	Referencia
<i>Gapdh</i>	F: GATGCCCCATGTTTGTGAT R: GGTCATGAGCCCTTCCACAAT	NM_001289746.1	(Chen et al., 2014)
<i>Lif</i>	F: TCA ACT GGC TCA ACT CAA CG R:AAA GGT GGG AAA TCC GTC AT	NM_002309.4	
<i>Lifrβ</i>	F: CCAGATACTTGGCGAGAGTGGAG R: CGCTTGATGAACAGGACACATTG	NM_031048.1	(Fan et al., 2013)
<i>Gp130</i>	F: TGATGTCCAGAACGGATTCA R: GTGTATGCTGCCATGTGGAC	NM_001008725.3	(Simamura et al., 2010)
<i>Chat</i>	F: CTG GAG GGC CAC CTG GAT R: CTG GAT TTC ATT GTT TAT AAG TTT GAC AAC	XM_00106152	(Soret et al., 2010)
<i>Ache</i>	F: CAG CAA TAC GTG AGC CTG R: TTC AGG CTC ACG TAT TGC TG	NM_172009.1	(Urrea et al., 2016)

Tabla 2.- Condiciones para cada gen para qPCR.

Gen	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3
<i>Gapdh/Lif/ Gp130</i>	95°C por 5 Min	95° C for 15 s 60°C for 15 s 72°C for 15 s 74°C por 6 s para detección de fluorescencia	72°C por 7 min
<i>Lifrβ</i>	95°C por 5 min	95° C for 15 s 62°C for 15 s 72°C for 15 s 74°C for 6 s para detección de fluorescencia	72°C por 7 min
<i>Chat</i>	95°C por 5 min	95° C for 20 s 60°C for 20 s 72°C for 20 s 72°C for 6 s para detección de fluorescencia	72°C por 7 min
<i>Ache</i>	95°C por 5 min	95° C for 20 s 62°C for 15 s 72°C for 20 s 74°C for 6 s para detección de fluorescencia	72°C por 7 min

CUANTIFICACIÓN DE STAT3 Y pSTAT3 POR WESTERN BLOT

Se homogeneizaron ovarios de ratas fértiles (2 meses) mediante sonicación (35 % de potencia) en un sonicador OmniSonicRuptor 400 (Omni International) en buffer de lisis (tris-HCl 50 mM, pH = 8,0; EDTA 50 mM; SDS al 1 %; NaCl 50 mM; PMSF 0,5 mM; DTT 1 mM e inhibidor de proteasa y fosfatasa). La concentración de proteína total se determinó mediante el ensayo de Bradford (Bradford, 1976) usando una curva de calibración basada en albúmina de suero bovino (Winkler). STAT3 y p-STAT3 se cuantificaron por Western blot (WB) en condiciones reductoras (Fernandois et al., 2017). La detección ovárica de STAT3 y p-STAT3 se realizó con separación SDS-PAGE en geles de poliacrilamida con un gradiente de 4 a 20 %. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (0,45 μ m), se bloquearon con leche descremada al 5 % p/v en solución de TBST al 0,1 % v/v, durante 1 h con agitación suave y se incubaron con: anticuerpo monoclonal de ratón anti-STAT3 (sc-8019, Santa Cruz Biotechnology) y anticuerpo policlonal de conejo anti-pSTAT3 (AP0070 Abclonal) a una dilución de 1:1000 durante la noche. Los complejos de anticuerpos para pSTAT3 se detectaron utilizando anticuerpos IgG Fc (HRP) anti-conejo de cabra (ab97200, Abcam, Inc., Cambridge, Reino Unido) a una dilución de 1:5000 y los complejos de anticuerpos STAT3 se detectaron utilizando anticuerpos IgG HRP anti-ratón de cabra (31430, Invitrogen). Para la proteína constitutiva, se utilizó una dilución 1:40000 del anticuerpo anti-GAPDH policlonal de conejo (G9545, Sigma-Aldrich Co.) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los complejos de anticuerpos se detectaron usando un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo IgG Fc (HRP) a una dilución 1:10000. La quimioluminiscencia se obtuvo usando el kit EZ-ECL (Biological Industries, KBH) y se capturó utilizando el sistema Syngene G-Box.

INMUNOHISTOQUÍMICA LIF, LIFR β y ChAT

Se realizó inmunohistoquímica (IHQ) contra LIF, LIFR β y ChAT en secciones de ovarios de 5 μ m, fijados en Bouin alcohólico e incluidos en parafina. La recuperación antigénica se llevó a cabo utilizando buffer citrato 10 mM (pH = 6) en una vaporera a 100 °C durante 20 min para IHQ contra LIF y LIFR. Para IHQ contra ChAT, primero se permeabilizaron los cortes con tritón x100 al 0,1 % para luego realizar la recuperación antigénica con buffer 10 mM Tris/ 1mM en microondas a 800 W por 15 minutos. Para el bloqueo de peroxidasa, se utilizó una solución de peróxido de hidrógeno (3% en metanol) durante 20 min a temperatura ambiente y para el bloqueo inespecífico se utilizó una solución de suero equino (5% en 1X PBS) durante 30 min. Como anticuerpos primarios se utilizaron anti-LIF policlonal de conejo (PA1562, Boster Biological Technology Ltd., Pleasanton, CA, EE. UU.),

anti-LIFR policlonal de conejo (MBS 2002307, Mybiosource) ambos a una concentración de 10 µg/mL y anti-ChAT policlonal de cabra (AB144, Millipore Sigma, Burlington, Massachusetts, EE. UU.) en una dilución 1:500, todos incubados durante la noche. Se usó IgG anti-conejo de cabra (ab97200; Abcam Inc., Cambridge, Reino Unido) como anticuerpo secundario para LIF y LIFR β , a una dilución de 1:200 y una IgG anti-cabra de ratón a una dilución 1:1000, incubados durante 1 h. Después de incubar las muestras con estreptavidina-HRP por 1 h, se utilizó el kit ImmPACT VIP Peroxidase Substrate (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE. UU.) para detectar la señal cromogénica, según las instrucciones del fabricante. Las imágenes fueron obtenidas usando un microscopio de luz Olympus (modelo Olympus CX31, Tokio, Japón) con el software Micrometrics SE Premium 4 (ACCU-SCOPE, Inc, Commarck, NY, EE. UU.)

NIVELES DE HORMONAS SÉRICAS CUANTIFICADO POR ELISA

Concentraciones plasmáticas de las hormonas esteroides progesterona (P4), testosterona y estradiol (E2); las hormonas gonadotrópicas, FSH y LH; y la hormona AMH se determinaron por ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los números de catálogo de los kits para la medición de hormonas esteroidales fueron: 11-PROHU-E0,1 11-TESHU-E01 y 11-ESTHU-E01 para P4, testosterona y E2, respectivamente (Alpco Diagnostic); y CSB-EO6869r, CSB-E12654r y CSB-E11162r para FSH, LH y AMH (Cusabio Biotech, Wuhan, China), respectivamente.

Las variaciones intraensayo e interensayo para hormonas esteroides fueron <5 % para E2, <6 % paratestosterona y <5 % para P4. Los valores mínimos detectables fueron 0,1 y 0,02 ng/mL y 0,01 pg/mL, respectivamente. Las variaciones intraensayo e interensayo para hormonas gonadotrópicas y AMH fueron <10 % para FSH, <15 % para LH y <15 % para AMH, y los valores mínimos detectables fueron 0,07 y 0,15 mIU/mL y 0,1 ng/mL, respectivamente.

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE LOS OVARIOS

Ovarios de ratas de 6 meses de edad (5 meses más un mes de tratamiento, aproximadamente) de cada grupo (control y tratadas con LIF, n=6), fijados en solución Bouin alcohólico e incluidos en parafina, se cortaron en secciones de 5 µm y se tiñeron con hematoxilina y eosina. El análisis morfométrico de ovarios completos se realizó como se describió previamente (Lara et al., 2000). Las estructuras ováricas se clasificaron morfológicamente en: folículos primordiales (ovocito rodeado por una capa de células morfológicamente planas o alargadas llamadas pregranulosas), folículos

primarios (ovocito más una capa de células granulosas cúbicas (GC)), folículo secundario (sin cavidad antral pero con dos o más capas de GC), folículo antral (más de tres capas sanas de GC, el antro y el núcleo del ovocito claramente visible), folículo atrésico (más del 5% de las células granulosas con núcleos picnóticos en la sección transversal más grande y/o presentando encogimiento y ruptura ocasional de la vesícula germinal), cuerpos lúteos (mayor tamaño, ausencia de ovocito y el presencia de células lúteas en lugar de células de la granulosa), folículos tipo III (estructuras de gran tamaño, con varias capas de células granulosas e invasión de la capa de células de la teca hacia la capa mural de las células de granulosa, en algunos casos presentan ovocito) y quistes (estructuras de gran tamaño, sin la presencia de ovocito y con una capa muy delgada de células de granulosa). Todas las estructuras foliculares se contaron y midieron cuando se observó el folículo de mayor diámetro, Todas las secciones del ovario fueron evaluadas. Los folículos se contaron cuando se visualizó el núcleo del ovocito, y los cuerpos lúteos se analizaron en cada quinta sección y se incluyeron en el conteo cuando el cuerpo lúteo alcanzó la sección transversal más grande.

EXPERIMENTO DE FERTILIDAD

A ratas de 2 meses de edad a las cuales se les administró LIF mediante minibomba osmótica se aparearon con un macho fértil la noche del primer proestro post tratamiento. Se comprobó la presencia de espermios en el tapón vaginal al día siguiente, tanto en ratas de control como en las tratadas con LIF. Las ratas con espermio positivos fueron asignadas con el día 1 de gestación. Durante el parto, se contaron las crías nacidas y se mantuvieron con la madre durante 3 días. En el día 3 las madres fueron eutanasiadas para verificar los puntos de implantación en los cuernos uterinos y las crías fueron derivadas a otra madre lactante (Urrea et al., 2016).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresaron como la media \pm error estándar medio (SEM). Para examinar las diferencias estadísticas, primero se determinó la distribución normal de los datos, usando la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, y para evaluar a 2 grupos se utilizó la prueba t de Student o Mann-Whitney, con respecto a cómo se distribuyeron los datos. Cuando se analizaron tres o más grupos, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis con pruebas de comparaciones múltiples. Todos los análisis estadísticos se realizaron con Prism GraphPad 6 (GraphPad Software, San Diego, California, EE. UU.).

El número de animales fue calculado como el número mínimo de animales de acuerdo con la variabilidad de los procedimientos experimentales y la variación intrínseca entre ellos. El número

mínimo de animales, para las técnicas de RT- qPCR, western blot, inmunohistoquímica y análisis morfométrico fue calculado según la siguiente ecuación: (JH Zar, Biostatistical Analysis 2nd Ed. Prentice Hall NJ. Capítulo 9.7: “Power and Samples size in test for difference between two means”. pp134-138).

$$n= 2(Z\alpha+Z\beta)^2 \times S^2/d^2$$

Donde n=número de animales para cada condición; S=desviación estándar; d=diferencia que se necesita para obtener significancia estadística; $Z\alpha$ =la probabilidad de error tipo I (nivel de confianza, significancia); $Z\beta$ =la probabilidad de error tipo II (potencia estadística). Si proponemos que $\alpha=0,05$, entonces $Z\alpha=1,96$; $\beta= 0,10$, entonces $Z\beta=1,282$; $S=0,2$; y d, la diferencia más pequeña de la población, es 0,4 se obtiene un $n=5,255$. Por lo tanto, para obtener una diferencia estadísticamente significativa de $p<0,05$ se necesita un mínimo de 6 observaciones por grupo de estudio.

RESULTADOS

OBJETIVO 1: “Determinar la expresión del sistema LIF/LIFR en ovario de rata fértil y subfértil”.

LIF y su receptor (que incluyen las subunidades LIFR β y gp130) se han descrito en diferentes modelos de estudio tanto *in vivo* como *in vitro*, pero no han sido descritos en ovario de rata adulta. Para establecer si LIF se expresa en ovario de rata adulta, se evaluó en la etapa fértil (2 meses de edad) y subfértil (8 meses de edad). Los resultados muestran que tanto el ARNm LIF (fig. 3a) como la proteína de LIF (fig. 3b y 3c) están presentes en el ovario de rata adulta. A pesar del aumento significativo que se observa en el ARNm LIF en ovario de ratas subfértiles (fig. 3a), los niveles proteicos de LIF están aumentados (fig. 3b y 3c). La determinación del ARNm de LIF durante las fases del ciclo estral en ovario de ratas fértiles muestra un aumento significativamente durante las etapas de estro y meta/diestro (fig. 3d). Finalmente, se observó que *Lifr β* y *Gp130* (fig. 3e y 3f, respectivamente), se expresan en ovario de rata adulta y que esta expresión aumenta en ratas subfértiles en comparación a ratas fértiles.

Para establecer en qué tipo de células y estructuras ováricas se expresan LIF y LIFR β en ovario de ratas fértiles, se realizó IHQ. Se detectó inmunoreactividad positiva para LIF en CG y CT de folículos antrales de diferentes tamaños (fig. 3g y 3i), en células lúteas de CLs de diferentes tamaños (Fig. 3g y 3h) y en ovocitos de folículos antrales (fig. 3i), similar a lo observado con LIFR β (CG y CT, Fig. 3j y 3l; células de CL, fig. 3j y 3k; ovocito, fig. 3l).

Es importante destacar también que se observó inmunotinción para LIF en folículos primordiales y primarios tanto en CG como en ovocitos (fig. suplementaria 1a) e inmunotinción para LIFR β en folículos secundarios, levemente en ovocito y en algunas CG de este tipo de folículos (fig. suplementaria 1b).

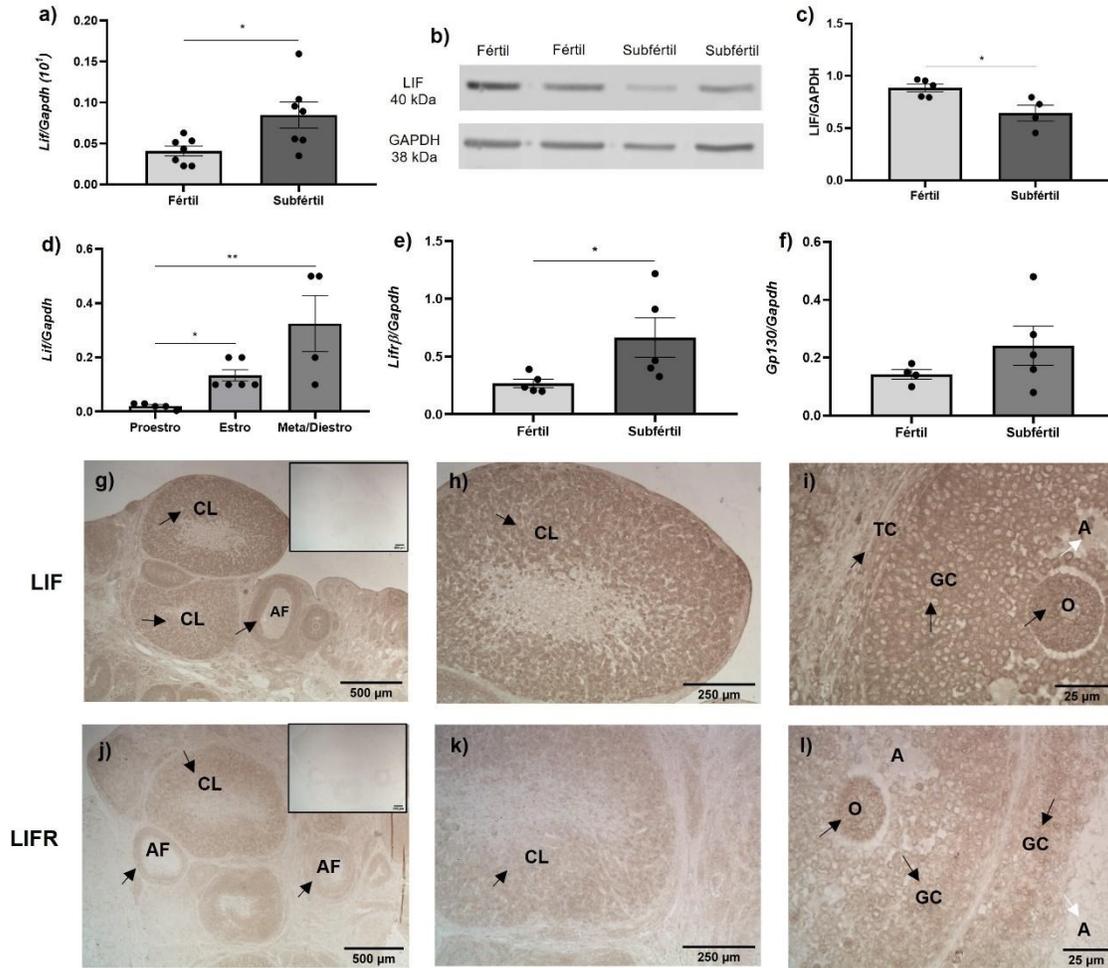


Figura 3.- LIFR y gp130 están presentes en las diferentes estructuras foliculares del ovario de rata.

a) Niveles de *Lif* por qPCR de ovarios de rata fértiles (n=7) y subfértiles (n=7). **b)** Membranas WB representativas y **c)** cuantificación por densitometría para detectar LIF en ovario de rata fértil y subfértil (fértil n= 5; subfértil n=4) (datos en colaboración con Constanza Vargas). **d)** Niveles de ARNm de *Lif* por qPCR en proestro, estro y metaestro/diestro de ovarios de rata fértiles (proestro n= 5; estro n=6; meta/diestro n= 4). **e)** Niveles de *Lifrβ* por qPCR en ovario de rata fértil (n= 5) y subfértil (n=5). **f)** Niveles de *Gp130* por qPCR en ovario de rata fértil (n= 4) y subfértil subfértil (n=5). IHQ para LIF (fotomicrografías superiores; **g**), **h**) e **i**) y LIFRβ (fotomicrografías inferiores; **j**), **k**) y **l**). En la parte superior derecha de la fig. **g**) y **j**) se encuentra el control blanco respectivo, donde no se usó el anticuerpo primario. Las flechas negras indican inmunoreactividad positiva para CL: cuerpo lúteo, AF: folículo antral; TC: células de la teca; GC: células de la granulosa; O: ovocito. Las flechas blancas indican A: antro. Media \pm SEM, a), c), e) y f) t test con corrección de Welch, d) prueba de Kruskal-Wallis con prueba de comparaciones múltiples, *p < 0,05, **p < 0,01.

LIF AUMENTA LAS FORMAS FOSFORILADAS DE STAT3 EN OVARIOS DE RATAS FÉRTILES

Para evaluar si LIF promueve la fosforilación de STAT3 en Y705 (el sitio de fosforilación inducida por JAK1) y, por lo tanto, la activación de la cascada de señalización de JAK1/STAT3, se incubaron ovarios de ratas fértiles durante 30 min con LIF para una posterior evaluación de los niveles de STAT3 y pSTAT3 mediante WB. Al cuantificar los niveles de STAT3 ovárico, no se observó cambio cuando los ovarios se incubaron con LIF (fig. 4a panel superior y 4b), no así en los niveles de pSTAT3, los cuales aumentaron en ovarios de ratas fértiles después de los 30 minutos de incubación con LIF (fig. 4a panel inferior y 4c) respecto al grupo control. Finalmente, cuando se evaluó la relación pSTAT3/STAT3, esta aumentó en comparación con el control (fig. 4d).

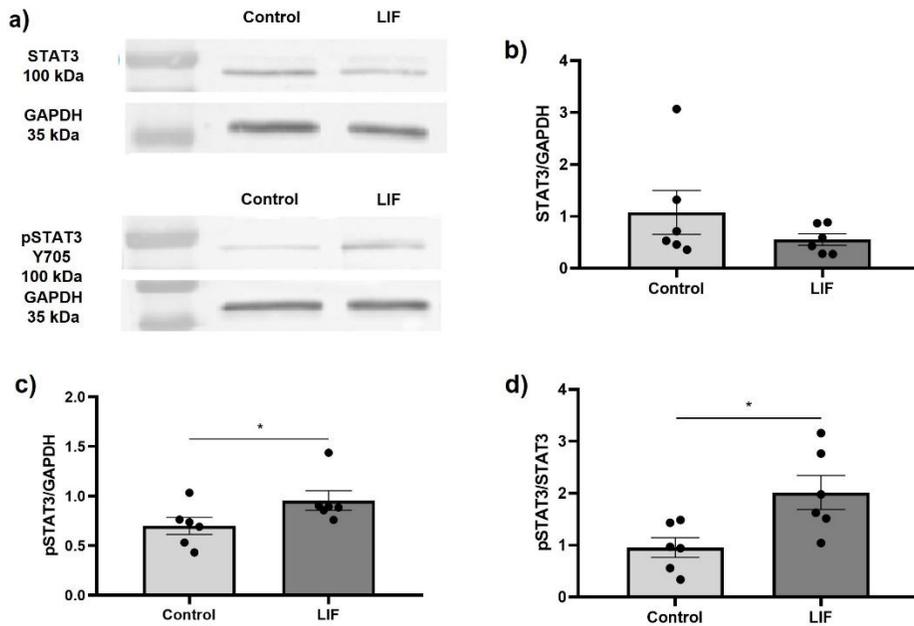


Figura 4.- LIF aumenta la forma fosforilada de STAT3 en ovarios de ratas fértiles.

Ovarios de ratas fértiles fueron incubados con 100 ng/mL de LIF durante 30 min para posteriormente medir por WB los niveles de STAT3 y pSTAT3 en Y705. **a)** Imagen representativa del WB para STAT3 (panel superior) y pSTAT3 (panel inferior); **b)** niveles de STAT3; **c)** niveles de pSTAT3 y **d)** relación pSTAT3/STAT3 (colaboradores Matías Rubio). Control, n = 6 y LIF n = 6. Media \pm SEM, **c)** prueba de Mann-Whitney y **d)** t test con corrección de Welch, *p < 0,05.

RESUMEN OBJETIVO 1

- LIF y LIFR β se expresan en diferentes tipos celulares en ovario de ratas fértiles, localizándose específicamente en CT y CG de folículos antrales, ovocito y células lúteas de CLs.
- LIF se expresa en ovarios de rata fértiles diferencialmente, dependiendo del estado del ciclo estral en el que se encuentre la rata.
- LIF induce la fosforilación de STAT3 en ovarios de ratas fértiles incubados por 30 min.
- LIF se expresa en ovarios de rata subfértiles.

OBJETIVO 2: “Determinar la acción del Factor Inhibitorio de Leucemia sobre los niveles de acetilcolina ovárica y sobre las enzimas encargadas de su síntesis y degradación en ovario de ratas fértiles, *ex vivo*”.

LIF AUMENTA LA LIBERACIÓN DE ACh EN OVARIO INCUBADO POR 3 HORAS

Para evaluar el efecto de LIF sobre la liberación de ACh al medio, se determinaron los niveles de ACh ovárica en medio de incubación mediante método de detección fluorimétrico (kit de ensayo Amplex® ACh/AChE) posterior a incubaciones de 3 y 8 h. Luego de la incubación de ovario *ex vivo* por 3 h con LIF, se pudo observar un aumento significativo de ACh en el medio de incubación respecto a lo observado con el control (fig. 5a), sin embargo, no se observó cambios en la liberación

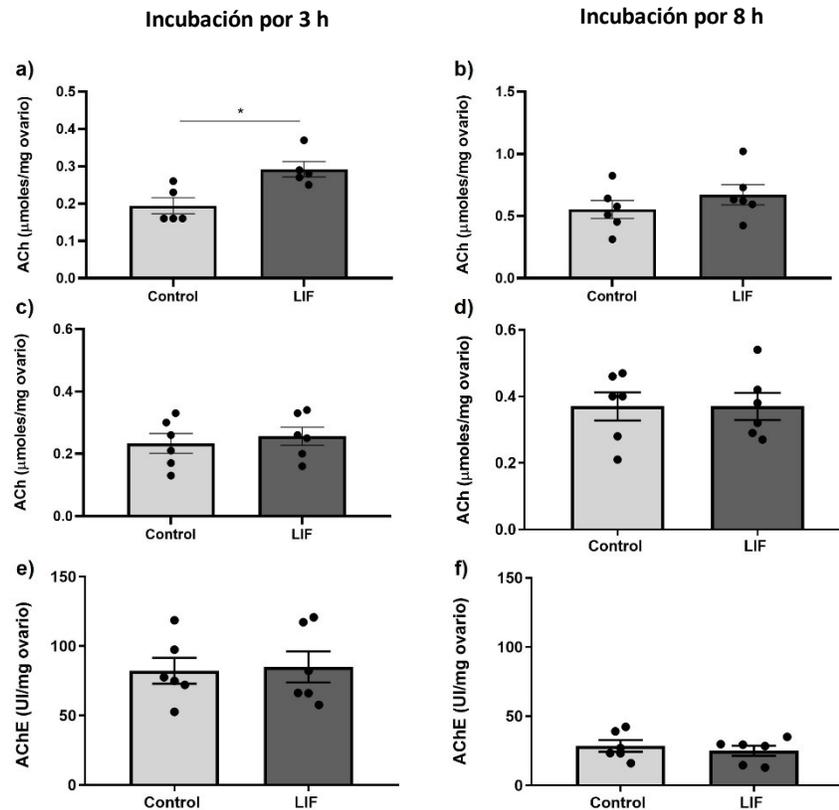


Figura 5.- LIF aumenta la liberación de ACh a las 3 horas de incubación, *ex vivo*.

a) Liberación de ACh al medio de incubación a las 3 h de incubación (control n= 5, LIF n=5) y **b)** Liberación de ACh al medio de incubación a las 8 h de incubación (control n=6, LIF n=6); **c)** Contenido ovárico de ACh a las 3 h de incubación **d)** contenido ovárico de ACh y a las 8 h de incubación (control n=6, LIF n=6). **e)** actividad AChE ovárica (control n=6, LIF n=6) a las 3 h y **f)** actividad AChE ovárica a las 8 h de incubación en un medio Krebs- Bicarbonato- Albumina pH 7.4 (Control) o junto con 100 ng/mL de LIF. Todos los datos son presentados como el promedio ± error estándar medio (SEM, por sus siglas en inglés). t test con corrección de Welch, * P < 0.05.

de ACh al medio a las 8 h de incubación (fig. 5b). Además, se obtuvo un aumento en los niveles de ACh a las 8 h de incubación comparado con las 3 horas, tanto en la condición LIF como en el control. La incubación con LIF no modifica los niveles intraováricos de ACh a las 3 horas (fig. 5c) ni a las 8 horas de incubación (5d). La actividad AChE no es afectada por LIF a las 3 horas (fig. 5e) y no cambia a las 8 h (5f).

LIF DISMINUYE EL ARNm DE *Chat* Y *Ache* EN OVARIOS INCUBADO POR 3 HORAS

Los resultados muestran que, cuando los ovarios son incubados con LIF por 3 h, disminuye tanto *Chat* como de *Ache* en relación con los controles respectivos (fig. 4a y 4c, respectivamente), sin observar cambios en los niveles de ARNm a las 8 h de incubación (fig. 4b y 4d).

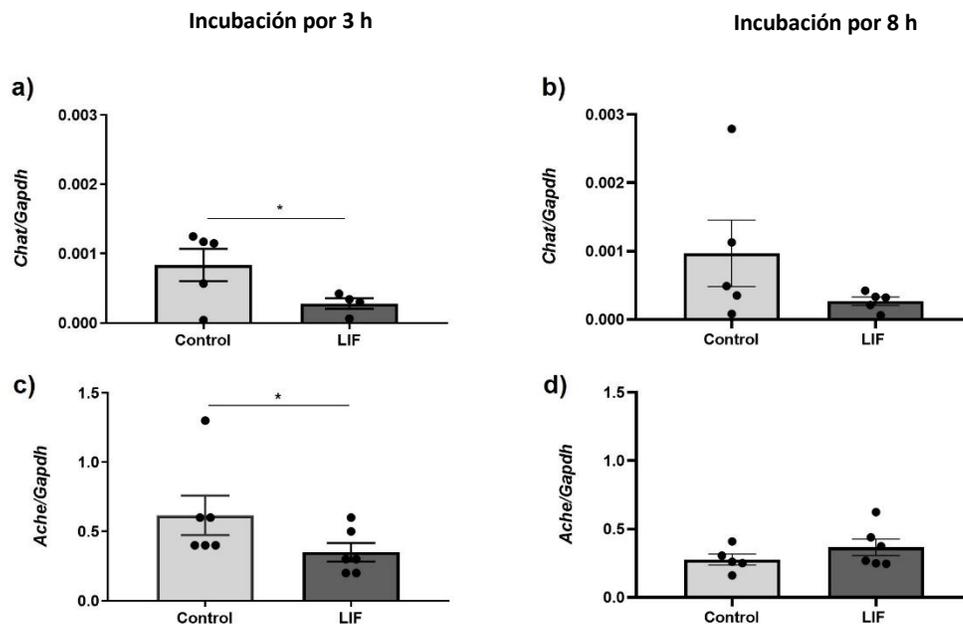


Figura 6.- LIF disminuye los niveles de *Chat* y *Ache* en ovarios incubados por 3h.

Los niveles de ARNm fueron cuantificados por PCR en tiempo real. **a) y b)** contenido de *Chat* a las 3 h y 8 h de incubación, respectivamente. **c) y d)** contenido de ARNm que codifica para *Ache* a las 3 h de incubación y a las 8 h de incubación respectivamente. Los ovarios fueron incubados con un tampón Krebs- Bicarbonato- Albumina pH 7.4 (control) y LIF contiene el mismo medio más 100 ng/mL de LIF. Los datos de ARNm fueron normalizados por *Gapdh* y son presentados como el promedio \pm SEM, t test con corrección de Welch y Test Man-Whitney (**a y c**, respectivamente) * P < 0.05.

Por razones técnicas y metodológicas no fue posible cuantificar ChAT por WB. Se probaron dos anticuerpos contra ChAT (Santa Cruz [n° catálogo sc-55557] y Millipore Sigma [n° catálogo AB144]), con los cuales no fue posible identificar la banda asociada a esta proteína en ovario de rata. Sin embargo, se realizó IHQ con el anticuerpo Millipore Sigma, obteniendo inmunoreactividad positiva para ChAT en células estromales y en ovocitos de algunos folículos (fig suplementaria 3b). Además, se pudo observar inmunorreactividad positiva para ChAT en células luteinizadas de CLs (fig. suplementaria 3b y 3d).

RESUMEN OBJETIVO 2

- LIF tiene un efecto agudo (3 h) sobre ciertos componentes colinérgicos en ovario, aumentando la liberación de ACh y disminuyendo los niveles de transcrito para *Chat* y *Ache* en ovarios de ratas fértiles en un modelo *ex vivo*.
- No se observó un efecto de LIF sobre los parámetros determinados a las 8 h de incubación.

OBJETIVO 3: “Evaluar la acción del Factor Inhibitorio de Leucemia en los niveles de acetilcolina ovárica en ratas fértiles y subfértiles, *in vivo*.”

Para poder llevar a cabo este objetivo, se utilizaron ratas fértiles y ratas subfértiles. A todos los animales se les realizó hemiovariectomía del ovario derecho e implantación de solo la cánula o implantación de minibomba osmótica en ovario izquierdo para administrar 100 ng/mL de LIF durante 28 días. Se evaluó la ciclicidad estral y los pesos de todos los animales, pre y post cirugía. La eutanasia se realizó cuando los animales se encontraban en etapa de estro para evitar la diferencia hormonal de la ciclicidad estral. Los ovarios fueron recolectados para la determinación de ACh ovárica y actividad AChE, y suero para determinación de hormonas esteroidales sexuales (progesterona, testosterona y estradiol).

LIF NO PRODUCE CAMBIOS EN EL PESO Y CICLICIDAD ESTRAL DE RATAS FÉRTILES NI SUBFÉRTILES

Para asegurar que el tratamiento con LIF tuviese un efecto local sobre el ovario y descartar un efecto sistémico, se evaluó durante todo el tratamiento el peso de los animales. Tanto en el caso de las ratas fértiles (fig. suplementaria 4a) como subfértiles (fig. suplementaria 4b) no se observaron cambios significativos en los pesos promedio de los animales al final del tratamiento.

Pre y post cirugía de implantación de bomba con LIF, se evaluó de forma indirecta la función ovárica de las ratas mediante frotis vaginal, para determinar su ciclicidad estral (fig. suplementaria 5 y fig. suplementaria 6) (Goldman et al., 2007; Cora et al., 2015). La determinación de la ciclicidad estral permite relacionar los niveles hormonales de los esteroides con la funcionalidad del ovario y así clasificar de una forma indirecta la fertilidad en ratas fértiles. Es importante mencionar que las ratas subfértiles presentan una ciclicidad irregular (característica específica de este periodo de la vida reproductiva de la rata). En la fig. suplementaria 7 se puede observar que, al cuantificar el número de ciclos estrales por rata (proestro seguido de estro y metaestro), no existen diferencias entre ratas Sham versus LIF en periodo fértil (fig. suplementaria 7a) ni subfértil (fig. suplementaria 7b). A pesar de no encontrar diferencias en el número de ciclos estrales por rata, en los grupos controles de hembras fértiles y subfértiles se observan claramente dos poblaciones de animales: aquellas que ciclan normalmente y aquellas que presentan menor a dos ciclos estrales durante todo el tratamiento.

Para complementar lo anterior, se midió los niveles séricos de las hormonas esteroidales sexuales progesterona, testosterona y estradiol al final del tratamiento. Se pudo observar un aumento en los

niveles de progesterona sérica en ratas fértiles que fueron tratadas con LIF por 28 días (fig. 7a), sin observar cambios en ratas subfértiles (fig. 7b). Tanto testosterona (fig. 7c y 7d) como estradiol (fig. 7e y 7f) no mostraron cambios al tratar ratas fértiles (fig. 7c y 7e) y subfértiles (fig. 7d y 7f) con LIF durante 28 días.

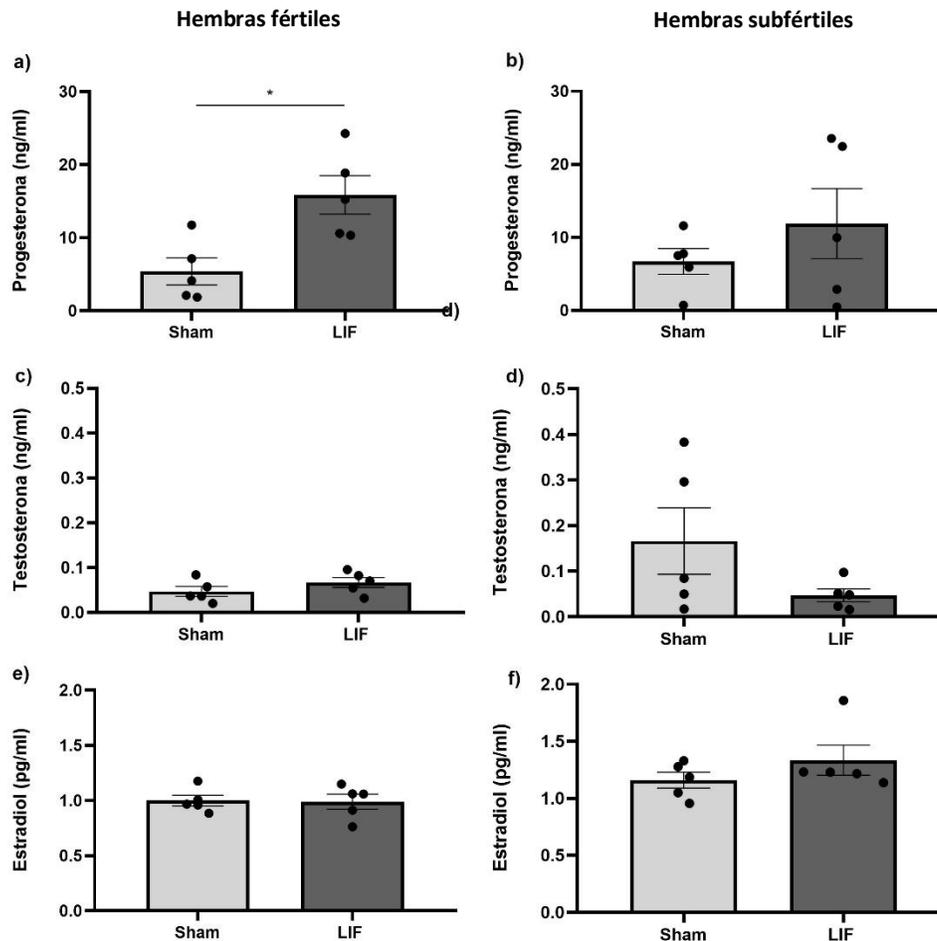


Figura 7.- LIF aumenta los niveles séricos de progesterona en ratas fértiles.

a) y b) Niveles séricos de progesterona, **c) y d)** de testosterona y **e) y f)** de estradiol en ratas fértiles (**a, c y e**) y ratas subfértiles (**b, d y e**), las cuales fueron hemiovariectomizadas y se les implantó una minibomba osmótica para la administración local de 100 ng/mL de LIF (LIF, n=5) en el ovario durante 28 días. Como control, se implantó solo la cánula en el ovario (Sham, n=5). Todos los datos son presentados como el promedio \pm SEM, Test t con corrección de Welch, * P < 0.05.

LIF DISMINUYE LA ACTIVIDAD DE ACHE EN OVARIOS DE RATAS FÉRTILES.

Como en el *Objetivo 2* se observó que LIF produce cambios importantes en componentes colinérgicos *ex vivo*, como la disminución en los transcritos de *Chat* y *Ache*, y un aumento en la liberación de ACh al medio en ovarios incubados por 3 horas. Se evaluó el efecto crónico de LIF sobre el contenido de ACh y la actividad AChE intraovárica *in vivo*, tanto en ovarios de ratas fértiles como subfértiles. Luego de cumplido el tratamiento de 28 días y realizada la eutanasia de los animales en la etapa de estro, se extrajeron los ovarios y se determinó el contenido de ACh, y la actividad AChE en homogenizado de ovario mediante método fluorimétrico. El tratamiento con LIF durante 28 días induce una disminución en la actividad AChE ovárica en ratas fértiles (fig. 8c). No se observó cambios en el contenido ovárico de ACh en ratas fértiles y subfértiles (fig. 8a y 8b, respectivamente), ni en la actividad AChE en ovario de ratas subfértiles (fig. 8d).

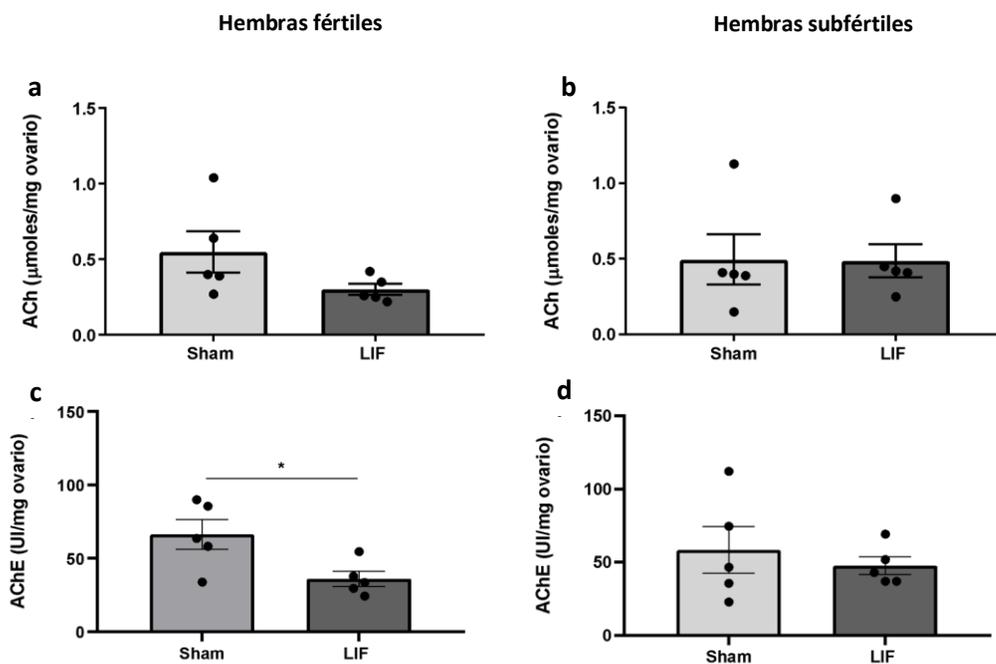


Figura 8.- LIF disminuye la actividad AChE en ovario de ratas fértiles, *in vivo*.

Se muestra en **a) y b)** los Niveles de ACh intraovárico y en **c) y d)** la actividad AChE en ovario de ratas en periodo fértil (**a y c**) y en periodo subfértil (**b y d**). Las ratas fueron hemiovariectomizadas y se les implantó una minibomba osmótica para la administración local de 100 ng/mL de LIF (LIF, n=5) en el ovario durante 28 días. Como control, se implantó solo la cánula en el ovario (Sham, n=5). Todos los datos son presentados como el promedio \pm SEM, ttest t con corrección de Welch, * P < 0.05.

RESUMEN OBJETIVO 3

- El tratamiento crónico con LIF induce un aumento en los niveles séricos de progesterona en ratas fértiles, sin alterar los niveles de testosterona ni estradiol en ratas fértiles ni subfértiles.
- El tratamiento con LIF no afecta el peso de los animales ni la ciclicidad de ratas fértiles y subfértiles.
- La administración de LIF produce una disminución en la actividad AChE en ovario de rata fértil, sin alterar la actividad en ratas subfértiles. Por otro lado, no produce cambios en los niveles de ACh ovárica de ratas fértiles y subfértiles.

OBJETIVO 4: “Determinar la acción del Factor Inhibitorio de Leucemia en el reclutamiento inicial, ovulación y fertilidad de ratas, *in vivo*”.

Como no existen datos sobre el efecto crónico de LIF sobre el desarrollo folicular en un modelo *in vivo* ni antecedentes de su efecto sobre ovario de rata adulta, en este trabajo se evaluó el efecto crónico de LIF sobre el desarrollo folicular de ratas fértiles y subfértiles, y la fertilidad de ratas fértiles. Para esto se realizó hemiovariectomía de ovario derecho e implantación de minibomba osmótica en ovario izquierdo de ratas fértiles y subfértiles, y finalizado el periodo de tratamiento, las ratas fueron eutanasiadas, se les extrajo el ovario para el posterior análisis morfométrico y suero para evaluar hormonas esteroidales sexuales (progesterona, testosterona y estradiol), hormonas gonadotrópicas LH y FSH, y AMH. A otro grupo de ratas fértiles se les realizó el mismo procedimiento de implantación de bomba mini osmótica para administrar LIF, pero luego de cumplido el periodo de tratamiento, las ratas fueron preñadas y finalizada la preñez se evaluó parámetros de fertilidad, como puntos de implantación en cuernos uterinos y número de crías vivas.

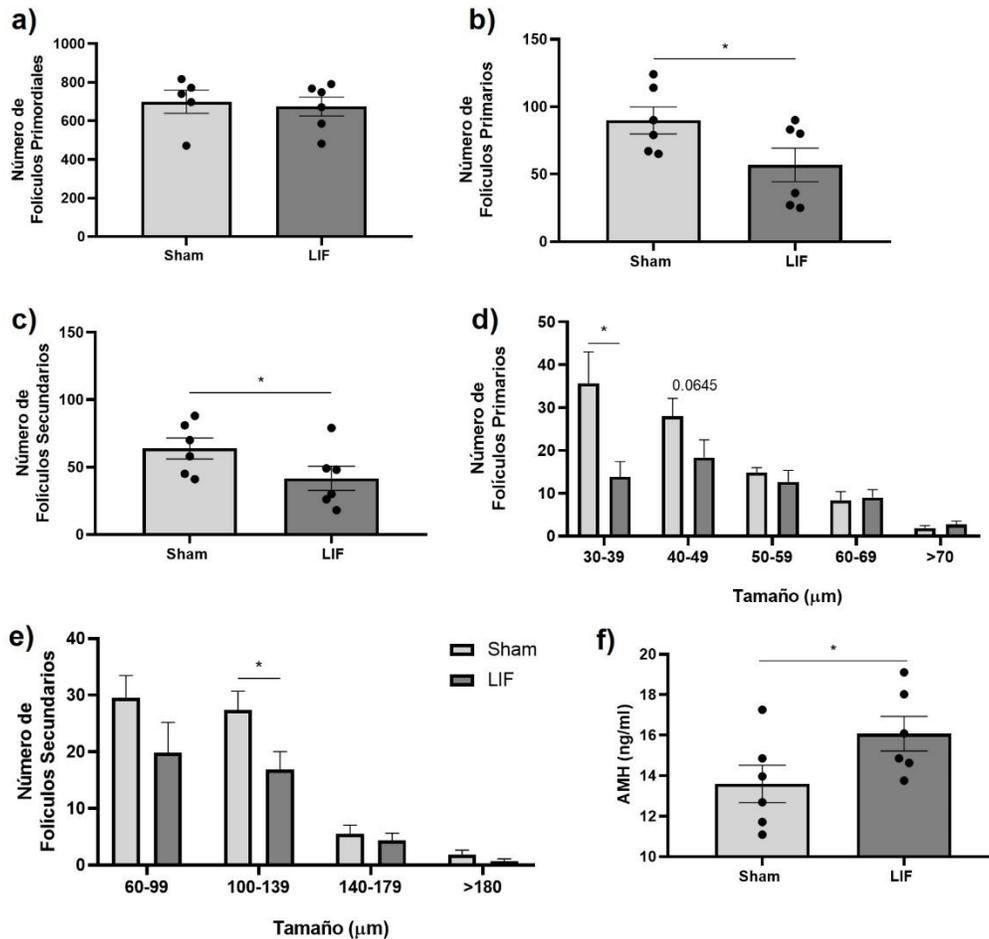
Con el propósito de un mejor orden en la presentación de estos resultados, se presentarán primero los resultados morfométricos obtenidos de ratas fértiles, posteriormente los resultados morfométricos obtenidos en ratas subfértiles y finalmente los resultados obtenidos respecto al experimento de fertilidad en ratas fértiles.

LIF DISMINUYÓ EL RECLUTAMIENTO INICIAL Y EL CRECIMIENTO DE FOLÍCULOS PREANTRALES EN OVARIO RATA FÉRTIL

Para determinar si LIF participa en la etapa inicial del desarrollo folicular, se evaluó el reclutamiento inicial en ovario de rata fértil posterior al tratamiento crónico con LIF. El análisis morfométrico mostró que el número de folículos primordiales no cambió respecto al control, cuando los ovarios son tratados por 28 días con LIF (fig. 9a), pero el número de folículos primarios y secundarios si disminuyó con el tratamiento (fig. 9b y 9c respectivamente).

Respecto al resultado anterior y para evaluar si la disminución de folículos primarios y secundarios con el tratamiento con LIF se debe a la promoción de la transición de folículos preantral o en desarrollo a folículo antral, se determinó el tamaño de folículos primarios y secundarios. Los resultados muestran una disminución de los folículos primarios de tamaño pequeño (30–39 μm , fig. 9d) y de folículos secundarios de tamaño mediano (100–139 μm , fig. 9e) con el tratamiento con LIF. Finalmente, para complementar el resultado anterior, se midió la AMH sérica, ya que AMH es un

buen marcador de la reserva folicular ovárica y se encontró un aumento de AMH sérica en aquellas ratas que fueron tratadas con LIF (fig. 9f).



A ratas fértiles hemiovariectomizadas se les implantó una minibomba osmótica en el ovario izquierdo para la administración local de 100 ng/mL de LIF durante 28 días. Después del tratamiento, los animales fueron eutanasiados y se les extrajo suero para la medición de hormonas y ovarios, para análisis morfométrico (LIF, n = 6). “Sham” corresponde a los animales control a los cuales solo se les implantó la cánula (Sham, n = 6). **a)** Número de folículos primordiales por ovario; **b)** número de folículos primarios por ovario; **c)** número de folículos secundarios por ovario; **d)** distribución de tamaño de folículos primarios por ovario; **e)** distribución de tamaño de folículos secundarios por ovario y **f)** niveles séricos de AMH por rata. Todos los resultados son por rata y se expresaron como la media \pm SEM, prueba t con corrección de Welch, *p < 0,05.

LIF DISMINUYE EL NÚMERO DE FOLÍCULOS ANTRALES SANOS SIN MODIFICAR EL NÚMERO DE FOLÍCULOS ANTRALES ATRÉSICOS EN OVARIOS DE RATA FÉRTIL

En base a los resultados observados anteriormente (fig. 9) y para evaluar si efectivamente LIF está promoviendo la transición de folículo preantral a folículo antral, se evaluó el efecto de esta citoquina en el crecimiento y número de folículos antrales. La administración de LIF induce una disminución en el número de folículos antrales totales (fig. 10a), principalmente porque el número de folículos antrales sanos disminuye drásticamente (fig. 10b), sin observar cambios en los folículos antrales atrésicos (fig. 10c). Para determinar si estos resultados se deben a que disminuye el paso de folículo secundario a antrales o si se debe a un desplazamiento acelerado hacia folículos prevulatorios y cuerpos lúteos, se evaluó el tamaño de los folículos antrales sanos. Los resultados muestran que los folículos antrales pequeños (rangos de 100–199 y 200–299 μm , fig. 10d) disminuyeron significativamente. Por último, para esclarecer si la disminución en folículos antrales pequeños se podría deber a un aumento en el reclutamiento cíclico (Mcgee & Hsueh, 2000), se midieron los niveles de hormonas gonadotrópicas FSH y LH al final del tratamiento con LIF, sin observar cambios en las gonadotropinas. (fig. 10e y 10f).

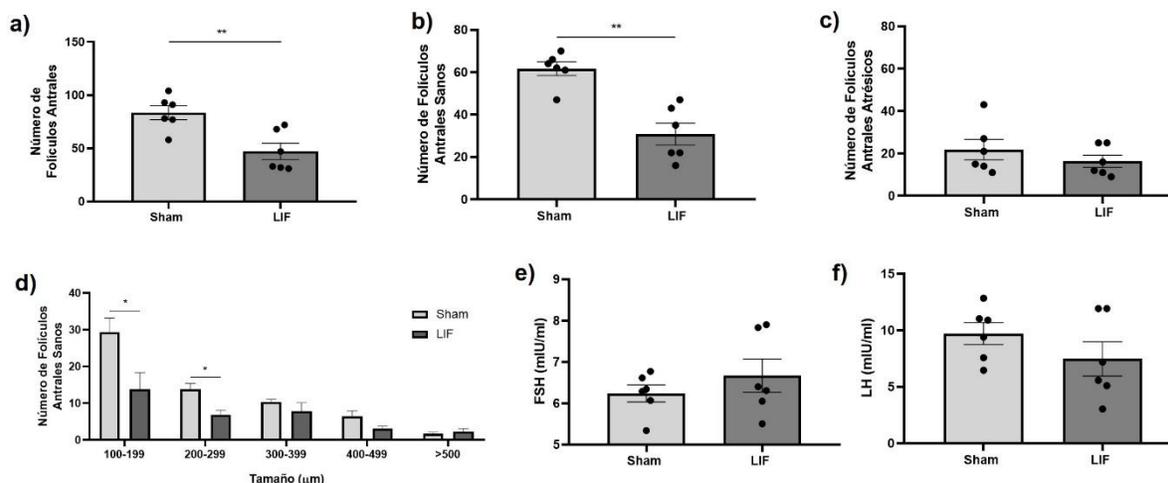


Figura 10.- LIF disminuyó el número de folículos antrales sanos, sin producir cambios en el número de folículos antrales atrésicos en ratas fértiles, *in vivo*.

Ratas fértiles hemiovariectomizadas fueron implantadas con una mini bomba osmótica para la administración local de 100 ng/mL de LIF en ovario durante 28 días. Finalizado el tratamiento, los animales fueron eutanasiados y se les extrajo suero para la medición de hormonas y ovario, para análisis morfométrico (LIF n=6). “Sham” corresponde a los animales control que sólo fueron implantados con la cánula (Sham n=6). **a)** Número de folículos antrales totales por ovario; **b)** número de folículos antrales sanos por ovario; **c)** número de folículos antrales atrésicos por ovario; **d)** distribución de tamaño de folículos antrales sanos por ovario; **e)** niveles de FSH en suero y **f)** niveles de LH en suero por rata. Todos los resultados fueron expresados como la media \pm SEM, prueba t con corrección de Welch, *p < 0,05, **p < 0,01.

LIF AUMENTA EL NÚMERO DE CUERPOS LÚTEOS DE GRAN TAMAÑO Y LOS NIVELES DE PROGESTERONA EN OVARIO DE RATAS FÉRTILES

Como se observó en el *objetivo 1*, LIF y sus receptores están presentes en ovario, observándose mediante IHQ que LIF y LIFR estaban presentes en CLs. Además, se encontró que la población de folículos antrales sanos estaba disminuida, sin cambios en la de folículos antrales atrésicos, con el tratamiento con LIF. Para poder determinar si la disminución en la población de folículos antrales sanos se debe a un aumento acelerado en el reclutamiento cíclico y, por ende, a un aumento en el proceso ovulatorio y formación de CLs, se cuantificaron los CLs mediante análisis morfométrico y se midieron los niveles séricos de las hormonas esteroidales progesterona, testosterona y estradiol. Con respecto al número de CLs, se observó una tendencia al aumento cuando los ovarios fueron tratados con LIF (fig. 11d) y cuando se evaluó la distribución de tamaño de CLs, los resultados mostraron un aumento significativamente de los cuerpos lúteos grandes (más de 800 μm , fig. 11e). Al evaluar las hormonas esteroidales séricas, se detectaron niveles elevados de progesterona sérica (fig. 11a), acordes al aumento de los cuerpos lúteos de gran tamaño, sin observar cambios en los niveles de testosterona (fig. 11b) y estradiol (fig. 11c)

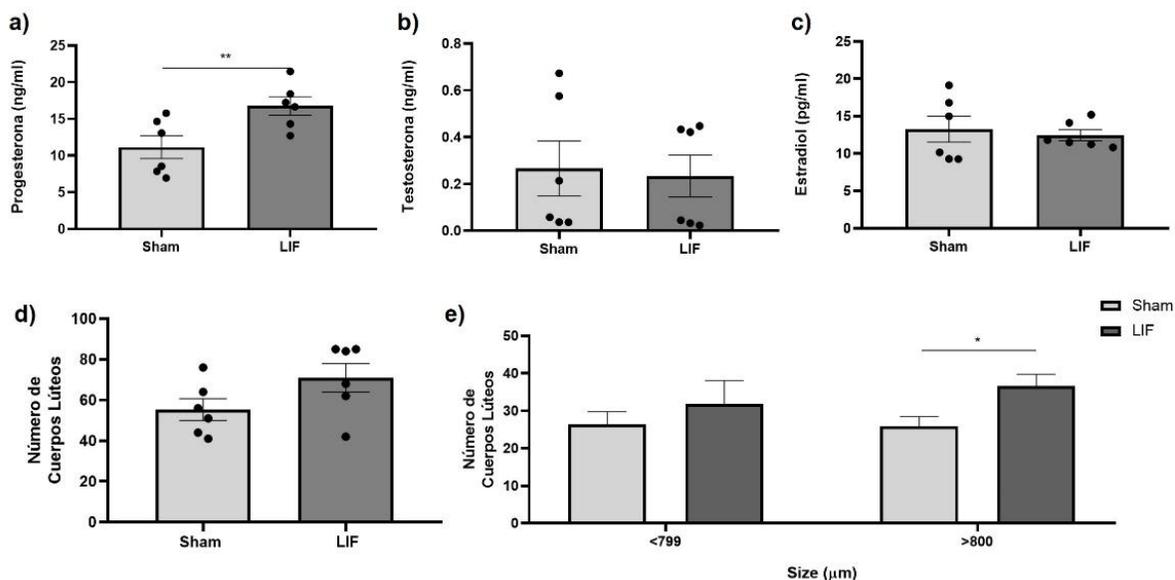


Figura 11.- LIF aumenta el número de cuerpos lúteos grandes y los niveles de progesterona en ratas fértiles, *in vivo*.

A ratas fértiles hemiovariectomizadas se les implantó una minibomba osmótica en el ovario izquierdo para la administración local de 100 ng/mL de LIF durante 28 días. Finalizado el tratamiento, los animales fueron eutanasiados y se les extrajo suero para la medición de hormonas esteroidales y ovario para análisis morfométrico (LIF n = 6). "Sham" corresponde a los animales control a los que sólo se les implantó la cánula (Sham n = 6). Niveles séricos de **a)** progesterona, **b)** testosterona y **c)** estradiol por ovario; **d)** número de cuerpos lúteos y **e)** distribución de tamaño de cuerpo lúteos, por por ovario. Los resultados fueron expresados como la media \pm SEM, prueba t con corrección de Welch, *p < 0,05, **p < 0,01.

LIF NO PRODUCE CAMBIOS EN FOLÍCULOS TIPO III NI QUISTES EN RATAS FÉRTILES

Si bien, estructuras como folículos tipo III y quistes no son frecuentes encontrarlas en ovarios sanos de ratas fértiles, una población aumentada de este tipo de estructuras puede indicar algún tipo de anomalía ovárica, por ejemplo, síndrome de ovario poliquístico (SOP) o subfertilidad (Farquhar et al., 2019). Por esta razón también se evaluó el número de folículos tipo III (fig. 12a) y quistes (fig. 12b), sin observarse cambios en las poblaciones de estas estructuras cuando los ovarios fueron tratados con LIF.

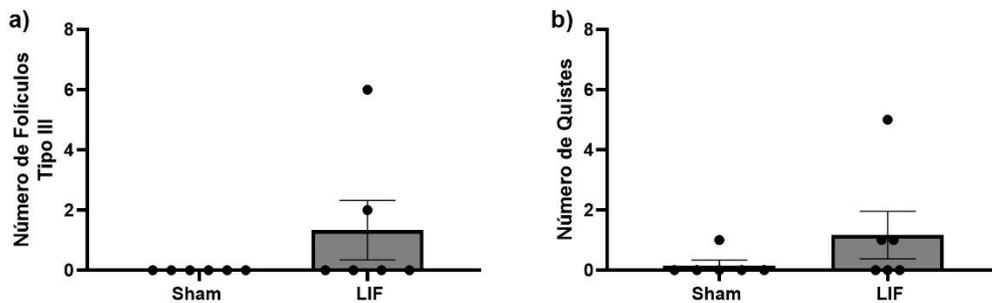


Figura 12.- LIF no produce cambios en folículos tipo III ni en quistes en ratas fértiles, *in vivo*.

A ratas fértiles hemiovariectomizadas se les implantó una minibomba osmótica para la administración local de 100 ng/mL de LIF en el ovario durante 28 días. Finalizado el tratamiento, los animales fueron eutanasiados y se les extrajo suero para la medición de hormonas y ovario, para análisis morfométrico (LIF n = 6). "Sham" corresponde a los animales control a los que sólo se les implantó la cánula (Sham n = 6). Se observa en **a)** número de folículos tipo III y en **b)** número de quistes, por rata. Los resultados fueron expresados como la media \pm SEM.

LIF NO PRODUCE CAMBIOS EN EL NÚMERO DE FOLÍCULO PREANTRALES Y ANTRALES EN OVARIOS DE RATAS SUBFÉRTILES

Como no existen antecedentes del efecto de LIF sobre las funciones ováricas en ratas subfértiles, en este trabajo se evaluó el efecto crónico de esta citoquina sobre el desarrollo folicular de ratas subfértiles y los niveles séricos de hormonas esteroidales sexuales progesterona, testosterona y estradiol. Para llevar a cabo esto, también se utilizaron ratas subfértiles hemiovariectomizadas y a las cuales se les administró LIF mediante una mini bomba osmótica implantada en el ovario izquierdo durante 28 días.

Respecto al desarrollo folicular, en este experimento se pudo observar que, luego de la administración crónica de LIF al ovario de ratas subfértiles, no hubo cambios en la población de folículos preantrales (fig. 13a), que incluyen folículos primarios (fig. 13b) y secundarios (fig. 13c), y folículos antrales totales (fig. 13d), que incluyen folículos antrales sanos (fig. 13e) y antrales atrésicos (fig. 13f). En los animales tratados con LIF se observa una gran dispersión de los datos, donde algunos grupos de estructuras como folículos secundarios (fig. 13c), antrales sanos (fig. 13e) y antrales atrésicos (fig. 11f) presentaron claramente dos poblaciones de folículos. Al realizar el análisis de correlación de los animales que presentan mayor dispersión se observó que las

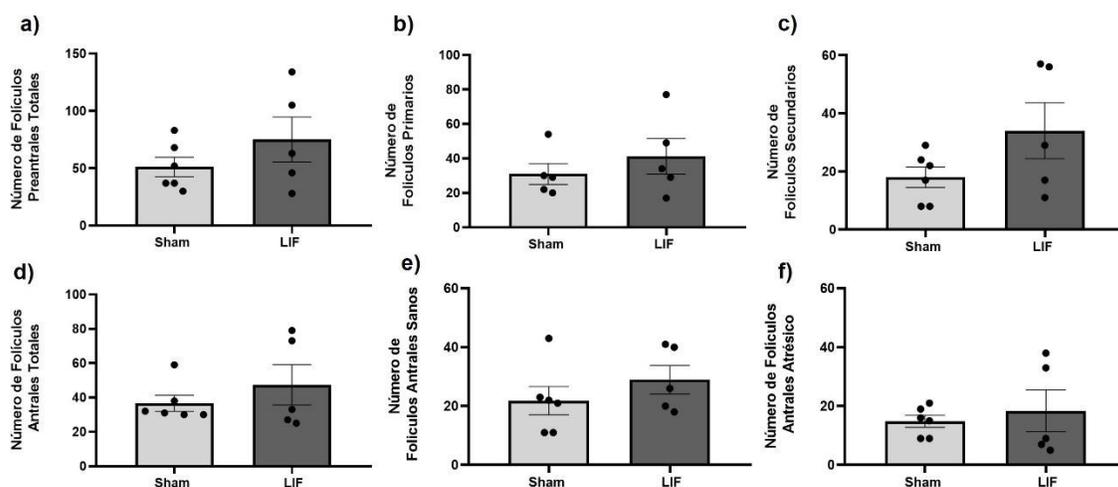


Figura 13.- LIF no produce cambios en el desarrollo folicular de ovarios de ratas subfértiles, *in vivo*.

A ratas subfértiles hemiovariectomizadas se les implantó una minibomba osmótica para la administración local de 100 ng/mL de LIF en el ovario durante 28 días. Finalizado el tratamiento, los animales fueron eutanasiados y se les extrajo ovario para análisis morfométrico (LIF, n = 5). "Sham" corresponde a los animales control a los que sólo se les implantó la cánula (Sham, n = 6). Niveles séricos de **a)** progesterona, **b)** testosterona y **c)** estradiol por rata; **d)** número de cuerpos lúteos y **e)** distribución de tamaño de cuerpo lúteos por rata. Los resultados fueron expresados como la media \pm SEM.

poblaciones de folículos más altas encontradas en estos tres tipos de estructuras corresponden a los mismos animales (datos no mostrados).

Si bien, a medida que la hembra envejece presenta una disminución progresiva en la población de CLs debido a una disminución en el pool folicular y, por ende, la ovulación. El aumento en la población de CLs de gran tamaño observado en ratas fértiles tratadas con LIF, da indicios de que este resultado se podría reproducir en ratas subfértiles. Cuando se determinó el número de CLs (fig. 14a) en ratas subfértiles luego del tratamiento crónico con LIF, se observó una tendencia al aumento ($p=0,0714$) en el número de la población de CL respecto al control. Para determinar si esta tendencia al aumento en la población de CLs en el grupo LIF se debe a un aumento de las estructuras de menor tamaño o a los de mayor tamaño, se realizó una distribución de tamaño de CLs. Se pudo observar que LIF produce un aumento en la población de CLs de menor tamaño ($<799 \mu\text{m}$, fig. 14b) respecto al control, mientras que se observa una tendencia al aumento ($p=0,0779$) en aquella población de CLs de mayor tamaño ($>800 \mu\text{m}$, fig. 14b).

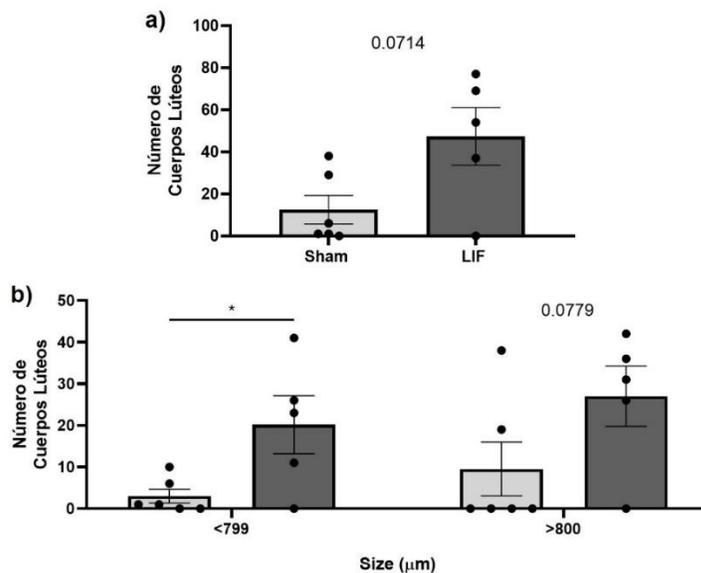


Figura 14.- LIF produce un aumento de los cuerpos lúteos pequeños en ovarios de ratas subfértiles, *in vivo*.

A ratas subfértiles hemiovariectomizadas se les implantó una minibomba osmótica para la administración local de 100 ng/mL de LIF en el ovario durante 28 días. Finalizado el tratamiento, los animales fueron eutanasiados y se les extrajo ovario para análisis morfométrico (LIF $n=5$). "Sham" corresponde a los animales control a los que sólo se les implantó la cánula (Sham $n=6$). En **a)** se observa el número de cuerpos lúteos totales y en **b)** la distribución de tamaños de cuerpos lúteos, en por rata subfértil. Los resultados fueron expresados como la media \pm SEM, prueba t con corrección de Welch, $*p < 0,05$.

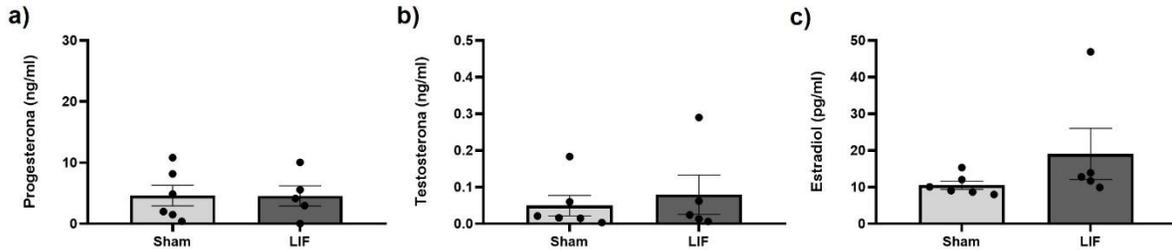


Figura 15.- LIF no produce cambios en los niveles séricos de progesterona, testosterona y estradiol en ratas subfértiles, *in vivo*.

A ratas subfértiles hemiovariectomizadas se les implantó una minibomba osmótica para la administración local de 100 ng/mL de LIF en el ovario durante 28 días. Finalizado el tratamiento, los animales fueron eutanasiados y se les extrajo suero para la medición de hormonas esteroidales sexuales, **a)** progesterona, **b)** testosterona y **c)** estradiol (LIF n = 5). "Sham" corresponde a los animales control a los que sólo se les implantó la cánula (Sham n = 6). Los resultados fueron expresados como la media \pm SEM.

Cuando se determinaron los niveles séricos de progesterona (fig. 15a) testosterona (fig. 15b) y estradiol (fig. 15c) luego del tratamiento crónico con LIF en ratas subfértiles, no se observaron cambios significativos en los niveles de estas hormonas esteroidales en el grupo LIF, respecto al control.

Los ovarios de ratas subfértiles se caracterizan por presentar un gran número de estructuras de tipo III y quistes, por lo tanto, en este grupo de animales se quiso evaluar si LIF podría disminuir este tipo de estructuras. Si bien no se observaron cambios significativos con LIF en folículos tipo III (fig. 16a) y quistes (fig. 16b), destaca una alta dispersión de datos en este grupo principalmente porque se presentan dos poblaciones de datos en folículos tipo III (fig. 16a) y un dato que se escapa del promedio en la población de quistes.

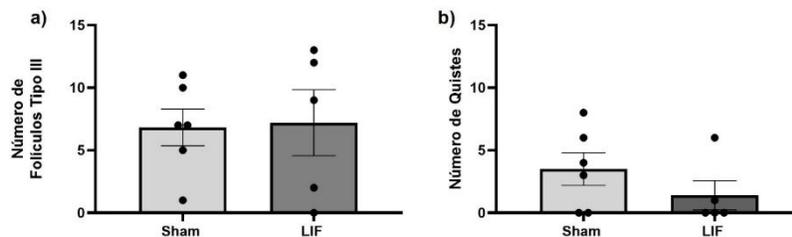


Figura 16.- LIF no produce cambios en el número de estructuras quísticas en ratas subfértiles, *in vivo*.

A ratas subfértiles hemiovariectomizadas se les implantó una minibomba osmótica para la administración local de 100 ng/ml de LIF en el ovario durante 28 días. Finalizado el tratamiento, los animales fueron eutanasiados y se les extrajo ovario para realizar análisis morfológico de **a)** folículos tipo III y **b)** quistes por rata (LIF n = 5). "Sham" corresponde a los animales control a los que sólo se les implantó la cánula (Sham n = 6). Los resultados fueron expresados como la media \pm SEM.

LIF NO TIENE EFECTO SOBRE LA FERTILIDAD DE RATAS EN ETAPA FERTIL

Existe amplia evidencia del efecto de LIF sobre la fertilidad de mamíferos, pues es una molécula crucial en el proceso de implantación a nivel endometrial (Calder et al., 2014; Lass et al., 2001), pero no existen datos en la literatura que indiquen que LIF a nivel ovárico pueda tener alguna implicancia en la fertilidad en hembras. Es por esto que, para evaluar si la administración local de LIF en ovario de rata, encontrada en etapa fértil de su vida reproductiva, tiene algún efecto sobre parámetros de fertilidad, se determinó el número de crías vivas y el número de puntos de implantación en cuernos uterinos. Para llevar a cabo esto, se utilizaron ratas hembra fértiles de 2 meses de edad, a las cuales se les realizó el mismo procedimiento de implantación de bomba miniosmótica para administrar LIF, pero luego de cumplido el periodo de tratamiento, las ratas fueron preñadas y, finalizada la preñez, 3 días post parto se realizó la eutanasia del animal para poder determinar los parámetros de fertilidad.

En este experimento también se evaluó el peso de los animales (fig. suplementaria 6) y los ciclos estrales hasta el primer proestro post tratamiento (fig. suplementaria 7), sin observarse cambios en el grupo tratado con LIF respecto al control y obteniendo resultados similares a lo observado en el objetivo 2 y la primera parte de este objetivo 3. Cuando se determinaron los puntos de implantación en los cuernos uterinos extraídos (fig. 17a) y el número de crías vivas (fig. 17b) no se observaron cambios respecto al control, pero es importante destacar que del total de ratas tratadas con LIF que presentaron espermio positivo, el 100% de ellas tuvieron crías, no así los animales controles que solo el 50% de los animales tuvieron crías (fig. 17c).

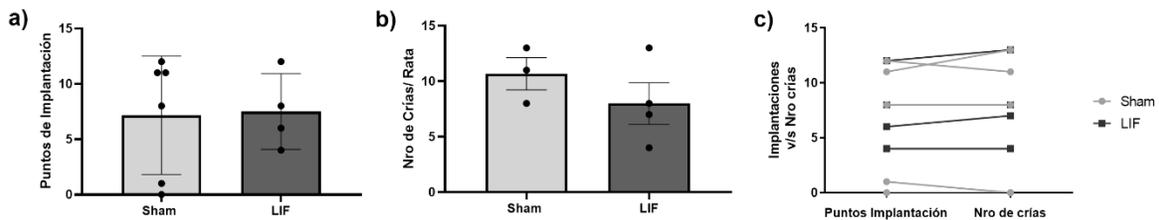


Figura 17.- LIF no tiene efectos sobre la fertilidad de la rata fértil, cuando es administrado directamente al ovario.

A ratas fértiles hemiovariectomizadas se les implantó una minibomba osmótica para la administración local de LIF 100ng/ml en el ovario durante 28 días (LIF n = 6). Finalizado el tratamiento y en el siguiente proestro, las ratas fueron alojadas con los machos. Al día siguiente se realizó frotis vaginal a las hembras, para determinar mediante observación al microscopio espermio positivo o negativo. Si la hembra presenta espermio positivo se considera como día 1 de preñez. Finalizada la preñez, fueron contados **a)** los puntos de implantación de los cuernos uterinos de las ratas y **b)** el número de crías nacidas luego de los 32 días de preñez. En **c)** está representado el número de implantaciones uterinas v/s el número de crías nacidas por cada rata utilizada en este experimento. Los datos son presentados como la media \pm SEM.

RESUMEN OBJETIVO 4

- La administración de LIF en ratas fértiles induce una disminución de la población de folículos preantrales y antrales. Por otro lado, induce un aumento de la población de cuerpos lúteo de gran tamaño, que corresponden probablemente a los ovulados recientemente.
- La administración de LIF en ratas subfértiles no produce grandes cambios en la población folicular, pero si produce un aumento en el número de cuerpos lúteos de menor tamaño.
- La administración de LIF aumenta los niveles séricos de progesterona en ratas fértiles, pero no en ratas subfértiles.
- La administración de LIF no mejora parámetros de fertilidad en hembras fértiles.

DISCUSIÓN

Existen antecedentes publicados que indican que LIF es una citoquina importante en el sistema reproductor femenino, siendo esencial en el proceso de implantación uterina (Bhatt et al., 1991; Stewart, 1992). Sin embargo, a pesar de los muchos estudios de la función de LIF en útero, se sabe poco sobre esta citoquina en ovario de roedor y sobre todo en ovarios humanos. En este trabajo, pudimos determinar que en ovario de rata se expresa el transcrito y la proteína de LIF en el periodo fértil y subfértil de este animal. Además, nuestros resultados muestran que se expresa el transcrito de los receptores que dan lugar al heterodímero, LIFR β y gp130. Esto confirma que el ovario de rata expresa las subunidades del receptor de LIF necesarias para desencadenar la señalización asociada a esta citoquina en la etapa fértil. Ahora, por primera vez, hemos demostrado que LIF está presente en el periodo subfértil de la rata. Se ha podido reproducir lo observado en humanos y en otros modelos animales durante la etapa de fertilidad, tanto *in vivo* como *in vitro* (Arici et al., 1997; Fukada et al., 1997; Coskun et al., 1998; Pastuszek et al., 2015; Murphy et al., 2016). El cambio cíclico del mensajero de LIF en ovarios de ratas fértiles durante el ciclo estral se relaciona estrechamente con los niveles de LIF observado por Fukada et al., 1997. Se ha visto que LIF además de expresarse en útero para llevar a cabo funciones reproductivas importantes respecto a la implantación, también se ha visto que se expresa y cumple funciones determinadas en diferentes tejidos como en huesos, participando en la reabsorción ósea (Palmqvist et al., 2002; Sims & Johnson, 2012), a nivel de neuronas neonatales actuando como transdiferenciador colinérgico (Yamamori et al., 1989; Lecomte et al., 2005) y en cardiomiocitos observándose un efecto en la remodelamiento cardiaco (Kanazawa et al., 2010; Fahmi et al., 2013; Zgheib et al., 2012). Estos datos junto con la expresión cíclica en los niveles de mensajero LIF en ovario sugiere que tendría una importancia funcional durante el estro y el metestro/diestro, que fue cuando se observaron los niveles más altos.

Respecto a LIF y su vinculación con el ovario y su función, se ha podido determinar en estudios en pacientes con SOP, que los niveles de LIF en fluido folicular y en suero se encuentran disminuidos respecto a pacientes control (Li et al., 2018). Esto podría indicar, por una parte, que LIF podría ser secretado por el ovario y de esta forma contribuir a los niveles séricos de esta citoquina y, en segundo lugar, que en situaciones en donde el ovario no puede llevar a cabo sus funciones de forma adecuada, LIF disminuye tanto en fluido folicular como a nivel plasmático. En el periodo de senescencia reproductiva, la función ovárica tanto la foliculogénesis como la esteroidogénesis

comienza a desregularse (Acuña et al., 2009; Cruz et al., 2017; Farquhar et al., 2019). En esta investigación observamos que la proteína de LIF, presenta sus mayores niveles en ovario de ratas fértiles que en subfértiles, lo que podría relacionarse con la desregulación en las funciones ováricas durante el inicio de la senescencia reproductiva, correspondiente al periodo de subfertilidad, y que progresa hasta el cesa la función ovárica en el periodo de infertilidad. No es posible descartar la contribución de LIF proveniente de otros tejidos productores y secretores de esta citoquina hacia circulación, pudiendo de esta formar llegar a ovario como una forma de compensación, pero como en algunos casos la detección de LIF por otro autores ha sido difícil, ha llevado a postular que su expresión podría ser altamente controlada y que sus acciones pudiesen ser locales y acotadas en el tiempo (Hilton, 1992), algo que de cierta forma concuerda con lo publicado por Fukada et al., 1997 respecto a la proteína y lo que se pudo observar en este trabajo respecto a la ciclicidad de la expresión del transcrito de LIF en ovario. Si bien se observaron resultados contrarios entre el transcrito de LIF y la proteína en ovarios en ratas fértiles y subfértiles, bajos niveles del transcrito de LIF podrían indicar una alta y especializada regulación respecto a la traducción y formación de proteína en el tiempo.

La inmunodetección de LIF en CG y ovocitos en ovarios de ratas fértiles observada en esta investigación, fue previamente descrita en ovarios de ratas neonatas por (Nilsson et al., 2002). Este hallazgo es importante, ya que pudimos observar que este patrón de inmunotinción se mantiene en ovarios de ratas fértiles de 5 meses de edad, lo que sugiere que LIF podría participar en el ovario en diferentes etapas del desarrollo (posnatal y reproductiva) y con nuestros resultados también en la etapa subfértil. Además, pudimos observar inmunodetección en CT y en células lúteas de CLs de diferentes tamaños, algo que no se había descrito anteriormente. Los resultados de LIF y LIFR β por IHQ y el aumento de pSTAT3 observado al incubar los ovarios con LIF sugieren que la vía LIF/LIFR/gp130 está activa en la etapa fértil de la rata. Es necesario considerar que no pudimos detectar gp130 por IHQ y tampoco por WB, pero la fosforilación en Y705 detectada mediante el WB de STAT3 sugiere que se activa esta vía en el ovario de rata, ya que JAK1 es necesaria para fosforilar STAT3 (Pastuschek et al., 2015; Murphy et al., 2016). Aun así, no podemos descartar que pueda existir una activación por otras vías asociadas a las citoquinas pertenecientes a la familia de la IL-6 (Auernhammer & Melmed, 2000; Nicola & Babon, 2015) por lo que es importante continuar con estos estudios. Dado que LIF y LIFR β fueron identificados en las CT, CG y los ovocitos de los folículos antrales en desarrollo y en las células lúteas de los CLs por IHQ, proponemos un efecto autocrino y

paracrina de LIF que puede estar induciendo el aumento de pSTAT3 en estas células ováricas y, por ende, participando en las funciones ováricas. Aun así, es necesario identificar gp130 en las células ováricas para determinar si JAK1 y la fosforilación de STAT3 ocurren a través de esta vía, y para descartar la posibilidad de que STAT3 sea activada por el *cross- talking* a través de la activación de otra vía de señalización asociada y/u otras moléculas de la familia IL-6 (Auernhammer & Melmed, 2000; Nicola & Babon, 2015).

Dentro de las interrogantes planteadas sobre el efecto de LIF en el sistema colinérgico ovárico, una de las primeras preguntas que surgen en base a los antecedentes de la literatura, es si LIF puede producir un aumento en los niveles de ACh en el tejido ovárico. Dentro de los primeros resultados obtenidos en los estudios *ex vivo*, se observó un aumento en la liberación de ACh al medio de incubación, cuando se incubó durante 3 horas con LIF. Sin embargo, no se observó cambios en el contenido ovárico de ACh a las 3 h ni a las 8 h de incubación. Este resultado podría sugerir un efecto de LIF sobre la maquinaria de síntesis y degradación que es expresada a nivel ovárico (Fritz et al., 1999; Mayerhofer et al., 2003; Urra et al., 2016) que permitiría mantener la producción de ACh a pesar del aumento en la liberación que se está observando a las 3 h de incubación. Los resultados de este experimento concuerdan con lo observado anteriormente por Yamamori et al., 1989, en cultivo primario de ganglio cervical superior de rata, en donde se muestra un aumento de ACh en el medio al utilizar concentraciones crecientes de LIF, hasta un máximo de 100 ng/mL, concentración que nosotros utilizamos para las incubaciones *ex vivo* de ovario. Es importante destacar además que observamos un efecto agudo de LIF sobre la liberación de ACh, diferente a lo observado por Yamamori et al., 1989, ya que ellos midieron los niveles de ACh luego de 2 semanas de incubación, observándose en este caso un efecto más de tipo crónico. Sumado a esto nosotros trabajamos con tejido completo mientras que el grupo de Yamamori trabajó con cultivo primario de células nerviosas neonatas de tipo simpáticas.

Al no encontrar cambios en el contenido de ACh ovárica, surgió la pregunta de cómo se encontraban los niveles de las enzimas ChAT y AChE en ovario y para tener una aproximación de esto, en primer lugar, determinamos los niveles de mensajeros de ambas enzimas. En cuanto a ChAT, vimos una disminución del ARNm de esta enzima a las 3 horas de incubación con LIF, sin observar cambios a las 8 horas de incubación, algo que difiere con lo observado por Lecomte et al., 2005, en donde los niveles de mensajero de ChAT aumentaron en cultivo primario de neuronas simpáticas de ganglio cervical superior incubado con LIF. Es importante mencionar, que el tiempo de incubación con esta

citoquina en el experimento de Lecomte et al., 2005 fue de 5 días, un lapso mayor al utilizado en este trabajo en el experimento de ovario *ex vivo*, apoyando así la premisa de que LIF tendría un efecto agudo sobre el sistema colinérgico no neuronal en ovario de rata. Si bien los niveles del mensajero de ChAT disminuyeron, nosotros creemos que esto se puede deber a un efecto compensatorio dado que, a pesar de no observarse cambios en los niveles ováricos de ACh, si se infiere una mayor producción en el grupo LIF, ya que hay una mayor liberación ACh al medio de incubación respecto al control. Existen antecedentes que muestran que LIF puede inducir la expresión ChAT en las líneas neuronales SN56 y IMR32, luego de 24 h de incubación y que su expresión es dependiente de la activación de STAT (Bartoe & Nathanson, 2002). Nosotros vemos activación de STAT3 en ovario de ratas fértiles, por lo tanto, podría ser posible la inducción de la expresión de ChAT mediada por LIF en ovario. En este último antecedente (Bartoe & Nathanson, 2002), la incubación realizada fue por 24 h, mientras que en nuestro experimento las incubaciones fueron durante 3h y 8 h, y a las 8 h no vemos cambios. Es posible que no hayamos incubado por el tiempo suficiente para observar cambios a nivel del mensajero de ChAT, pero al encontrarse bajo el transcrito a las 3 horas y no encontrar cambios a las 8 horas, nos sugiere que LIF podría estar induciendo una expresión de ChAT progresiva en el tiempo y que de cierta forma también esté regulada por los niveles ováricos de ACh.

Como se mencionó anteriormente, es importante enfatizar que en las incubaciones realizadas en este trabajo se utilizó ovario, un tejido completo y no células en cultivo, por lo tanto, la respuesta desencadenada es mucho más compleja a la que se obtiene en un cultivo celular. En ovario, se ha identificado a ChAT en CGs de folículos principalmente antrales (Mayerhofer et al., 2006) y no en un sistema neuronal extrínseco que inerve el ovario como el sistema parasimpático que inerva la vasculatura que irriga al ovario (Burden & Lawrence, 1978; Fritz et al., 1999), por ende, no se puede descartar un efecto diferente de LIF sobre esta enzima en este tipo de células y estructuras ováricas. Como los niveles de transcrito no representan la realidad de cómo se encuentran los niveles existentes de enzima activa o funcional, es necesario utilizar un método para la detección de niveles proteicos y/o actividad. En este trabajo se intentó evaluar los niveles proteicos de ChAT en ovario, pero no fue posible debido a problemas con los anticuerpos al momento de estandarizar la técnica de WB (Benítez, 2021). Por este motivo se probó uno de los anticuerpos en la técnica de IHQ para evaluar localización y niveles de ChAT mediante densidad óptica como en el trabajo de Squicciarini et al., 2018. Al momento de observar los resultados de la IHQ, se pudo identificar ChAT en intersticio,

ovocito y en CGs de folículos atrésicos tal como lo observado por Benítez, 2021. Es importante destacar que, en el trabajo de Benítez, 2021 se utilizaron ratas pre puberes, que nunca habían ovulado y que, por ende, no presentaban CLs, mientras que en nuestro trabajo utilizamos ratas fértiles de 3 meses de edad, que, si habían ovulado previamente y, por lo tanto, si presentaban CLs, en los cuales se detectó inmunoreactividad positiva para ChAT. Aun así, los resultados obtenidos no concuerdan con antecedentes y datos previamente publicados, donde ChAT es inmunolocalizado en CGs de folículos antrales sanos, en ovarios de rata, (Mayerhofer & Fritz, 2002; Mayerhofer et al., 2006) El anticuerpo utilizado en nuestro trabajo para detectar ChAT mediante IHQ es comercializado y tiene péptido de bloqueo con el cual se realizó la preadsorción correspondiente (Benítez, 2021), no así los anticuerpos utilizados en los trabajos anteriormente mencionados (Mayerhofer & Fritz, 2002; Mayerhofer et al., 2006) en los cuales los anticuerpos usados no se encuentran comercialmente disponibles, junto con que no se indicó el uso del anticuerpo preadsorbido, necesario para validar el ensayo y confirmar la especificidad de la inmunoreactividad. La información que entregan nuestros resultados difiere significativamente de los antecedentes disponibles respecto al funcionamiento del sistema colinérgico no neuronal en ovario y por temas de tiempo no se siguió ahondando en este tema, pero es importante que se siga investigando en este tema para dilucidar en qué células ováricas se expresa ChAT y si sus niveles varían con el uso de distinto tratamientos farmacológicos.

Los niveles de transcrito de la enzima AChE disminuyen en ovario, cuando es incubado con LIF durante 3 h, sin observar cambios a las 8 h de incubación y sin encontrar cambios en la actividad de la AChE a las 3 h ni a las 8 h. No existen antecedentes que sugieran el efecto de LIF sobre la expresión de la enzima AChE, ni *in vitro* ni *in vivo*, pero creemos que el efecto de esta citoquina sobre la expresión de AChE sería indirecto, como respuesta a los bajos niveles encontrados del mensajero ChAT cuando los ovarios se incubaron con LIF por 3 h, para evitar así una baja en los niveles de ACh. A pesar de encontrar cambios en los niveles de mensajero de AChE estos no se ven reflejados en la actividad de AChE ni a las 3 h ni a las 8 h, pero es importante destacar que la actividad de esta enzima disminuye en el tiempo (comparación entre los controles de las 3 h y 8 h de incubación), lo que concuerda con la cantidad ACh ovárica y la ACh liberada al medio de incubación a las 8 h.

Existe una posibilidad que no fue investigada en esta tesis, en la que LIF al interactuar con su receptor, formado por las subunidades LIFR y gp 130, pudiese aumentar la liberación de ACh en el medio de incubación a las 3 h, probablemente activando una de sus vías no canónicas asociada a la

vía del PI3K (Nicola & Babon, 2015). Si bien en esta tesis no se evaluó la vía PI3K, existe evidencia *in vitro* que muestra que la activación de PI3K en células PC12 puede aumentar la exocitosis de gránulos neurosecretorios, proceso que es inhibido cuando estas células son transfectadas con la unidad catalítica inactiva de PI3K (Meunier et al., 2005). Como LIF puede activar esta vía de señalización existe la posibilidad de que esta citoquina, mediante PI3K induzca un aumento en la liberación de vesículas que pueden contener ACh al medio, pero esto es algo que se debe seguir estudiando para dilucidar si efectivamente LIF puede activar esta vía de PI3K en ovario y si puede aumentar la secreción de vesículas secretorios que pudiesen estar conteniendo ACh.

En base a los resultados obtenidos durante el desarrollo del *objetivo 1* y al comparar estos con los estudios que se han realizado con LIF en diferentes modelos *in vitro* (Yamamori et al., 1989; Lecomte et al., 2005), se puede sugerir que LIF podría tener un efecto agudo que no se había documentado anteriormente sobre el sistema colinérgico en ovario, favoreciendo la liberación de ACh pero disminuyendo los niveles de transcrito de las enzimas ChAT y AChE en un tiempo de incubación de 3 h, sin observar cambios a las 8 h. Debido a la contingencia sanitaria de los años anteriores no fue posible continuar con los experimentos para confirmar o descartar este efecto. Sin embargo, se requieren futuros estudios para determinar el efecto de un antagonista o inhibidor farmacológico que permita bloquear directamente al receptor de LIF y ver si esto tiene alguna implicancia en los niveles de ACh y ChAT y AChE ováricos.

En nuestro laboratorio, se ha utilizado la mini bomba osmótica (ALZET®) en diferentes trabajos, herramienta que ha permitido la administración de fármacos o diferentes moléculas durante 28 días en la bursa del ovario de forma local y crónica (Lara et al., 2000; Ricu et al., 2012; Squicciarini et al., 2018; Riquelme et al., 2019) Con este medio de administración fue posible tratar localmente el ovario de ratas fértiles y subfértiles con LIF y poder evaluar el efecto transdiferenciador colinérgico de esta citoquina *in vivo*. Antes de centrarnos en la evaluación de la transdiferenciación colinérgica de LIF sobre el ovario *in vivo*, es importante destacar que en los experimentos en donde se implantó mini bomba osmótica y se realizó seguimiento de los pesos de las ratas diariamente durante todo el tratamiento, no se observaron cambios significativos en ellos en ratas fértiles ni en subfértiles. Esto sugiere que LIF no estaría ejerciendo un efecto sistémico y que efectivamente los cambios observados en estos objetivos serían por el efecto local que ejerce esta citoquina. Por otro lado, la administración crónica de LIF no modificó la ciclicidad estral de los animales fértiles ni subfértiles,

sugiriendo que hay mecanismos que pueden compensar el efecto de LIF sobre la ciclicidad estral o los niveles de algunas hormonas esteroidales.

Para evaluar el efecto de LIF sobre la función ovárica de forma indirecta, se midieron los niveles séricos de hormonas esteroidales sexuales: progesterona, testosterona y estradiol. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto a testosterona y estradiol, pero si se encontraron niveles aumentados significativamente de progesterona en ratas fértiles y una tendencia al aumento en ratas subfértiles. Dentro del ovario, una de las estructuras más importantes encargadas de la producción de progesterona es el CL, en donde células lúteas expresan la enzima 3β -HSD, la cual está encargada de la síntesis de progesterona en ovario (Smiths et al., 1994; Acuña et al., 2009). El aumento en los niveles de progesterona en ratas en periodo fértil podría deberse a un aumento en el número de cuerpos lúteos funcionales y, por lo tanto, productores de esta hormona. Respecto a los niveles de progesteronas en ratas subfértiles, lo observado fue algo esperado, ya que en el periodo subfértil la ciclicidad de las ratas es irregular y los animales ovulan menos debido a la disminución del pool folicular, observándose también un número menor de CLs funcionales que expresan 3β -HSD (Acuña et al., 2009). Este resultado fue confirmado en el *objetivo 3* en donde se discutirá con más detalle.

El efecto transdiferenciador colinérgico de LIF, se ha estudiado como un efecto crónico en modelos de neuronas simpáticas en cultivo (Yamamori et al., 1989; Lecomte et al., 2005) y en modelo de rata *in vivo* (Kanazawa et al., 2010; Zgheib et al., 2012), y a la fecha no hay evidencia en la literatura del efecto de LIF sobre el sistema colinérgico en tejido ovárico. Con esto, surge la interrogante de qué ocurre con los diferentes componentes del sistema colinérgico cuando tratamos localmente el ovario con LIF, de forma crónica. Los estudios del efecto transdiferenciador colinérgico de LIF sobre el ovario, muestran que al tratar de forma crónica y local el ovario con LIF, se observa una tendencia a la disminución de los niveles de ACh y una disminución significativa de la actividad AChE ovárica en ratas fértiles. En estos animales no se midió lo niveles de ChAT ováricos ni su actividad, pero creemos que la actividad y los niveles de ChAT se encuentren disminuidos luego de 28 días de tratamiento con LIF y que la disminución en la actividad de AChE es un mecanismo compensatorio a los bajos niveles de ACh ovárica. Según experimentos en modelo *in vivos*, la sobre expresión de LIF induce la transdiferenciación colinérgica de neuronas simpáticas que inervan el tejido cardiaco, al evaluar la razón ChAT/TH y la expresión del transportador CHT (Kanazawa et al., 2010). Si bien, nuestros datos no concuerdan con estos antecedentes, existen diferencias metodológicas al

respecto. Por ejemplo, nosotros en ovario evaluamos el posible efecto de LIF sobre el sistema colinérgico no neuronal y no sobre los nervios simpáticos que están innervando estructuras foliculares, algo que no ha sido descrito en el pasado. Al observar los niveles de ACh en ovario de rata fértil, inferimos que los niveles o la actividad de ChAT están disminuidos y, por ende, encontramos niveles más bajos de ACh. La disminución significativa en la actividad AChE la interpretamos como un efecto compensatorio o indirecto de LIF, ya que se ha demostrado que ACh es una molécula importante para la regulación de las funciones ováricas y la fertilidad (Urrea et al., 2016; Delsouc et al., 2019; Riquelme et al., 2019; Benitez et al., 2021) y resulta lógica la premisa de que es necesario mantener unos niveles basales de ACh ovárica para que esto se pueda llevar a cabo. Hay antecedentes que apoyan un rol importante de ACh en el proceso ovulatorio y se ha visto que LIF también es necesario para que ocurra la ovulación (Murphy et al., 2016). Dado que las ratas fueron sacrificadas en estro, la ovulación en estos animales ya ocurrió y, por lo tanto, también la formación de cuerpos lúteos. Se podría inferir que en etapa de estro, postovulación, los niveles de ACh se encuentran bajos y por consecuencia, no sería la etapa del ciclo estral más idónea para medir los niveles de ACh. Como proyección sería interesante poder medir los niveles de ACh en las diferentes etapas del ciclo estral y ver si LIF podría afectar estos niveles y el proceso ovulatorio mediado por ACh, *in vivo*. Para corroborar estas aseveraciones sería necesario utilizar un inhibidor farmacológico específico contra LIFR β para comprobar si el efecto que se está llevando a cabo es específico de LIF sobre su receptor. Recientemente en el Laboratorio se publicó un trabajo en el cual se demuestra un sistema colinérgico intraovárico que no tiene un origen neuronal y que además regula parte de la función ovárica (Cuevas, 2022). Ahora, nosotros presentamos por primera vez evidencia de que LIF estaría participando en la regulación del sistema colinérgico con los estudios *in vivo* e *in vitro*. Basándonos en los resultados obtenidos hasta el momento, se puede sugerir un efecto de LIF tanto agudo como crónico en el ovario de ratas fértiles.

Hay pocos estudios del efecto de LIF sobre las funciones ováricas y la mayoría se han realizado en modelos *ex vivo*, a partir de tejido ovárico neonatal o prepuberal, por esta razón quisimos evaluar el efecto crónico de LIF sobre el desarrollo folicular *in vivo* en ratas fértiles. Lo primero que hicimos fue evaluar el reclutamiento inicial, que es independiente de gonadotrofinas (Mcgee & Hsueh, 2000) y para esto evaluamos el número de folículos preantrales, que incluyen folículos primarios y secundarios, mostrando que ambos disminuyen en número con el tratamiento con LIF por 28 días. Es interesante señalar, que los folículos de menor tamaño son los que más disminuyen su

población, tanto en folículos primarios como en los secundarios. Basándonos en estos resultados decidimos evaluar el número de folículos primordiales, los cuales no cambian con el tratamiento con LIF y por lo tanto no explican la disminución encontrada en los folículos primarios y secundarios pequeños. Nuestros resultados no coinciden con lo observado por (Nilsson et al., 2002), quienes encontraron que LIF promueve el reclutamiento inicial en un modelo de ovario de rata neonatal *ex vivo*, algo similar a lo observado en otros modelos animales también en experimentos *ex vivo* (da Nóbrega et al., 2012; Mo et al., 2014). A LIF se le han atribuido efectos proliferativos y apoptóticos dependiendo el tipo de célula en la que actúe. Se ha visto que LIF promueve la proliferación en células de carcinoma MCF-7 y ZR-75-1 *in vitro* (Kamohara et al., 1997), y en células del estroma endometrial *in vitro* (Salehnia et al., 2017). También puede promover apoptosis en células AZ-521, GBK-1 y HT-29 *in vitro* (Kamohara et al., 1997) y en células epiteliales mamarias *in vivo* (Schere-Levy et al., 2003). En las células de la granulosa y las células de la teca, LIF no tiene ningún efecto directo sobre la proliferación *in vitro* (Nilsson et al., 2002), por lo tanto, la disminución de los folículos preantrales más pequeños se podría deber a un aumento en la muerte celular de las células que conforman estos folículos. Si bien LIF se ha relacionado con efectos proapoptóticos en otros tipos de células, la muerte o atresia del folículo preantral al parecer se debe principalmente a procesos autofágicos (Meng et al., 2018). A medida que los folículos mueren por autofagia, son reabsorbidos y comienzan a formar parte del tejido estromal ovárico. El problema de que los folículos preantrales sufran autofagia y sean reabsorbidos es que son casi indetectables en los estudios morfológicos, especialmente después de un tratamiento de 28 días y cuando el análisis morfológico se realiza al final del tratamiento. Esta premisa requiere futuros estudios en los que se analice el efecto de la LIF en la temporalidad del desarrollo folicular acompañado de la determinación de componentes del proceso autofágico, como la proteína de cadena ligera asociada a los microtúbulos 3 (LC3) o la proteína relacionada con la autofagia 7 (AGT7).

Respecto a la posibilidad de que LIF regule el desarrollo folicular mediante el sistema colinérgico no neuronal podemos inferir que *in vivo* en rata fértil esto no se estaría llevando a cabo. Nuestros resultados sobre el reclutamiento inicial en el desarrollo folicular discrepan de lo encontrado por Urra et al., 2016 y Benitez et al., 2021, en donde al inducir un aumento de ACh con huperzina A o utilizar un agonista colinérgico como carbacol para estimular un efecto colinérgico, no se observan cambios relacionados al número de folículos primario y secundarios. Ahora, no se puede descartar que huperzina A pueda tener un efecto propio no mediado por el sistema colinérgico sobre el

desarrollo folicular, tampoco podemos descartar que LIF tenga efectos sobre la expresión y densidad de receptores muscarínicos o nicotínicos en la membrana de las células foliculares (Cuevas, 2022), lo que requiere futura investigación.

AMH es una molécula producida por CGs de folículos preantrales y antrales pequeños, la cual se conoce como un marcador de la reserva folicular ovárica, (van Rooij et al., 2002; van Rooij et al., 2005; Dewailly et al., 2014). Medimos AMH en suero postratamiento con LIF para evaluar si sus niveles séricos eran coherentes con la disminución en folículos preantrales, pero encontramos un aumento de la AMH al final del tratamiento. Como no tenemos resultados de AMH durante el tratamiento con LIF es difícil determinar si fueron elevados durante el tratamiento o estos aumentaron progresivamente. Sin embargo, deducimos basándonos en nuestros resultados y en evidencias previas en modelos *ex vivo* (Nilsson et al., 2002; da Nóbrega et al., 2012; Mo et al., 2014), donde los altos niveles de AMH obtenidos al final del tratamiento con LIF se produjeron en respuesta a un inminente agotamiento de los folículos preantrales para evitar así que la reserva folicular se acabara (Durlinger et al., 1999; Dewailly et al., 2014) y no a un efecto directo de la LIF sobre la producción ovárica de AMH. Es importante señalar que en el tejido ovárico neonatal casi no hay presencia de folículos antrales pequeños, que son los responsables de la producción de AMH (Dewailly et al., 2014); por lo tanto, en el estudio en el que se realizaron incubaciones de ovarios neonatales con LIF y se observó un aumento del ensamblaje folicular (Nilsson et al., 2002), nosotros inferimos que la producción de AMH era muy baja como para ejercer su efecto inhibitorio compensatorio en este proceso (Nilsson et al., 2007).

El número y el tamaño de los folículos antrales observados tras el tratamiento con LIF podrían explicarse por la disminución del número de folículos preantrales, ya que al haber un menor número de preantrales, menos folículos estarían pasando a la siguiente etapa de folículo antral. Existen antecedentes *ex vivo* que sugieren que LIF podría inhibir el crecimiento de los folículos antrales (Komatsu et al., 2015), inhibiendo así el paso de los folículos antrales a folículos preovulatorios, pero parte de nuestros resultados muestran un aumento del número de CL recién ovulados. Basándonos en nuestros resultados y los antecedentes disponibles, sugerimos que LIF por una parte estaría inhibiendo el paso de folículo preantral a antral, pero en aquellos folículos que ya se encuentran en la etapa antral, podría estar promoviéndose el paso de folículo antral a preovulatorio y, por ende, favorecer la ovulación y formación de CL.

Existe una etapa del desarrollo folicular conocida como reclutamiento cíclico, que es dependiente de FSH (Moore & Greenwald, 1974; Hirshfield & Midgley, 1978) y que permite que los folículos antrales seleccionados den lugar a los folículos preovulatorios. Éstos pueden responder al aumento de LH en ratas fértiles, de modo que pueda producirse la ovulación (Mcgee & Hsueh, 2000) y así, los ovocitos pueden ser fecundados. Durante la etapa del folículo antral, la mayoría de estos folículos sufren atresia y, por tanto, degeneran y mueren (Mcgee & Hsueh, 2000). Cuando evaluamos el efecto de la LIF sobre la formación de folículos antrales atrésicos, los resultados mostraron que LIF no afecta a este proceso y por tanto, no induce una mayor degeneración y muerte del folículo. El efecto de LIF en los folículos antrales atrésicos sólo se ha estudiado en aves, y se ha observado que cuando la atresia es inducida por autofagia, LIF puede prevenir este tipo de muerte celular mediante la activación de las vías PI3K/AKT y STAT3 (Dong et al., 2022). Estos datos, junto con nuestros resultados que indican que no hay cambios en los folículos atrésicos y que muestran que se favorece la ovulación, sugieren que LIF podría ayudar a la supervivencia de los folículos maduros seleccionados. En este trabajo no pudimos observar ese escenario porque los animales fueron sacrificados en la etapa de estro, cuando el proceso de ovulación ya ha ocurrido y no se observaron folículos preovulatorios en el análisis morfológico. De los resultados analizados hasta el momento, podemos inferir que LIF puede ser una de las moléculas que participa en el proceso de ovulación y ayudar a asegurar la supervivencia de los folículos antrales maduros en condiciones que implican la pérdida de la fertilidad, Lo que podría ser importante en situaciones patológicas como en la falla ovárica prematuro (Liu et al., 2020).

Los resultados obtenidos en la determinación de las gonadotropinas FSH y LH séricos, medidos al final del tratamiento, muestran que LIF administrado de forma crónica, no altera el eje neuroendocrino reproductivo de las ratas. Aunque no medimos las gonadotropinas séricas durante el tratamiento, sí evaluamos la ciclicidad estral de las ratas antes de la cirugía de implantación de bomba y durante el tratamiento, ya que la monitorización de la ciclicidad es una forma indirecta de evaluar la función ovárica y, por tanto, el eje reproductivo (Goldman et al., 2007; Cora et al., 2015). No se observó cambios en los ciclos de los animales antes o durante el tratamiento. Para complementar la evaluación de la función ovárica, también se determinaron los niveles séricos de hormonas esteroides sexuales tras el tratamiento con LIF, al igual que en el *objetivo 3*. No se observaron cambios en la testosterona y el estradiol, un hallazgo que fue consistente con los niveles de gonadotropina medidos después del tratamiento. Sin embargo, al igual que lo observado en el

objetivo 3 de este trabajo, se presentaron altos niveles séricos de progesterona medidos al final del tratamiento con LIF. La principal estructura productora de progesterona en el ovario es el CL, específicamente aquellos CLs recién ovulados, que corresponden a los de mayor tamaño (Hawkins et al., 1993; Davis & Rueda, 2002). Al evaluar tanto el número como el tamaño de los CLs al final del tratamiento, observamos un aumento en el número de los que habían ovulado recientemente ($>800 \mu\text{m}$), lo que explicaría los elevados niveles de progesterona sérica encontrados al final del tratamiento con LIF. Existen estudios del efecto de LIF sobre la esteroidogénesis en la glándula suprarrenal en donde se ha visto en la línea celular adrenocortical humana NCI-H295R que LIF puede aumentar la secreción de cortisol y aldosterona, mediada por la ACTH (Bamberger et al., 2000), y que puede aumentar la expresión de la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR) (Mikhaylova et al., 2008), un transportador importante en el primer paso limitante de la esteroidogénesis. El efecto de LIF sobre los componentes enzimáticos de la esteroidogénesis en el ovario no se estudiaron en esta tesis, sin embargo, no podemos descartar un posible efecto de LIF sobre la expresión de StAR u otra enzima de la vía esteroidogénica en el ovario asociada a la síntesis de progesterona o bien a la glándula adrenal. Finalmente, al evaluar la presencia de estructuras quísticas en ovario tratado con LIF, se observaron muy pocas estructuras prequísticas y quísticas comparada con el grupo control. Estos resultados sugieren que LIF no tendría una mayor incidencia en la formación de quistes y folículos tipo III, algo que de cierta forma confirman los bajos niveles de testosteronas encontrados al final del tratamiento con LIF (Acuña et al., 2009).

Resultados publicados en el laboratorio muestran que kisspeptina (KP) aumenta en la etapa subfétil de la rata (Fernandois et al., 2017) y, por otro lado, en útero se ha demostrado que KP induce el aumento de LIF para favorecer la implantación del blastocisto (Bhatt et al., 1991; Stewart, 1992). Basándonos en esta evidencia se propuso evaluar el efecto de LIF sobre el desarrollo folicular en ratas subfétiles *in vivo*, ya que a la fecha no ha sido estudiado. Al determinar el número de folículos desde primarios hasta antrales, no se observaron cambios en la cohorte folicular con el tratamiento con LIF, solo se presentaron algunas tendencias. Por ejemplo, en folículos secundarios y antrales sanos se observó claramente dos grupos de datos con bastante dispersión. Aun así, no deja de sorprender que haya un grupo de animales que presente un número mayor de folículos secundarios y antrales al final del tratamiento con LIF en ratas subfétiles, ya que podría indicar que algunas de estas hembras estarían respondiendo al tratamiento. Podría existir la posibilidad de que LIF en condiciones, en este caso fisiológicas específicas, podría tener un efecto diferente en el desarrollo

folicular, favoreciendo el crecimiento de los folículos haciendo que pasen de folículos secundarios a folículos antrales, pero esto es algo que debe ser estudiado en mayor profundidad, quizás utilizando ratas sobre los 10 meses de edad para determinar el efecto de LIF en el periodo de subfertilidad ya establecido (Acuña et al., 2009; Cruz et al., 2017). La dispersión en los datos observado en la evaluación del desarrollo folicular en el periodo subfétil no es algo que sorprenda, pues no necesariamente toda la población de ratas hembra comenzará su etapa de subfertilidad a los 8 meses de edad (Acuña et al., 2009; Chávez-Genaro et al., 2007). Por lo tanto, es necesario evaluar el efecto de LIF en la etapa de subfertilidad ya establecida.

El aumento en el número de CLs en ovarios tratados con LIF sugiere que esta citoquina podría favorecer la ovulación en ratas subfétilas. Si bien el número de CLs grandes está al borde de la significancia (principalmente por la dispersión de los datos ya que tuvimos una rata que no presentó CLs), sugiere un aumento en el número de ovulaciones en ratas subfétilas, tal como lo que se vio en el experimento en ratas fétilas, apoyando la idea de que LIF es necesario y favorece la ovulación *in vivo* (Murphy et al., 2016). El aumento significativo en el número de CL de tamaño pequeño en ratas subfétilas tratadas con LIF, sugiere un efecto en la sobrevivencia de este tipo de estructuras. Los CLs demoran varios ciclos estrales en degenerar y desaparecer (Davis & Rueda, 2002) y los resultados indican que LIF estaría retrasando la degeneración de CLs, algo que se podría explicar mediante el efecto antiapoptótico que se le ha atribuido a LIF en otros tipos celulares y modelos de estudio (Morita et al., 1999; Slaets et al., 2008). Al observar los niveles de hormonas esteroidales sexuales, destaca progesterona, porque si bien en la etapa de subfertilidad los niveles de hormonas esteroidales sexuales disminuyen debido a que disminuye el pool de folículos encargados de la producción de estradiol, y el pool de CLs en el caso de progesterona (Acuña et al., 2009; Cruz et al., 2017), al presentarse mayor número de CLs en aquellas ratas tratadas con LIF, solo se observa una tendencia al aumento en los niveles de progesterona. Esto puede deberse a que abundan principalmente CLs de tamaño pequeño los cuales, al ir degenerando progresivamente, también pierden la capacidad de producir progesterona porque dejan de expresar la enzima 3β -HSD (Davis & Rueda, 2002)

El periodo de subfertilidad, además de caracterizarse por una disminución drástica del pool de folículos ováricos, también se caracteriza por la aparición de estructuras quísticas (Acuña et al., 2009; Fernandois et al., 2012). Por esta razón también determinamos el número de folículos tipo III y quistes post tratamiento con LIF, observándose una tendencia a la disminución con el tratamiento

en el caso de quistes y sin observar cambios en el caso de folículos tipo III. La dispersión en el número de quistes se debe a que uno de los animales presentó 6 quistes v/s los otros cuatro animales que presentaron 1 o 0. En estudio anteriores se ha visto que la presencia de estructuras quísticas en el ovario de ratas subfértiles está asociado a una hiperactividad simpática (Acuña et al., 2009; (Chávez-Genaro et al., 2007; Fernandois et al., 2012) y se sabe que LIF puede inducir una transdiferenciación colinérgica que implica el aumento en la síntesis de ACh y una disminución en la síntesis de catecolaminas como NA (Yamamori et al., 1989; Lecomte et al., 2005; Kanazawa et al., 2010). Si bien en los resultados del *objetivo 3* no vimos cambios en los niveles de ACh ovárica en ratas subfértiles, los antecedentes y los resultados en su conjunto nos hace pensar que LIF tendría implicancias en la foliculogénesis en ovarios subfértiles mediante una disminución en el contenido NA, disminuyendo así la formación de estructuras quísticas. En este trabajo no se midieron componente noradrenérgicos post tratamiento con LIF, pero es necesario poder continuar la investigación en esta línea para ver si LIF efectivamente puede modular el sistema noradrenérgico y colinérgico en el ovario.

Finalmente, en el *objetivo 4* se evaluaron además parámetros de fertilidad post tratamiento con LIF en ratas fértiles. Se sabe que LIF es una molécula muy importante para la fertilidad de las hembras porque es necesaria para el proceso de implantación a nivel uterino (Lass et al., 2001), pero no se sabe la implicancia que podría tener LIF ovárico en la fertilidad. Para esto medimos parámetros de fertilidad como puntos de implantación en cuernos uterinos y número de crías vivas por rata post tratamiento. No observamos ningún cambio y lo atribuimos a la alta dispersión de los datos tanto en el grupo control como en el grupo LIF, por lo que será necesario aumentar el n de este experimento. La fertilidad de las hembras es multifactorial y entran en juego todos los órganos y tejidos del aparato reproductor sexual, en este caso femenino. Por esta razón nuestros resultados respecto del efecto en la fertilidad de LIF ovárico no son concluyentes.

Resumiendo, los resultados correspondientes al *objetivo 4* muestran que LIF participa en el desarrollo folicular ovárico en ratas fértiles y subfértiles *in vivo*, destacando el efecto sobre la disminución del reclutamiento inicial y en el aumento de cuerpos lúteos (fig. 18) y por lo tanto en la producción de progesterona. Inferimos que LIF participa y favorece en la ovulación. Respecto a la fertilidad no tenemos resultados concluyentes de que LIF ovárico pueda influir de gran manera en la fertilidad de la rata.

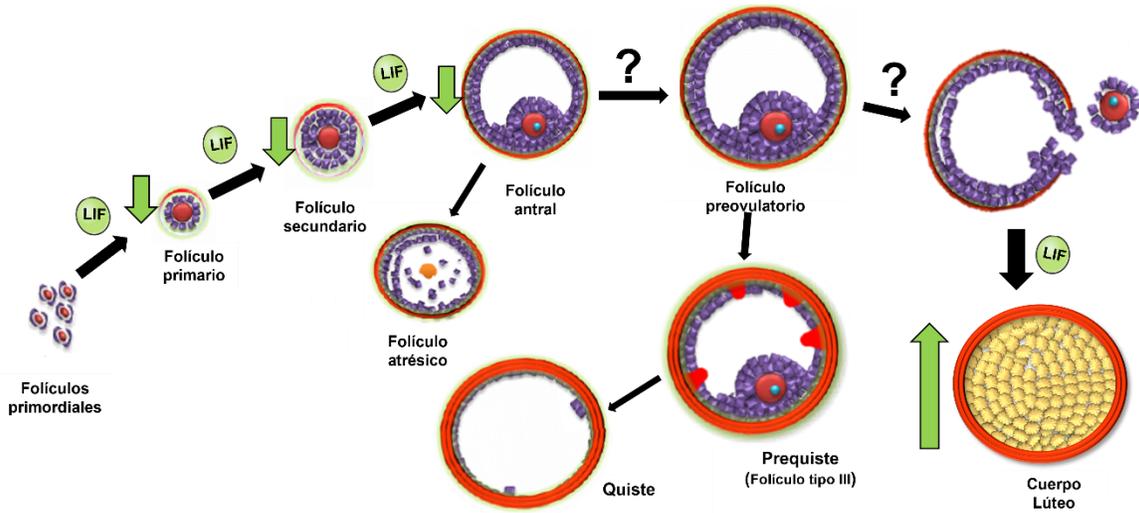


Figura 18. LIF disminuye el reclutamiento inicial y aumenta el número de cuerpo lúteo en ovario de rata.

Modelo explicativo del efecto crónico de la LIF sobre la función ovárica en ratas fértiles. LIF disminuye el número y crecimiento de folículos preantrales (primarios y secundarios), disminuye el crecimiento y desarrollo de los folículos antrales y puede promover la ovulación y la formación del cuerpo lúteo, sin inducir cambios en el número y tamaño de los folículos antrales, un efecto interesante ya que podría aumentar la ovulación sin agotar la reserva folicular ovárica.

CONCLUSIONES

Los resultados de esta investigación muestran que el ovario de rata expresa el sistema LIF/LIFR en periodo fértil y se presenta por primera vez evidencia que este sistema también está presente en el periodo subfértil. LIF y LIFR β se localiza específicamente en células de la teca y células de granulosa de folículos antrales, en ovocito y células lúteas de cuerpos lúteos. La activación del sistema LIF/LIFR es mediada en parte a través de la fosforilación de STAT3.

LIF participa en la función ovárica, regulando el desarrollo folicular y la esteroidogénesis en ratas fértiles y subfértiles. Los resultados sugieren que LIF favorece el proceso de ovulación, reflejado por el aumento del número de cuerpos lúteos y de los niveles séricos de progesterona.

LIF participa en la regulación del sistema colinérgico en estudios *ex vivo* de ovario de ratas fértiles, pero para determinar si el efecto de LIF sobre las funciones ováricas es mediado por los niveles de ACh ováricos debe ser confirmada con futuros estudios.

REFERENCIAS

- Acuña, E., Fornes, R., Fernandois, D., Garrido, M. P., Greiner, M., Lara, H. E., & Paredes, A. H. (2009). Increases in norepinephrine release and ovarian cyst formation during ageing in the rat. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-64>
- Aikawa, J., Sato, E., Kyuwa, S., Sato, E., Sasai, K., Shiota, K., & Ogawa, T. (1998). Asparagine-linked glycosylation of the rat leukemia inhibitory factor expressed by simian COS7 cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62(7), 1318–1325.
- Anuario de Estadísticas Vitales, 2019. (2021). *Anuario de Estadísticas Vitales*.
- Arici, A., Oral, E., Bahtiyar, O., Engin, O., Seli, E., & Jones, E. E. (1997). Leukaemia inhibitory factor expression in human follicular fluid and ovarian cells. *Human Reproduction Vol*, 12(6), 1233–1239. <https://doi.org/10.1093/humrep/12.6.1233>
- Auernhammer, C. J., & Melmed, S. (2000). Leukemia-Inhibitory Factor-Neuroimmune Modulator of Endocrine Function. *Endocrine Reviews*, 21(3), 313–345. [https://doi.org/0163-769X/00/\\$03.00/0](https://doi.org/0163-769X/00/$03.00/0)
- Bamberger, A.-M., Schulte, H. M., Wullbrand, A., Jung, R., Beil, F. U., & Bamberger, C. M. (2000). Expression of leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor (LIF-R) in the human adrenal cortex: implications for steroidogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 162, 145–149. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(00\)00200-8](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(00)00200-8)
- Barria, A., Leytont, V., Ojeda, S. R., & Lara, H. E. (1993). Ovarian Steroidal Response to Gonadotropins and Adrenergic Stimulation Is Enhanced in Polycystic Ovary Syndrome: Role of Sympathetic Innervation*. *Endocrinology*, 133(6), 2696–2703.
- Bartoe, J. L., & Nathanson, N. M. (2002). Independent roles of SOCS-3 and SHP-2 in the regulation of neuronal gene expression by leukemia inhibitory factor. *Molecular Brain Research*, 107(2), 108–119. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(02\)00452-7](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(02)00452-7)
- Bazan, J. F. (1991). Neurotrophic Cytokines in the Hematopoietic Fold. *Neuron*, 7, 197–208.
- Benítez, A. (2021). *EL FACTOR DE CRECIMIENTO NEURONAL (NGF) ES UN ACTIVADOR DUAL DE LOS SISTEMAS COLINÉRGICO Y NORADRENÉRGICO DEL OVARIO DE RATA*. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
- Benitez, A., Riquelme, R., del Campo, M., Araya, C., & Lara, H. E. (2021). Nerve Growth Factor: A Dual Activator of Noradrenergic and Cholinergic Systems of the Rat Ovary. *Frontiers in Endocrinology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.636600>
- Bhatt, H., Brunet, L. J., & Stewart, C. L. (1991). Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Developmental Biology*, 88, 11408–11412. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.24.11408>
- Burden, H. W., & Lawrence, I. E. (1978). Experimental Studies on the Acetylcholinesterase-positive Nerves in the Ovary of the Rat. *The Anatomical Record*, 190(2), 233–242. <https://doi.org/10.1002/ar.1091900207>

- Calder, M., Chan, Y. M., Raj, R., Pampillo, M., Elbert, A., Noonan, M., Gillio-Meina, C., Caligioni, C., Bérubé, N. G., Bhattacharya, M., Watson, A. J., Seminara, S. B., & Babwah, A. V. (2014). Implantation failure in female Kiss1^{-/-} mice is independent of their hypogonadic state and can be partially rescued by leukemia inhibitory factor. *Endocrinology*, *155*(8), 3065–3078. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1916>
- Chávez-Genaro, R., Lombide, P., Domínguez, R., Rosas, P., & Vázquez-Cuevas, F. (2007). Sympathetic pharmacological denervation in ageing rats: Effects on ovulatory response and follicular population. *Reproduction, Fertility and Development*, *19*(8), 954–960. <https://doi.org/10.1071/RD07075>
- Chen, C., Shen, L., Cao, S., Li, X., Xuan, W., Zhang, J., Huang, X., Bin, J., Xu, D., Li, G., Kitakaze, M., & Liao, Y. (2014). Cytosolic CARP promotes angiotensin II- or pressure overload-induced cardiomyocyte hypertrophy through calcineurin accumulation. *PLoS ONE*, *9*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104040>
- Chun, S.-Y., Eisenhauer, K. M., Minami, S., Billig, H., Perlas, E., & Hsueh, A. J. W. (1996). Hormonal Regulation of Apoptosis in Early Antral Follicles: Follicle-Stimulating Hormone as a Major Survival Factor*. *Endocrinology*, *137*(4), 1447–1456. <https://doi.org/10.1210/endo.137.4.8625923>
- Cora, M. C., Kooistra, L., & Travlos, G. (2015). Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicologic Pathology*, *43*(6), 776–793. <https://doi.org/10.1177/0192623315570339>
- Coskun, S., Uzumcu, M., Jaroudi, K., Hollanders, J. M. G., Parhar, R. S., & Al-Sedairy, S. T. (1998). Presence of leukemia inhibitory factor and interleukin-12 in human follicular fluid during follicular growth. *American Journal of Reproductive Immunology*, *40*(1), 13–18. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1998.tb00382.x>
- Cruz, G., Fernandois, D., & Paredes, A. H. (2017). Ovarian function and reproductive senescence in the rat: Role of ovarian sympathetic innervation. In *Reproduction* (Vol. 153, Issue 2, pp. R59–R68). BioScientifica Ltd. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0117>
- Cuevas, F. (2022). *Caracterización del efecto de la acetilcolina sobre el desarrollo folicular de ovario de rata. Origen de la inervación colinérgica, acción sobre receptores y de la necroptosis en la atresia folicular asociada con la función ovárica.*
- Curley, M., Milne, L., Smith, S., Atanassova, N., Rebourcet, D., Darbey, A., Hadoke, P. W. F., Wells, S., & Smith, L. B. (2018). Leukemia Inhibitory Factor-Receptor is Dispensable for Prenatal Testis Development but is Required in Sertoli cells for Normal Spermatogenesis in Mice. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30011-w>
- Da Nóbrega, J. E., Gonçalves, P. B. D., Chaves, R. N., Magalhães, D. D. M., Rossetto, R., Lima-Verde, I. B., Pereira, G. R., Campello, C. C., Figueiredo, J. R., & De Oliveira, J. F. C. (2012). Leukemia inhibitory factor stimulates the transition of primordial to primary follicle and supports the goat primordial follicle viability in vitro. *Zygote*, *20*(1), 73–78. <https://doi.org/10.1017/S0967199411000074>

- Davis, J. S., & Rueda, B. R. (2002). The Corpus Luteum: an Ovarian Structure with Maternal Instincts and Suicidal Tendencies. *Frontiers in Bioscience*, 7, 1949–1978. <https://doi.org/10.2741/davis1>
- Delsouc, M. B., Bronzi, C. D., Becerra, C. D., Bonaventura, M. M., Mohamed, F. H., & Casais, M. (2019). Ganglionic and ovarian action of acetylcholine during diestrous II in rats. Neuroendocrine control of the luteal regression. *Steroids*, 148, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2019.04.005>
- Dewailly, D., Andersen, C. Y., Balen, A., Broekmans, F., Dilaver, N., Fanchin, R., Griesinger, G., Kelsey, T. W., La marca, A., Lambalk, C., Mason, H., Nelson, S. M., Visser, J. A., Wallace, W. H., & Anderson, R. A. (2014). The physiology and clinical utility of anti-Müllerian hormone in women. *Human Reproduction Update*, 20(3), 370–385. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmt062>
- Dong, J., Guo, C., Zhou, S., Zhao, A., Li, J., Mi, Y., & Zhang, C. (2022). Leukemia inhibitory factor prevents chicken follicular atresia through PI3K/AKT and Stat3 signaling pathways: LIF prevents chicken follicular atresia. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 543. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111550>
- Dorfman M., Arancibia, S., Fiedler, J. L., & Lara, H. E. (2003). Chronic intermittent cold stress activates ovarian sympathetic nerves and modifies ovarian follicular development in the rat. *Biology of Reproduction*, 68(6), 2038–2043. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.008318>
- Drummond, A. E. (2006). The role of steroids in follicular growth. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-16>
- Durlinger, A. L. L., Kramer, P., Karels, B., De Jong, F. H., Uilenbroek, J. T. J., Grootegoed, J. A., & Themmen, A. P. N. (1999). *Control of Primordial Follicle Recruitment by Anti-Müllerian Hormone in the Mouse Ovary*. 40(12), 5789–5796. <https://doi.org/10.1210/endo.140.12.7204>
- Fahmi, A., Smart, N., Pun, A., Jabr, R., Marber, M., & Heads, R. (2013). P42/p44-MAPK and PI3K are sufficient for IL-6 family cytokines/gp130 to signal to hypertrophy and survival in cardiomyocytes in the absence of JAK/STAT activation. *Cellular Signalling*, 25(4), 898–909. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.12.008>
- Fan, Y.-Y., Zhang, J.-M., Wang, H., Liu, X.-Y., and Yang, F.-H. (2013). Leukemia inhibitory factor inhibits the proliferation of primary rat astrocytes induced by oxygen-glucose deprivation. *Acta Neurobiol Exp*, 73(4), 485–494.
- Farquhar, C. M., Bhattacharya, S., Repping, S., Mastenbroek, S., Kamath, M. S., Marjoribanks, J., & Boivin, J. (2019). Female subfertility. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0058-8>
- Fernandois, D., Cruz, G., Na, E. K., Lara, H. E., & Paredes, A. H. (2017). Kisspeptin level in the aging ovary is regulated by the sympathetic nervous system. *Journal of Endocrinology*, 232(1), 97–105. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0181>

- Fernandois, D., Garrido, M., Lara, H. E., & Paredes, A. H. (2014). REGULACIÓN NEURONAL DE LA FUNCIÓN OVÁRICA DURANTE EL ENVEJECIMIENTO REPRODUCTIVO (Neuronal regulation of ovarian function during reproductive aging) RESUMEN Publicado por la Sociedad de Farmacología de Chile. In *Rev. Farmacol. Chile* (Vol. 7, Issue 1).
- Fernandois, D., Lara, H. E., & Paredes, A. H. (2012). Blocking of β -adrenergic receptors during the subfertile period inhibits spontaneous ovarian cyst formation in rats. *Hormone and Metabolic Research*, *44*(9), 682–687. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1304607>
- Fritz, S., Föhr, K. J., Boddien, S., Berg, U., Brucker, C., & Mayerhofer, A. (1999). Functional and Molecular Characterization of a Muscarinic Receptor Type and Evidence for Expression of Choline-Acetyltransferase and Vesicular Acetylcholine Transporter in Human Granulosa-Luteal Cells. *J Clin Endocrinol Metab*, *84*(5), 1744–1750. <https://academic.oup.com/jcem/article/84/5/1744/2864455>
- Fukada, K. (1985). Purification and partial characterization of a cholinergic neuronal differentiation factor (phenotypic choice/sympathetic neuron/development/cardiac cell). In *Neurobiology* (Vol. 82). <https://www.pnas.org>
- Fukada, K., Korsching, S., & Towle, M. F. (1997). Tissue-specific and ontogenetic regulation of LIF protein levels determined by quantitative enzyme immunoassay. *Growth Factors*, *14*(4), 279–295. <https://doi.org/10.3109/08977199709021526>
- Garrido, M. P., Fernandois, D., Venegas, M., & Paredes, A. H. (2018). Effects of sympathectomy on ovarian follicular development and steroid secretion. *Reproduction*, *155*(2), 173–181. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0318>
- Gearing, D. P., Gough, N. M., King, J. A., Hilton, D. J., Nicola, N. A., Simpson, R. J., Nice, E. C., Kelso, A., & Metcalf, D. (1987). Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *The EMBO Journal*, *6*(13), 3995–4002. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02742.x>
- Gerendai, I., Tóth, I. E., Boldogkői C, Istvá N Medveczky, & Halász, B. (1998). Neuronal Labeling in the Rat Brain and Spinal Cord from the Ovary Using Viral Transneuronal Tracing Technique. *Reproductive Neuroendocrinology Neuroendocrinology*, *68*, 244–256. <http://BioMedNet.com/karger>
- Goldman, J. M., Murr, A. S., & Cooper, R. L. (2007). The rodent estrous cycle: Characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology*, *80*(2), 84–97. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20106>
- Greiner M, Paredes A, Araya V, & Lara HE. (2005). Role of Stress and Sympathetic Innervation in the Development of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrine*, *28*(3), 319–324.
- Hawkins, D. E., Belfiore, C. J., Kile, J. P., & Niswender, G. D. (1993). Regulation of Messenger Ribonucleic Acid Encoding 3-Hydroxysteroid Dehydrogenase/A 5-A 4 Isomerase in the Ovine Corpus Luteum. *Biology of Reproduction*, *48*, 1185–1190. <https://doi.org/10.1095/biolreprod48.5.1185>

- Hilton, D. J. (1992). LIF: lots of interesting functions. *Trends in Biochemical Sciences*, 17(2), 72–76.
- Hinds, M. G., Maurer, T., Zhang, J. G., Nicola, N. A., & Norton, R. S. (1998). Solution structure of leukemia inhibitory factor. *Journal of Biological Chemistry*, 273(22), 13738–13745. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.22.13738>
- Hirshfield, A. N., & Midgley, A. R. (1978). Morphometric Analysis of Follicular Development in the Rat. *Biology of Reproduction*, 19, 597–605. <https://doi.org/10.1095/biolreprod19.3.597>
- Ishimura, K., Yoshinaga-Hirabayashi, T., Tsuru, H., Fujita, H., & Osawa, Y. *. (1989). Histochemistry. Further immunocytochemical study on the localization of aromatase in the ovary of rats and mice*. *Histochemistry*, 90, 413–416.
- Jones, E. C., & Krohn, P. L. (1961). The relationships between age, numbers of oocytes and fertility in virgin and multiparous mice. *Journal of Endocrinology*, 21(4), 469–495.
- Kamohara, H., Sakamoto, K., Ishiko, T., Masuda, Y., Abe, T., & Ogawa, M. (1997). Leukemia Inhibitory Factor Induces Apoptosis and Proliferation of Human Carcinoma Cells Through Different Oncogene Pathways. *J. Cancer*, 72, 687–695. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19970807\)72:4<687::AID-IJC22>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19970807)72:4<687::AID-IJC22>3.0.CO;2-7)
- Kanazawa, H., Ieda, M., Kimura, K., Arai, T., Kawaguchi-Manabe, H., Matsuhashi, T., Endo, J., Sano, M., Kawakami, T., Kimura, T., Monkawa, T., Hayashi, M., Iwanami, A., Okano, H., Okada, Y., Ishibashi-Ueda, H., Ogawa, S., & Fukuda, K. (2010). Heart failure causes cholinergic transdifferentiation of cardiac sympathetic nerves via gp130-signaling cytokines in rodents. *Journal of Clinical Investigation*, 120(2), 408–421. <https://doi.org/10.1172/JCI39778>
- Kannisto, P., Owman, C., & Wallis, B. (1985). Involvement of local adrenergic receptors in the process of ovulation in gonadotrophin-primed immature rats. *J. Reprod. Fert.*, 75(2), 357–362.
- Komatsu, K., Koya, T., Wang, J., Yamashita, M., Kikkawa, F., & Iwase, A. (2015). Analysis of the effect of leukemia inhibitory factor on follicular growth in cultured murine ovarian tissue. *Biology of Reproduction*, 93(1). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.128421>
- Kovacs, W., & Ojeda, S. (2011). *Textbook of Endocrine Physiology* (sixth edition). <https://doi.org/10.1093/oso/9780199744121.001.0001>
- Kumar, R., Wang, Y., Lu, N., & Matzuk, M. (1997). Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet*, 15, 201–204.
- Lara, H. E., Dissen, G. A., Leyton, V., Paredes, A., Fuenzalida, H., Fiedler, J. L., & Ojeda, S. R. (2000). An Increased Intraovarian Synthesis of Nerve Growth Factor and Its Low Affinity Receptor Is a Principal Component of Steroid-Induced Polycystic Ovary in the Rat. *Endocrinology*, 141(3), 1059–1072. [https://doi.org/0013-7227/00/\\$03.00/0](https://doi.org/0013-7227/00/$03.00/0)
- Larrañaga, O. (2006). Participación laboral de la mujer en. *El Eslabón Perdido. Familia, Modernización y Bienestar En Chile*.

- Lass, A., Weiser, W., Munafo, A., & Loumaye, E. (2001). Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *Fertility and Sterility*, *76*(6), 1091–1096. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(01\)02878-3](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(01)02878-3)
- Lecomte, M. J., De Gois, S., Guerci, A., Ravassard, P., Biguet, N. F., Mallet, J., & Berrard, S. (2005). Differential expression and regulation of the high-affinity choline transporter CHT1 and choline acetyltransferase in neurons of superior cervical ganglia. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *28*(2), 303–313. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.09.014>
- Li, Z., Zhu, Y., Li, H., Jiang, W., Liu, H., Yan, J., Chen, Z. J., & Li, W. (2018). Leukaemia inhibitory factor in serum and follicular fluid of women with polycystic ovary syndrome and its correlation with IVF outcome. *Reproductive BioMedicine Online*, *36*(4), 483–489. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.12.020>
- Liu, P., Zhang, X., Hu, J., Cui, L., Zhao, S., Jiao, X., & Qin, Y. (2020). Dysregulated cytokine profile associated with biochemical premature ovarian insufficiency. *American Journal of Reproductive Immunology*, *84*(4). <https://doi.org/10.1111/aji.13292>
- Lovejoy, B., Cascio, D., & Eisenberg, D. (1993). Crystal structure of canine and bovine granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). *Journal of Molecular Biology*, *234*(3), 640–653.
- Mathews, T. J., & Hamilton, B. E. (2016). Mean Age of Mothers is on the Rise: United States, 2000-2014 Key findings Data from the National Vital Statistics System. *NCHS Data Brief*, *232*, 1–8.
- Mayerhofer, A., Dimitrijevic, N., & Kunz, L. (2003). The expression and biological role of the non-neuronal cholinergic system in the ovary. *Life Sciences*, *72*(18–19), 2039–2045. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(03\)00081-X](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(03)00081-X)
- Mayerhofer, A., & Fritz, S. (2002). Ovarian acetylcholine and muscarinic receptors: Hints of a novel intrinsic ovarian regulatory system. *Microscopy Research and Technique*, *59*(6), 503–508. <https://doi.org/10.1002/jemt.10228>
- Mayerhofer, A., Kunz, L., Krieger, A., Proskocil, B., Spindel, E., Amsterdam, A., Dissen, G. A., Ojeda, S. R., & Wessler, I. (2006). FSH regulates acetylcholine production by ovarian granulosa cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *4*(37), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-37>
- McDonald, N. Q., Panayotatos, N., & Hendrickson, W. A. (1995). Crystal structure of dimeric human ciliary neurotrophic factor determined by MAD phasing. *EMBO Journal*, *14*(12), 2689–2699. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07269.x>
- Mcgee, E. A., & Hsueh, A. J. W. (2000). Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles. *Endocrine Reviews*, *21*(2), 200–214. <https://doi.org/doi.org/10.1210/edrv.21.2.0394>
- Meng, L., Jan, S. Z., Hamer, G., Van Pelt, A. M., Van Der Stelt, I., Keijer, J., & Teerds, K. J. (2018). Preantral follicular atresia occurs mainly through autophagy, while antral follicles degenerate mostly through apoptosis. *Biology of Reproduction*, *99*(4), 853–863. <https://doi.org/10.1093/biolre/iocy116>
- Meunier, F. A., Osborne, S. L., Hammond, G. R. V., Cooke, F. T., Parker, P. J., Doming, J., & Schiavo, G. (2005). Phosphatidylinositol 3-kinase C2 α is essential for ATP-dependent priming of

- neurosecretory granule exocytosis. *Molecular Biology of the Cell*, 16(10), 4841–4851.
<https://doi.org/10.1091/mbc.E05-02-0171>
- Mikhaylova, I. V., Jääskeläinen, T., Jääskeläinen, J., Palvimo, J. J., & Voutilainen, R. (2008). Leukemia inhibitory factor as a regulator of steroidogenesis in human NCI-H295R adrenocortical cells. *Journal of Endocrinology*, 199(3), 435–444. <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0377>
- Mo, X., Wu, G., Yuan, D., Jia, B., Liu, C., Zhu, S., & Hou, Y. (2014). Leukemia inhibitory factor enhances bovine oocyte maturation and early embryo development. *Molecular Reproduction and Development*, 81(7), 608–618. <https://doi.org/10.1002/mrd.22327>
- Moore, P. J., & Greenwald, G. S. (1974). Effect of Hypophysectomy and Gonadotropin Treatment on Follicular Development and Ovulation in the Hamster. *Am. J. Anat.*, 139(1), 37–48. <https://doi.org/10.1002/aja.1001390103>
- Morita, Y., Manganaro, T. F., Tao, X.-J., Martimbeau, S., Donahoe, P. K., & Tilly, J. L. (1999). Requirement for Phosphatidylinositol-3-Kinase in Cytokine-Mediated Germ Cell Survival during Fetal Oogenesis in the Mouse. *Endocrinology*, 140(2), 941–949. <https://academic.oup.com/endo/article/140/2/941/2990778>
- Murphy, M. J., Halow, N. G., Royer, P. A., & Hennebold, J. D. (2016). Leukemia inhibitory factor is necessary for ovulation in female rhesus macaques. *Endocrinology*, 157(11), 4378–4387. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1283>
- Nicola, N. A., & Babon, J. J. (2015). Leukemia inhibitory factor (LIF). *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 26(5), 533–544. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.07.001>
- Nilsson, E. E., & Skinner, M. K. (2009). Progesterone regulation of primordial follicle assembly in bovine fetal ovaries. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 313(1–2), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.09.004>
- Nilsson, E., Kezele, P., & Skinner, M. K. (2002). Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 188(1–2), 65–73. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00746-8](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00746-8)
- Nilsson, E., Rogers, N., & Skinner, M. K. (2007). Actions of anti-Müllerian hormone on the ovarian transcriptome to inhibit primordial to primary follicle transition. *Reproduction*, 134(2), 209–221. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0119>
- Palma, G. A., Argañaraz, M. E., Barrera, A. D., Rodler, D., Mutto, A. Á., & Sinowatz, F. (2012). Biology and biotechnology of follicle development. *The Scientific World Journal*, 2012. <https://doi.org/10.1100/2012/938138>
- Palmqvist, P., Persson, E., Conaway, H. H., & Lerner, U. H. (2002). IL-6, Leukemia Inhibitory Factor, and Oncostatin M Stimulate Bone Resorption and Regulate the Expression of Receptor Activator of NF-κB Ligand, Osteoprotegerin, and Receptor Activator of NF-κB in Mouse Calvariae. *The Journal of Immunology*, 169(6), 3353–3362. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.6.3353>

- Panayotatos, N., Radziejewska, E., Acheson, A., Somogyi, R., Thadani, A., Hendrickson, W. A., & McDonald, N. Q. (1995). Localization of functional receptor epitopes on the structure of ciliary neurotrophic factor indicates a conserved, function-related epitope topography among helical cytokines. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(23), 14007–14014. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.23.14007>
- Paredes, A. H., Salvetti, N. R., Diaz, A. E., Dallard, B. E., Ortega, H. H., & Lara, H. E. (2011). Sympathetic nerve activity in normal and cystic follicles from isolated bovine ovary: Local effect of beta-adrenergic stimulation on steroid secretion. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *9*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-66>
- Pastuschek, J., Poetzsch, J., Morales-Prieto, D. M., Schleußner, E., Markert, U. R., & Georgiev, G. (2015). Stimulation of the JAK/STAT pathway by LIF and OSM in the human granulosa cell line COV434. *Journal of Reproductive Immunology*, *108*, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2015.03.002>
- Patterson, P. H., & Chun, L. L. (1977a). The Induction of Acetylcholine Synthesis in Primary Cultures of Dissociated Rat Sympathetic Neurons II. Developmental Aspects. *Developmental Biology*, *60*, 473–481.
- Patterson, P. H., & Chun, L. L. Y. (1977b). The Induction of Acetylcholine Synthesis in Primary Cultures of Dissociated Rat Sympathetic Neurons I. Effects of Conditioned Medium. *Developmental Biology*, *56*, 263–230.
- Qiu, L., Towle, M. F., Bernd, P., & Fukada, K. (1997). Distribution of Cholinergic Neuronal Differentiation Factor/Leukemia Inhibitory Factor Binding Sites in the Developing and Adult Rat Nervous System In Vivo. In *J Neurobiol* (Vol. 32).
- Rajkovic, A., Pangas, S. A., & Matzuk, M. M. (2006). Follicular development: mouse, sheep, and human models, Chapter 10. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: Vol. Volume 1* (pp. 383–423).
- Ricu, M. A., Ramirez, V. D., Paredes, A. H., & Lara, H. E. (2012). Evidence for a celiac ganglion-ovarian kisspeptin neural network in the rat: Intraovarian anti-kisspeptin delays vaginal opening and alters estrous cyclicity. *Endocrinology*, *153*(10), 4966–4977. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1279>
- Riquelme, R., Ruz, F., Mayerhofer, A., & Lara, H. n. E. (2019). Role of ovarian sympathetic nerves and cholinergic local system during cold stress. *Journal of Endocrinology*, *242*(2), 115–124. <https://doi.org/10.1530/JOE-19-0125>
- Robinson, R. C., Grey, L. M., Staunton, D., Vankelecom, H., Vernallis, A. B., Moreau, J.-F., Stuart, D. I., Heath, J. K., & Jones, E. Y. (1994). The Crystal Structure and Biological Function of Leukemia Inhibitory Factor: Implications for Receptor Binding. In *Cell* (Vol. 77).
- Rosa-E-Silva, A., Guimaraes, M. A., Padmanabhan, V., & Lara, H. E. (2003). Prepubertal administration of estradiol valerate disrupts cyclicity and leads to cystic ovarian morphology during adult life in the rat: Role of sympathetic innervation. *Endocrinology*, *144*(10), 4289–4297. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0146>

- Rubio, M. (2022). *El factor inhibitorio de leucemia activa la vía de transducción de señales JAK1/STAT3 en células de la granulosa e induce la ovulación en rata adulta in vivo.*
- Salehnia, M., Fayazi, M., & Ehsani, S. (2017). Leukemia inhibitory factor increases the proliferation of human endometrial stromal cells and expression of genes related to pluripotency. *Int J Reprod BioMed*, *15*(4), 209–216.
- Sasai, K., Aikawa, J., Saburi, S., Tojo, H., Tanaka, S., Ogawa, T., & Shiota, K. (1998). Functions of the N-Glycans of Rat Leukemia Inhibitory Factor Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells. *J. Biochem*, *124*, 999–1003.
- Schere-Levy, C., Buggiano, V., Quaglino, A., Gattelli, A., Cirio, M. C., Piazzon, I., Vanzulli, S., & Kordon, E. C. (2003). Leukemia inhibitory factor induces apoptosis of the mammary epithelial cells and participates in mouse mammary gland involution. *Experimental Cell Research*, *282*(1), 35–47. <https://doi.org/10.1006/excr.2002.5666>
- Simamura, E., Shimada, H., Higashi, N., Uchishiba, M., Otani, H., & Hatta, T. (2010). Maternal Leukemia Inhibitory Factor (LIF) promotes fetal neurogenesis via a LIF-ACTH-LIF signaling relay pathway. *Endocrinology*, *151*(4), 1853–1862. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0985>
- Sims, N. A., & Johnson, R. W. (2012). Leukemia inhibitory factor: A paracrine mediator of bone metabolism. *Growth Factors*, *30*(2), 76–87. <https://doi.org/10.3109/08977194.2012.656760>
- Slaets, H., Dumont, D., Vanderlocht, J., Noben, J. P., Leprince, P., Robben, J., Hendriks, J., Stinissen, P., & Hellings, N. (2008). Leukemia inhibitory factor induces an antiapoptotic response in oligodendrocytes through Akt-phosphorylation and up-regulation of 14-3-3. *Proteomics*, *8*(6), 1237–1247. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700641>
- Smiths, M. F., McIntush, E. W., & Smith, G. W. (1994). Mechanisms Associated with Corpus Luteum Development. *Journal of Animal Science*, *72*(7), 1857–1872. <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/72/7/1857/4632685>
- Somers, W., Stahl, M., & Seehra, J. S. (1997). 1.9 Å crystal structure of interleukin 6: Implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. *EMBO Journal*, *16*(5), 989–997. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.5.989>
- Soret, R., Chevalier, J., De Coppet, P., Poupeau, G., Derkinderen, P., Segain, J. P., & Neunlist, M. (2010). Short-Chain Fatty Acids Regulate the Enteric Neurons and Control Gastrointestinal Motility in Rats. *Gastroenterology*, *138*(5). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.053>
- Squicciarini, V., Riquelme, R., Wilsterman, K., Bentley, G. E., & Lara, H. E. (2018). Role of RFRP-3 in the development of cold stress-induced polycystic ovary phenotype in rats. *Journal of Endocrinology*, *239*(1), 81–91. <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0357>
- Stewart, C. L., K. P., B. L. J., B. H., G. I., K. F., & A. S. J. (1992). Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*, *359*(6390), 76–79. <https://doi.org/10.1038/359076a0>

- Taupin, J.-L., Pitard, V., Dechanet, J., Miossec, V., Gualde, N., & Moreau, J.-F. (1998). Leukemia Inhibitory Factor: Part of a Large ingathering Family. *International Reviews of Immunology*, *16*(3–4), 397–426.
- Ultsch, M. H., Somers, W., Kossiakoff, A. A., & M.de Vos, A. (1994). The crystal structure of affinity-matured human growth hormone at 2 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, *236*(1), 286–299.
- Urta, J., Blohberger, J., Tiszavari, M., Mayerhofer, A., & Lara, H. E. (2016). In vivo blockade of acetylcholinesterase increases intraovarian acetylcholine and enhances follicular development and fertility in the rat. *Scientific Reports*, *6*. <https://doi.org/10.1038/srep30129>
- Van Rooij, I. A. J., Broekmans, F. J. M., Scheffer, G. J., Looman, C. W. N., Habbema, J. D. F., De Jong, F. H., Fauser, B. J. C. M., Themmen, A. P. N., & Te Velde, E. R. (2005). Serum antimüllerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: A longitudinal study. *Fertility and Sterility*, *83*(4), 979–987. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.11.029>
- Van Rooij, I. A. J., Broekmans, F. J. M., Te Velde, E. R., Fauser, B. C. J. M., Bancsi, L. F. J. M. M., De Jong, F. H., & Themmen, A. P. N. (2002). Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Human Reproduction*, *17*(12), 3065–3071. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.12.3065>
- Vargas, C. (2017). *EFEECTO DE KISSPEPTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DEL FACTOR INHIBIDOR DE LEUCEMIA EN OVARIOS DE RATAS DURANTE EL PERIODO DE SUBFERTILIDAD*.
- Westwood, F. R. (2008). The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. *Toxicologic Pathology*, *36*(3), 375–384. <https://doi.org/10.1177/0192623308315665>
- Yamamori, T., Fukada, K., Aebersold, R., Korsching, S., Fann, M., & Patterson, P. H. (1989). The Cholinergic Neuronal Differentiation Factor from Heart Cells Is Identical to Leukemia Inhibitory Factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, *86*, 1384. www.sciencemag.org
- Zeleznik, A. J., Midgley, A. R., & Reichert, L. E. (1974). Granulosa Cell Maturation in the Rat: Increased Binding of Human Chorionic Gonadotropin Following Treatment with Follicle-Stimulating Hormone in Vivo 1. *Endocrinology*, *95*, 818–825.
- Zgheib, C., Zouein, F. A., Kurdi, M., & Booz, G. W. (2012). Chronic treatment of mice with leukemia inhibitory factor does not cause adverse cardiac remodeling but improves heart function. *European Cytokine Network*, *23*(4), 197. <https://doi.org/10.1684/ecn.2012.0319>
- Zhang, F., Basinski, M. B., Beals, J. M., Briggs, S. L., Churgay, L. M., Clawson, D. K., Dimarchi, R. D., Furman, T. C., Hale, J. E., Hsiung, H. M., Schoner, B. E., Smith, D. P., Zhang, X. Y., Wery, J.-P., & Schevitz, R. W. (1997). Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature*, *287*(6629), 206–209.

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

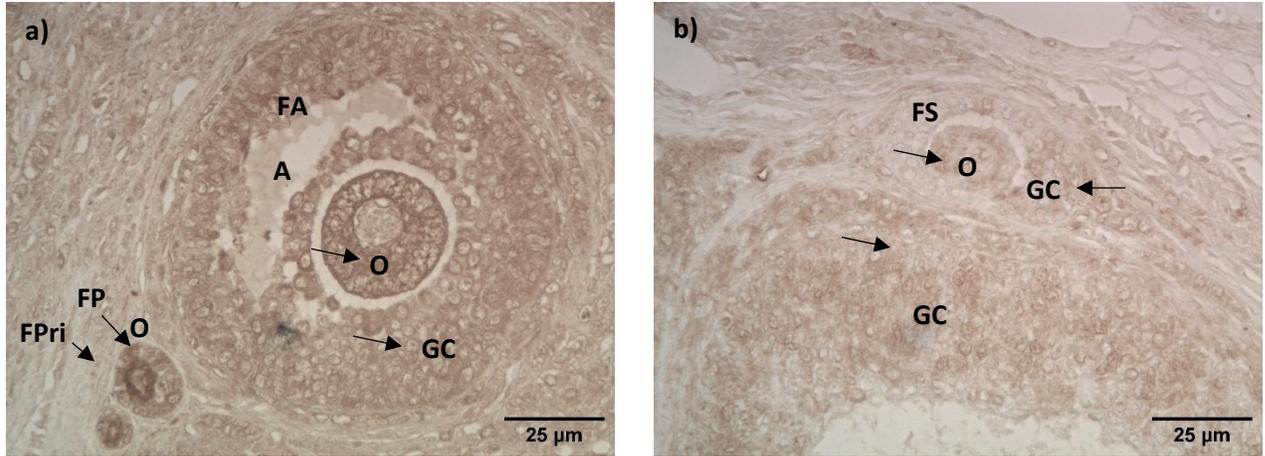


Figura suplementaria 1.

LIF se localizan en folículos primordiales, primarios y LIFR β en folículos secundarios de ovarios de rata fértil. En el panel de la izquierda se observa **a)** IHQ para LIF y en el panel de la derecha se observa **b)** IHQ para LIFR β en ovario de rata de 5 meses de edad. Las flechas están indicando **a)** inmunoreactividad positiva para LIF. O: ovocito y en CG: células de granulosa de FPri: folículo primordial y FP: folículo primario, y para **b)** LIFR β en O y en CG de FS: folículos secundarios.

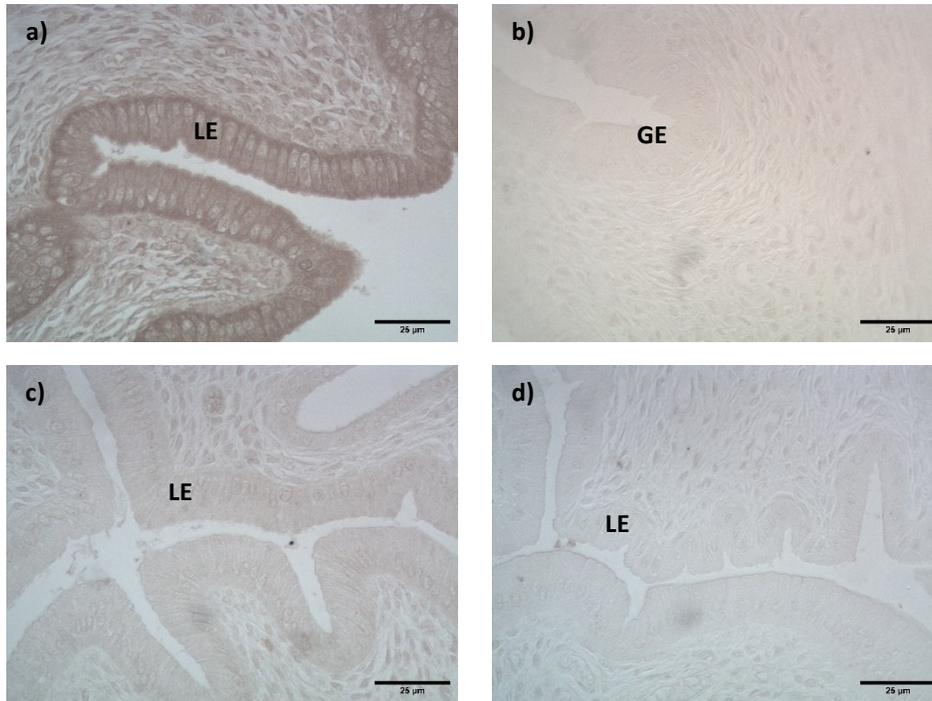


Figura suplementaria 2

Control positivo para inmunohistoquímica contra LIF y LIFR. Se utilizaron secciones transversales de cuernos uterinos de ratas fértiles (de 3 meses de edad) en etapa de estro como controles positivos para la inmunodetección de LIF y LIFR. Se observa en **a)** inmunoreactividad para LIF y en **c)** inmunoreactividad para LIFR en el epitelio luminal del endometrio. El control blanco (sin anticuerpo primario) se observa en **b)** para IHQ contra LIF en el epitelio glandular y en **d)** para LIFR en el epitelio luminal. **GE:** epitelio glandular, **LE:** epitelio luminal

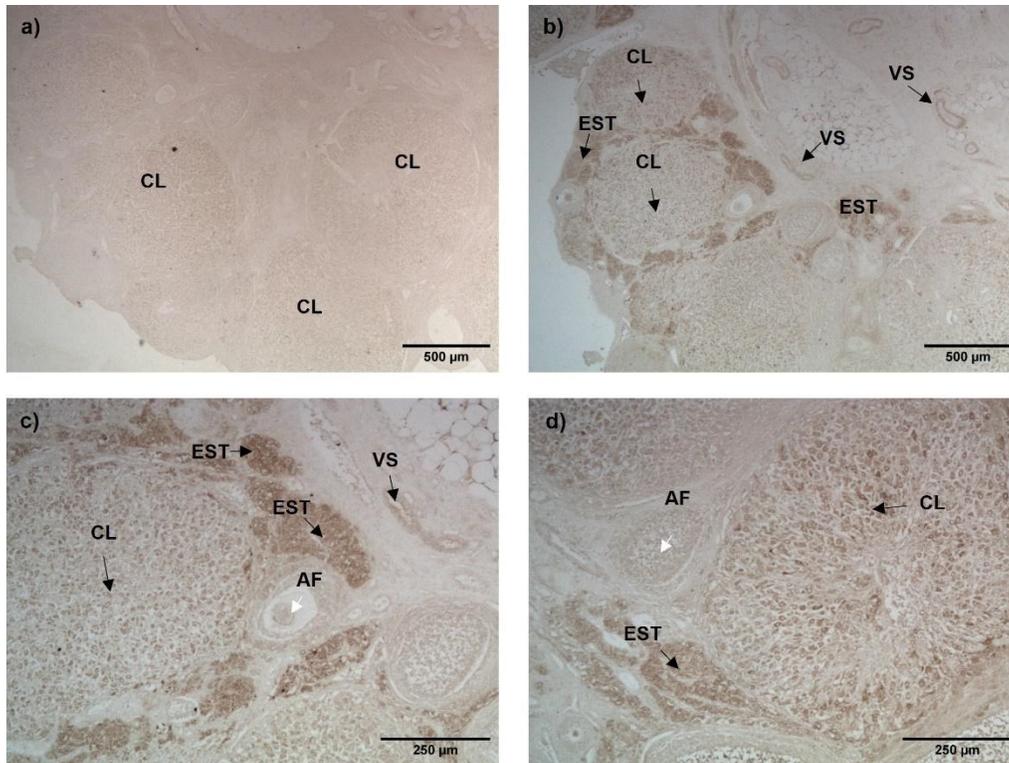


Figura suplementaria 3

IHQ contra ChAT en ovario de rata fértil. Fueron utilizadas secciones de ovarios de ratas fértiles (3 meses de edad) en etapa de estro. En panel **a)** se puede observar el control blanco en el cual no se utilizó anticuerpo primario. En panel **b), c) y d)** se utilizó una dilución 1:100 de anticuerpo antiChAT (n° catalogo AB144) Las flechas negras indican inmunoreactividad positiva para células del CL: cuerpo lúteo, **EST:** estroma y **VS:** vasos sanguíneos. Las flechas blancas indican **AF:** folículos antrales.

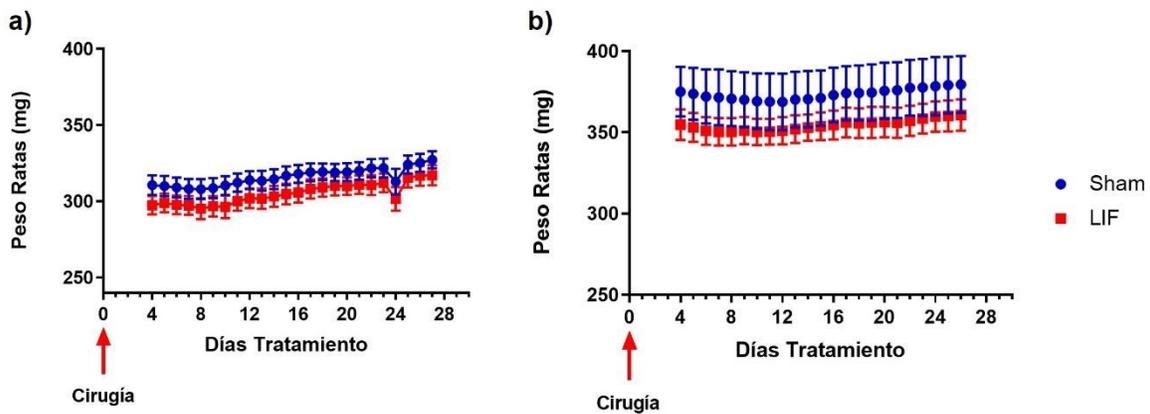


Figura suplementaria 4

El tratamiento crónico con LIF no produce cambios en el peso de los animales. Seguimiento diario del peso de **a)** ratas fértiles (5 meses más 1 mes de tratamiento) y **b)** ratas subfértiles (8 meses más 1 mes de tratamiento) durante 28 días de tratamiento con 100 ng/ml de LIF. Cuadros rojos representan el peso de los animales tratados con LIF y círculos azules representan a los animales implantados con cánula (Sham) Cada punto representa el promedio de los pesos de los animales de ese día presentados como el promedio \pm SEM. Esta figura incluye los animales utilizados para el experimento del Objetivo 2 y los animales utilizados para la evaluación morfométrica de la foliculogénesis del objetivo 3 (n=6, animales totales para shams y para LIF **a)** = 12 y para **b)** = 12).

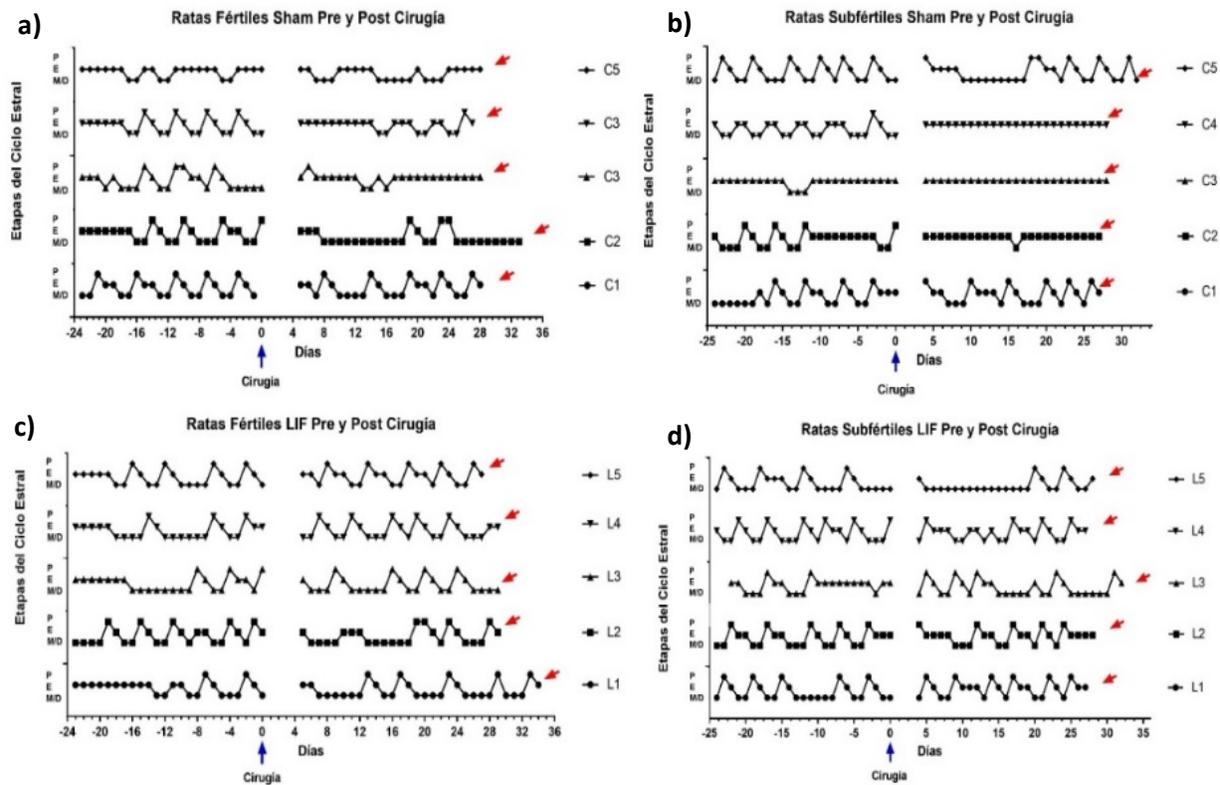


Figura suplementaria 5

Gráficos de la ciclicidad estral de ratas fértiles y subfértiles, pre y post implantación de bombas miniosmóticas, objetivo 2. Seguimiento diario de la ciclicidad estral de ratas **a) y c)** fértiles y ratas **b) y d)** subfértiles, y pre y post cirugía de implantación de bombas. Figuras **a) y b)** representan a los animales implantados con cánula (Sham) mientras que **b) y c)** representan a los animales implantados con la bomba miniosmótica (LIF) para la administración de 100 ng/ml de LIF durante 28 días. La flecha azul en el día cero, corresponde al día en que se realizó la cirugía y las flechas rojas indican el día en que se realizó la eutanasia de cada animal. Estos animales fueron utilizados para la determinación de ACh y actividad AChE intraovárica. P: proestro, E: estro, M: metaestro, D: diestro

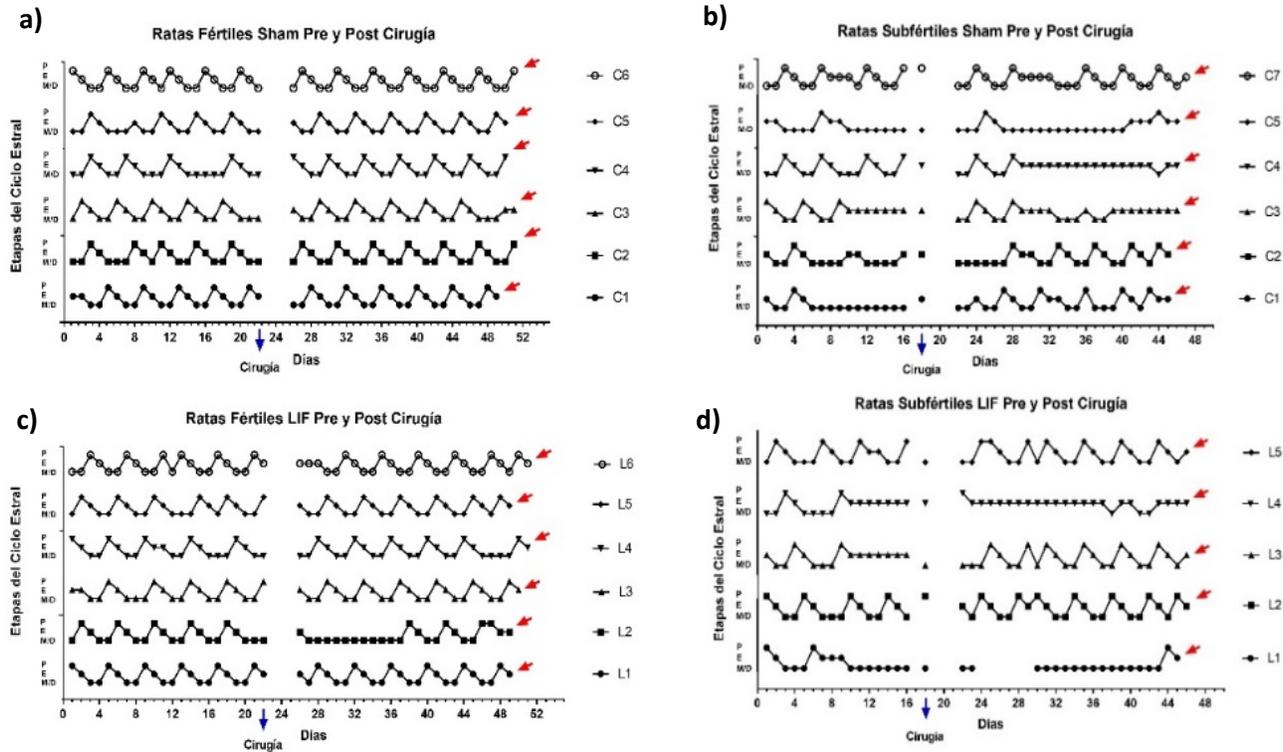


Figura suplementaria 6

Gráficos de la ciclicidad estral de ratas fértiles y subfértiles, pre y post implantación de bombas miniosmóticas, objetivo 3. Seguimiento diario de la ciclicidad estral de ratas **a)** y **c)** fértiles y ratas **b)** y **d)** subfértiles, pre y post cirugía de implantación de bombas. Figuras **a)** y **b)** representan a los animales implantados con cánula (Sham) mientras que **b)** y **c)** representan a los animales implantados con la bomba miniosmótica (LIF) para la administración de 100 ng/ml de LIF durante 28 días. La flecha azul en el día cero, corresponde al día en que se realizó la cirugía y las flechas rojas indican el día en que se realizó la eutanasia de cada animal. Estos animales fueron utilizados para realizar el análisis morfométrico para evaluar el desarrollo folicular. P: proestro, E: estro, M: metaestro, D: diestro

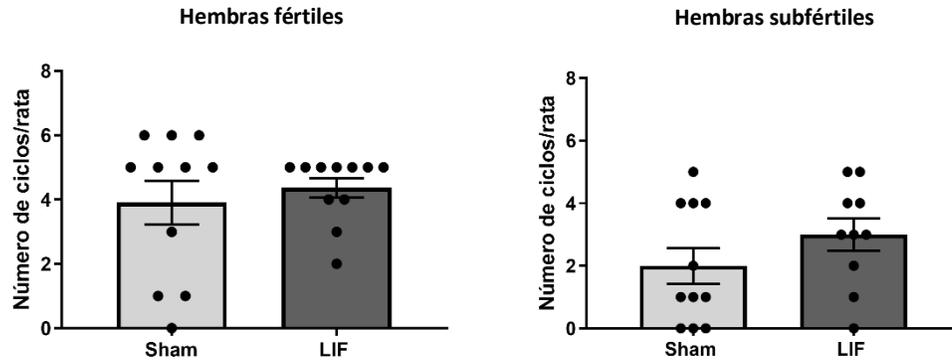


Figura suplementaria 7

LIF no produce cambios en el número de ciclos estrales en animales fértiles y subfértiles. Se realizaron frotis vaginales diarios a todos los animales para poder determinar la ciclicidad estral y cuantificar el número de ciclos estrales por rata. En **a)** se puede observar el número de ciclos estrales por rata en animales fértiles Sham y LIF, mientras que en **b)** se observa el número de ciclos estrales por rata en animales subfértiles Sham y LIF. En esta figura están representados aquellos animales sometidos a cirugía e implantación de bomba miniosmótica tanto del objetivo 2), en donde los ovarios fueron utilizados para la determinación de de ACh y actividad AChE ovárica, como del objetivo 3) en donde los ovarios fueron fijados y teñidos para realizar análisis morfológico y evaluar el desarrollo folicular.

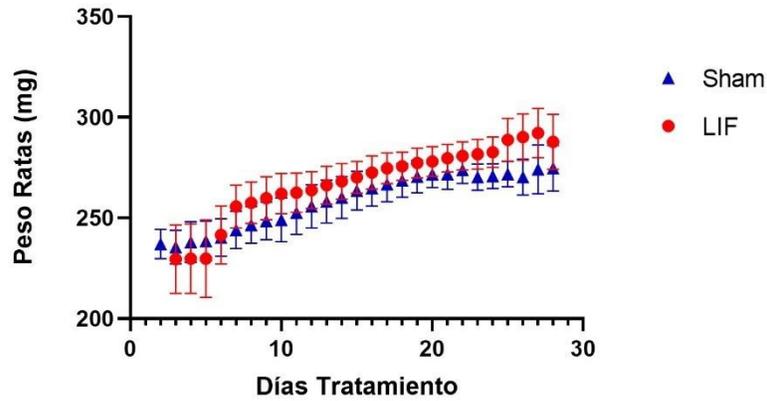


Figura suplementaria 8

LIF no produce cambios en los pesos por rata en animales fértiles. Seguimiento diario del peso de a) ratas fértiles (2 meses más 1 mes de tratamiento) durante 28 días de tratamiento con 100 ng/ml de LIF. triángulos azules representan a los animales implantados con cánula (Sham) mientras que círculos rojos representan a animales implantados con la bomba miniosmótica (LIF). Cada punto representa el promedio de los pesos de los animales de ese día presentados como la media \pm SEM. Esta figura incluye los animales utilizados para el experimento de fertilidad del Objetivo 3 (n=6, animales totales).

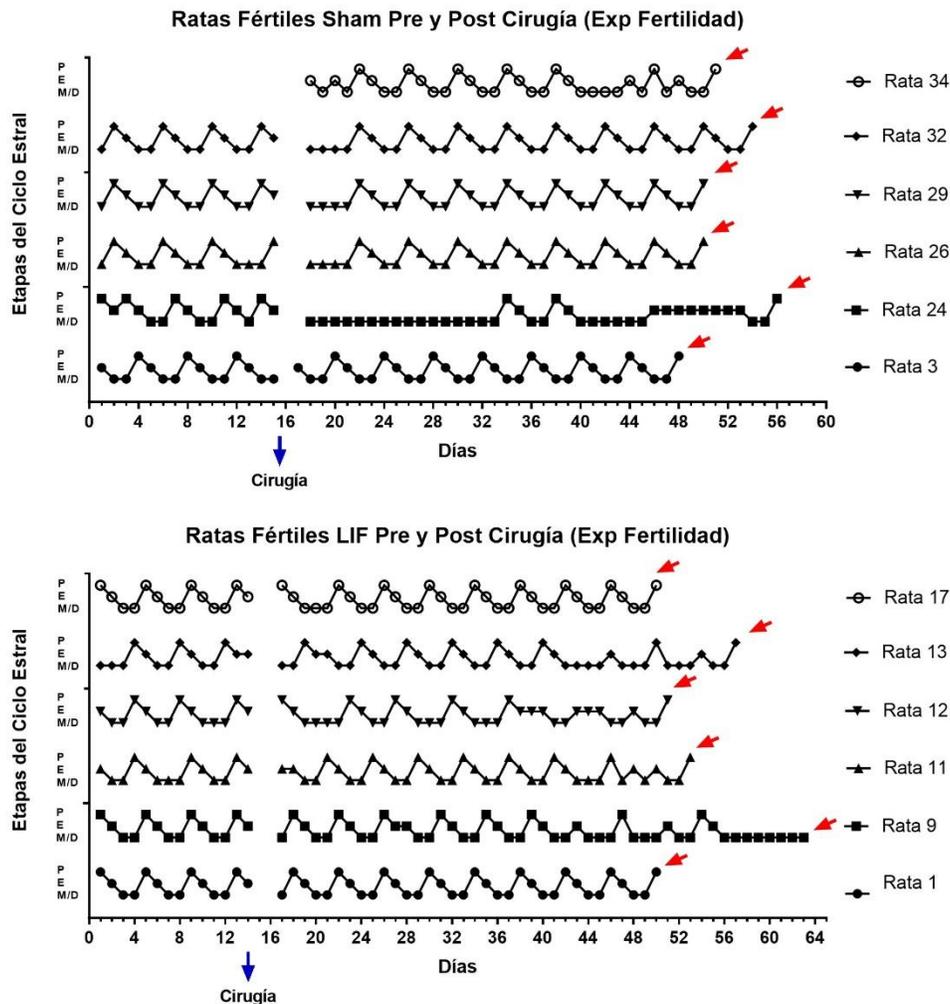


Figura suplementaria 9

LIF no produce cambios en el número de ciclos estrales por rata en animales fértiles y subfértiles.

Se realizaron frotis vaginales diarios a todos los animales para poder determinar la ciclicidad estral y cuantificar el número de ciclos estrales por rata. En **a)** se puede observar el número de ciclos estrales por rata en animales fértiles Sham y LIF, mientras que en **b)** se observa el número de ciclos estrales por rata en animales subfértiles Sham y LIF. En esta figura están representados aquellos animales sometidos a cirugía e implantación de bomba miniosmótica tanto del objetivo 2), en donde los ovarios fueron utilizados para la determinación de de ACh y actividad AChE ovárica, como del objetivo 3) en donde los ovarios fueron fijados y teñidos para realizar análisis morfométrico y evaluar el desarrollo folicular.