

117
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias

EL PAPEL DE LA INHIBINA EN LA
MADURACION FOLICULAR

T E S I S

Que para obtener el Título de

B I O L O G O

p r e s e n t a

GLORIA ESTHER MERCADO SANCHEZ

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. JUDITH TELLEZ MARTINEZ

México, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PRESENTACION.	1
1.- EJE HIPOTALAMO HIPOFISIS GONADA.	3
1.1.- CARACTERISTICAS ANATOMICAS Y FISIOLÓGICAS DEL HIPOTALAMO.	3
1.1.1.- NUCLEOS HIPOTALAMICOS.	3
1.1.2.- SISTEMA DOPAMINERGICO.	4
1.1.3.- CONEXIONES DEL HIPOTALAMO.	4
1.1.4.- HORMONAS DEL HIPOTALAMO.	4
1.2.- CARACTERISTICAS ANATOMICAS Y FISIOLÓGICAS DE LA HIPOFISIS.	5
1.2.1.- APORTE SANGUINEO.	6
1.2.2.- ESTRUCTURA CELULAR DE LA HIPOFISIS.	6
1.2.3.- PARS DISTALIS.	7
1.2.4.- PARS TUBERALIS.	9
1.2.5.- PARS INTERMEDIA.	9
1.3.- CARACTERISTICAS ANATOMICAS DEL OVARIO, CICLO OVARICO Y CICLO HORMONAL	10
1.4.- RELACION DE LA INHIBINA CON EL EJE HIPOTALAMO HIPOFISIS GONADA.	14
2.- REVISION DEL CONOCIMIENTO ACTUAL DE LA INHIBINA.	15
2.1.- COMPOSICION QUIMICA, ANALISIS ESTRUCTURAL, AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION.	15
2.1.1.- PESO MOLECULAR	16
2.1.2.- DIGESTION ENZIMATICA, TEMPERATURA Y ESTABILIDAD DE LA MOLECULA DE INHIBINA	20
2.1.3.- PH Y PUNTO ISOELECTRICO	21
2.1.4.- PURIFICACION	21
2.1.5.- SECUENCIA AMINOACIDA	22
2.1.6.- ESTUDIOS INMUNOLOGICOS	25
2.2.- ORGANOS Y TEJIDOS PRODUCTORES DE INHIBINA	27
2.3.- HOMOLOGIAS DE LA INHIBINA EN DIFERENTES ESPECIES Y SEXOS	28
2.4.- METODOS UTILIZADOS PARA LA CUANTIFICACION DE LA INHIBINA	29
2.4.1.- VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS METODOS UTILIZADOS PARA LA CUANTIFICACION DE LA INHIBINA	32
2.5.- ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y MECANISMOS DE RETROALIMENTACION	34
2.5.1.- ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA INHIBINA	34
2.5.2.- INHIBINA Y HORMONAS ESTEROIDES	37
2.5.3.- INHIBINA Y GONADOTROPINAS.	40
2.5.4.- MECANISMOS DE TRANSPORTE DE LA INHIBINA	44
2.5.5.- INHIBINA Y SU RELACION CON EL CAMBIO EN FORMA Y TAMAÑO DE LAS CELULAS FOLICULARES	45
2.5.6.- INHIBINA Y SU RELACION CON LA EDAD	46
2.5.7.- LOCALIZACION DE ARN MENSAJERO DE INHIBINA	47
2.5.8.- RELACION DE LA INHIBINA CON FACTORES DE CRECIMIENTO	50
2.6.- ACTIVINA Y FOLISTATINA, SU RELACION CON INHIBINA	53

3.- ACTIVIDAD DE LA INHIBINA EN CICLOS ESPONTANEOS E INDUCIDOS Y SU RELACION CON LA MADURACION DEL OVOCITO	58
3.1.- PRODUCCION DE LA INHIBINA EN CELULAS DE LA GRANULOSA IN VIVO	58
3.1.1.- CARACTERISTICAS MOLECULARES DE LA INHIBINA	60
3.1.2.- NIVELES DE INHIBINA EN RELACION A FSH Y LH	60
3.2.- PRODUCCION DE LA INHIBINA EN CELULAS DE LA TECA	63
3.3.- ESTUDIOS IN VITRO DE LA PRODUCCION DE INHIBINA	65
4.- CORRELACION ENTRE LOS NIVELES DE INHIBINA CON LOS NIVELES FOLICULARES DE FSH, LH, ESTROGENOS, PROGESTERONA Y PROLACTINA	67
4.1.- NIVELES DE INHIBINA DURANTE EL CICLO MENSTRUAL	67
4.2.- NIVELES DE INHIBINA SEGUN LA MADUREZ DEL OVOCITO	70
4.3.- NIVELES DE INHIBINA EN CICLOS INDUCIDOS	71
4.4.- NIVELES DE INHIBINA EN MUJERES CON OVARIO POLIQUISTICO	73
4.5.- NIVELES DE INHIBINA DURANTE EL EMBARAZO	74
4.6.- CONTROL DE LA PRODUCCION DE INHIBINA	76
4.7.- INHIBINA Y ACTIVINA	76
CONCLUSIONES	79
APENDICE DE METODOLOGIAS Y CONCEPTOS EMPLEADOS EN EL TEXTO	81
INDICE DE ABREVIATURAS	84
BIBLIOGRAFIA	86

PRESENTACION.

El estudio clínico de parejas con problemas de infertilidad ha permitido la localización de algunas de las alteraciones tanto en el factor masculino como en el femenino, dando origen al desarrollo de numerosas metodologías para su solución. Algunos de los métodos usados para reunir de forma artificial a los gametos masculino y femenino para lograr el desarrollo de un embrión y en consecuencia un embarazo son: inseminación intrauterina (IIU), transferencia de gametos a las trompas de Falopio (GIFT), fertilización *in vitro* y transferencia intrauterina de embriones (FIVTE). Estas metodologías son altamente especializadas debido a que los gametos son células muy frágiles y susceptibles de perecer en condiciones inadecuadas y por tanto requieren de su mejor conocimiento.

En el caso del gameto femenino se sabe que en un ciclo ovárico normal, la FSH estimula a un gran número de folículos primordiales para su desarrollo. Sin embargo, sólo uno de éstos folículos llega a la madurez y, por ende a la ovulación; los demás presentan atresia, limitando así las posibilidades de un embarazo, ya que se sabe que no siempre éste óvulo llega a ser fecundado aún cuando se encuentre en las mejores condiciones, o bien, en caso de fecundarse, en muchas ocasiones no se presenta la segmentación adecuada, por lo cual no se produce el desarrollo de un embrión. Son múltiples los factores que intervienen en éste proceso, en el que está involucrado el estado de madurez del ovocito y del espermatozoide en forma inicial. En los programas de Reproducción Asistida los ciclos ováricos son inducidos utilizando para ello compuestos como: citrato de clomifeno (CC), gonadotropina postmenopáusicas humana (hMG), bromocriptina, hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y gonadotropina coriónica humana (hCG). Con éstos inductores de la ovulación se estimula a un mayor número de folículos primordiales a crecer y madurar, con lo cual se aseguran mayores posibilidades de embarazo.

En el GIFT y en el FIVTE, los ovocitos son extraídos de los folículos ováricos por laparoscopia o ultrasonido vaginal. El momento de captura de los ovocitos se realiza en base al tamaño de los folículos, medido por ultrasonografía (mayor de 18 mm de diámetro), a los niveles de estradiol sérico (mayor a 500 pg/folículo) y a la elevación sanguínea de LH.

El grado de madurez del ovocito es importante, ya que de él depende el momento en que sea colocado en presencia de espermatozoides: si el ovocito es inmaduro al colocarlo en presencia de éstos se inhibe el desprendimiento del primer cuerpo polar y esto impide que el ovocito sea fecundado.

Algunos inductores de la ovulación señalan un desfaseamiento entre las características morfológicas del ovocito y el grado real de madurez, por lo cual se ha buscado en el líquido folicular algún otro marcador interno que permita conocer el estado real del ovocito, ciertos

marcadores han sido estudiados y localizados a nivel de la producción de E_2 , P_4 , fosfatasa ácida, proteínas y barrido espectrofotométrico del líquido folicular. Pero muchas de éstas determinaciones son de proceso lento y los resultados se obtienen varios días después. Otro parámetro que permite conocer mejor la evolución del folículo y del ovocito está dado por los niveles de la hormona peptídica, conocida con el nombre de inhibina o foliculostatina y que es producida por las células de la granulosa y se localiza tanto en el líquido folicular como en el plasma sanguíneo. Esta sustancia se describió primero como una hormona masculina; actualmente se sabe que es idéntica en ambos sexos y que se localiza en diferentes especies de vertebrados e invertebrados.

La actividad de ésta hormona es de gran interés en la regulación del eje hipófisis-gónada y por ello surge la necesidad de realizar una búsqueda bibliográfica que permita conocer mejor sus características fisiológicas, además de implementar su posible uso en el estudio de la evolución folicular en ciclos normales e inducidos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

REALIZAR UN ANALISIS BIBLIOGRAFICO DE LAS CARACTERISTICAS DE LA INHIBINA.

OBJETIVOS PARTICULARES:

A) CONOCER LA COMPOSICION QUIMICA Y ESTRUCTURA, ASI COMO LAS TECNICAS QUE SE HAN UTILIZADO PARA EL AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LA INHIBINA.

B) DESCRIBIR LAS HOMOLOGIAS DE LA INHIBINA EN DIFERENTES ESPECIES Y SEXOS.

C) CONOCER LOS ORGANOS Y TEJIDOS PRODUCTORES DE INHIBINA.

D) EXPLICAR LA ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LA INHIBINA, ASI COMO SU RELACION CON LA ACTIVINA Y LA FOLISTATINA.

E) CONOCER LA ACTIVIDAD DE LA INHIBINA EN CICLOS ESPONTANEOS E INDUCIDOS Y SU RELACION CON LA MADURACION DEL OVOCITO.

F) DESCRIBIR LA RELACION EXISTENTE ENTRE LOS NIVELES DE INHIBINA CON LOS DE FSH, LH, ESTROGENOS, PROGESTERONA Y PROLACTINA.

1.- EJE HIPOTALAMO HIPOFISIS GONADA.

1.1.- CARACTERISTICAS ANATOMICAS Y FISIOLÓGICAS DEL HIPOTALAMO.

Por definición, el hipotálamo está ubicado por debajo del tálamo óptico y recubre la pared lateral y borde inferior del tercer ventrículo como un manto multineuronal multisináptico que en algunos puntos se condensa constituyendo los denominados "núcleos". Según el tamaño celular se describe un sistema magno celular con neuronas muy desarrolladas e irrigadas, productoras de vasopresina y hormona antidiurética y otro sistema parvocelular, con elementos más pequeños, distribuidos principalmente en el área mediobasal. El límite anterior se corresponde con un plano perpendicular y frontal al quiasma óptico y el posterior, por otro límite que pasa por detrás de los tubérculos o cuerpos mamilares. En la parte inferior, el piso acanalado del tercer ventrículo, recubierto por tejido nervioso, da origen a una formación central prominente llamada eminencia media, donde parece originarse el tallo pituitario¹.

Los límites laterales son más difíciles de precisar y como referencia se mencionan distintas estructuras distales al hipotálamo, a saber: la porción más inferior del tálamo óptico, la cápsula interna, el globo pálido del cuerpo estriado, el asa lenticular y, por último la vía óptica. Esta pequeña zona del diencefalo de aproximadamente 10 g y con una superficie no mayor de 1 cm² presenta una inmensa especialización anatómica y funcional. La irrigación sanguínea del hipotálamo es la más rica del sistema nervioso central¹.

1.1.1.- Núcleos hipotalámicos.

La porción lateral, comprende agrupaciones neuronales (núcleo hipotalámico lateral) que actúan como estación de relevo para las fibras nerviosas que ingresan en los núcleos mediales principales o salen de ellos (hipotálamo medio). Existen núcleos en la porción anterior (pretuberal), media (tuberal) y posterior (mamilar). En la región anterior se observan neuronas de gran tamaño y gran vascularización que constituyen el sistema magno celular. Incluyen núcleos como el paraventricular (hormona antidiurética), el supraóptico (hormona oxitócica) y el supraquísmico (rítmos circadianos). La porción intermedia o tuberal presenta en su parte inferior o ventral numerosos núcleos de células más pequeñas (sistema parvocelular), estrechamente vinculadas con las funciones de la adenohipófisis y que por éste motivo fué denominada área hipofisótropa del hipotálamo. Dentro de éstos núcleos, el núcleo arcuato o subarcuato es el principal productor de GnRH, que promueve la síntesis de LH y FSH¹ (Fig 1).

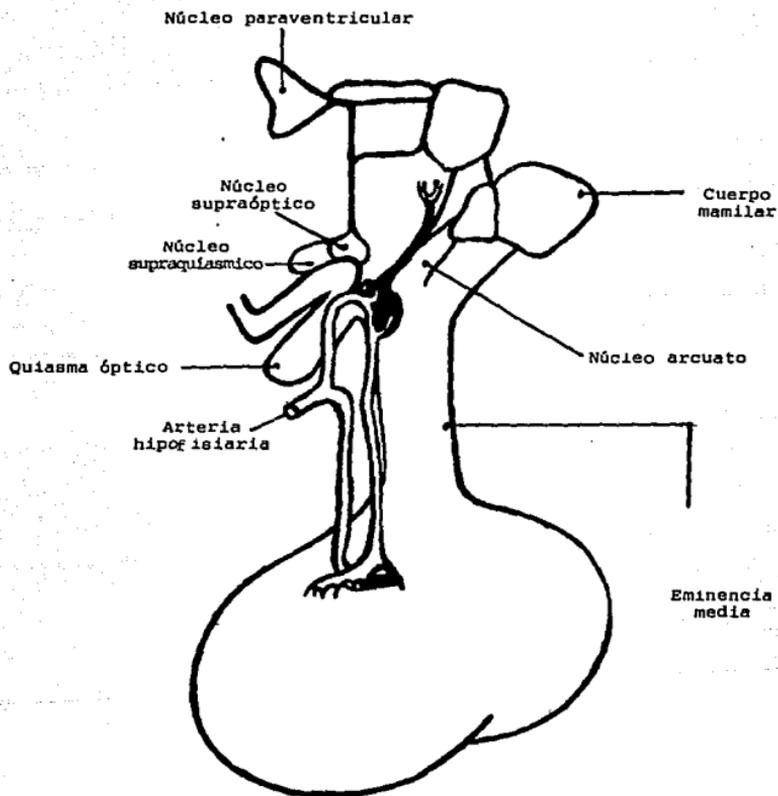


FIGURA 1: UNIDAD HIPOTALAMO - HIPOFISIARIA.
 REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LOS NUCLEOS QUE INTEGRAN EL HIPOTALAMO.

(Asch R. 1988. Avances en Reproducción Humana.
 Ed. Médica Panamericana. Redibujado E. Mercado).

1.1.2.- Sistema dopaminérgico.

Diseminadas en el núcleo arcuato y el periventricular adyacente a él y profundamente situado sobre la red lateral del tercer ventrículo se encuentran neuronas dopaminérgicas, cuyos axones se proyectan sobre la zona empalizada de la eminencia media, éstas terminales se juntan con las provenientes del núcleo arcuato y el área hipofisótropa; en algunas especies animales constituyen hasta el 30 % del total, todas en íntimo contacto con los capilares sinusoidales del sistema portal y encéfalohipofisario¹.

1.1.3.- Conexiones del hipotálamo.

Esta región del diencefalo mantiene conexiones con diferentes áreas del sistema nervioso central mediante vías definidas o tractos nerviosos, que lo vinculan con el paleocórtex y con el neocórtex. A su vez presentan una estrecha asociación funcional con la adenohipófisis, mediante el sistema arterial porta¹.

1.1.4.- Hormonas del hipotálamo.

Las células neurosecretoras del sistema nervioso central se caracterizan por la producción de sustancias relativamente simples, de molécula pequeña, que actúan modulando la acción de otras neuronas (neurotransmisores) o bien, modificando el comportamiento de órganos blanco a través de la circulación sanguínea (neurohormonas). Dentro de las primeras se encuentran células monoaminérgicas que liberan en sus terminales dopamina, norepinefrina, serotonina, etc. En el segundo grupo se tiene a aquellas sustancias que se depositan y liberan a nivel de la neurohipófisis y a las neuronas peptidérgicas, cuyas hormonas regulan la función adenohipofisiaria. Dentro de éste último grupo se encuentra un decapeptido denominado "hormona liberadora de gonadotropinas" (GnRH) o bien "hormona liberadora de LH" (LHRH) cuya función es regular la secreción de las gonadotropinas¹.

Este polipéptido se identifica en el hipotálamo fetal desde aproximadamente las 12 semanas de vida. Su distribución en el sistema nervioso central es relativamente amplia, hallándose neuronas peptidérgicas de éste tipo aún fuera del hipotálamo, por ejemplo en el órgano vasculoso de la lámina terminal¹.

En la mujer se ha comprobado la naturaleza pulsátil de la secreción del decapeptido hipotalámico, con ciclos que se repiten cada 90 a 120 minutos al inicio de la maduración folicular, luego la pulsatilidad se regulariza y aumenta nuevamente en el período periovulatorio, para posteriormente disminuir su frecuencia en forma notoria durante la formación del cuerpo lúteo con pocos pulsos en las 24 horas al final de éste¹.

1.2.- CARACTERISTICAS ANATOMICAS Y FISIOLÓGICAS DE LA HIPOFISIS.

La glándula pituitaria o hipófisis es un órgano pequeño, que pesa alrededor de 0.5 gr y cuyas dimensiones normales en el humano son aproximadamente 10 x 13 x 6 mm, Descansa en la base del cerebro, debajo del hipotálamo, con el cual tiene relaciones anatómicas y funcionales, en una cavidad ósea llamada la "silla turca" ².

La pituitaria se forma tempranamente en la vida embrionaria y tiene un origen doble, que se desarrolla en parte del ectodermo oral y en parte del tejido nervioso. La parte que se origina del tejido nervioso, se desarrolla a partir de una evaginación del piso del diencéfalo y crece caudalmente sin separarse del cerebro, formando un tallo. Una evaginación del ectodermo del techo de la boca primitiva del embrión crece cranealmente, formando una cavidad llamada "bolsa de Rathke", en una etapa posterior, una construcción en la base de ésta bolsa lo separa de la cavidad oral. Su pared interior se desarrolla al mismo tiempo, reduciendo el tamaño del lómen de ésta, que se vuelve un tejido pequeño² (Fig 2A, B Y C).

La parte de la pituitaria que se desarrolla del tejido nervioso se conoce como neurohipófisis. Consiste en una porción larga, la "pars nervosa" o proceso infundibular y el infundíbulo o tallo neural. El infundíbulo está compuesto por el tallo y la eminencia media; se une con el hipotálamo que sirve para conectar la pituitaria con el sistema nervioso central. A través del infundíbulo pasan tractos nerviosos importantes y sustancias que actuarán sobre el lóbulo anterior de la pituitaria² (Fig 3).

La parte de la pituitaria que se origina del ectodermo oral se conoce como adenohipófisis y está subdividida en tres porciones; una parte larga, la "pars distalis" o "lóbulo anterior", una parte craneal o "pars tuberalis" que rodea al infundíbulo y la parte intermedia "pars intermedia", entre la neurohipófisis y la "pars distalis", separada de ésta última por el tejido remanente de la cavidad primitiva de la bolsa de Rathke, la cresta residual² (Fig 3).

El lóbulo posterior de la pituitaria consiste de la "pars nervosa" y de la "pars intermedia". La glándula está cubierta por una cápsula de tejido conectivo y está situada en una depresión del hueso esfenoidal. Entre el periosteo del hueso esfenoidal y la cápsula de la glándula pituitaria se encuentra tejido conectivo laxo con un drenaje abundante de vasos² (Fig 3).

FIG. 2-A: Sección sagital de la región del cerebro anterior de un embrión de 23 días, mostrando la relación de la adenohipófisis y el puente neural ventral en el momento en que el neuroporo del tubo neural aún está abierto.

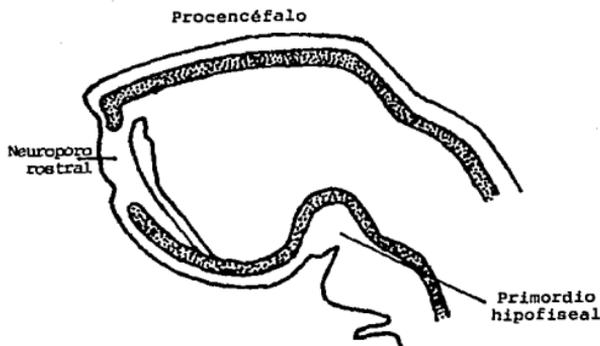


FIG. 2-B: Sección sagital de la región cefálica de un embrión de 4 semanas, mostrando la bolsa de Rathke como una evaginación de la cavidad oral, y el infundíbulo como un engrosamiento del piso del diencéfalo.

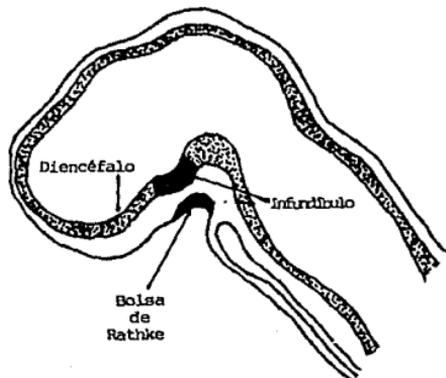


FIGURA 2: DESARROLLO EMBRIONARIO DEL COMPLEJO HIPOTALAMO - PITUITARIA EN HUMANO.
(Meisami E. 1989. Handbook of human growth and developmental biology.
C.R.C. Press Inc. Redibujado V. de Montanaro y E. Mercado).



FIGURA 2-C: DESARROLLO POSTERIOR DE LA HIPOFISIS
 SECCIONES SAGITALES DEL DESARROLLO DEL COMPLEJO HIPOTALAMO - PITUITARIA
 A LAS 4, 6 Y 16 SEMANAS DE GESTACION.

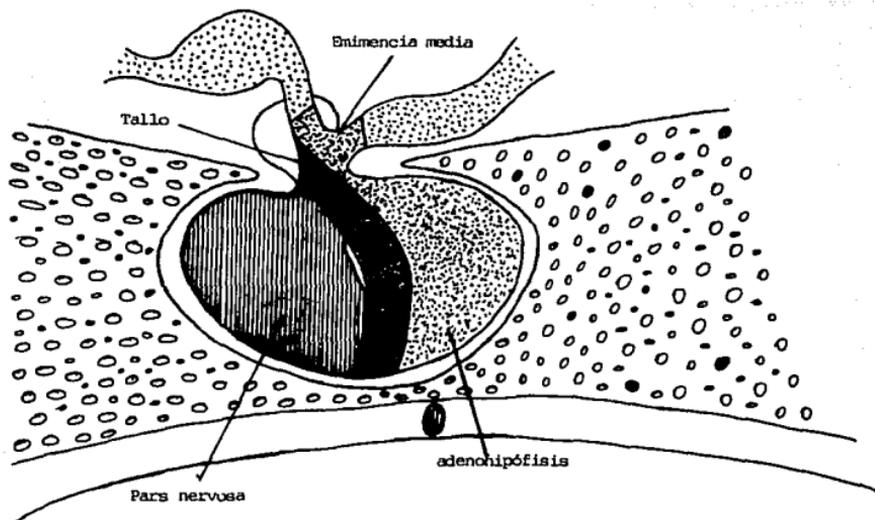


FIGURA 2: DESARROLLO EMBRIONARIO DEL COMPLEJO HIPOTALAMO - PITUITARIA EN HUMANO.
 (Meisami E. 1989. Handbook of human growth and developmental biology.
 C.R.C. Press Inc. Redibujado V. de Montanaro y E. Mercado).

1.2.1.- Aporte sanguíneo.

El aporte de sangre de la pituitaria deriva de dos grupos de vasos sanguíneos: de la parte superior, las arterias hipofisiales superiores derecha e izquierda, y de la parte inferior las arterias hipofisiales inferiores derecha e izquierda. Las arterias hipofisiales superiores posteriores y anteriores abastecen principalmente la porción más craneal del tallo pituitario, donde se ramifican. Al mismo tiempo tienen ramas hacia la porción hipotalámica y caudal del tallo pituitario. Los capilares así formados se juntan nuevamente dando origen a venas que se dividen nuevamente en la "pars distalis", formando capilares sinusoides, constituyendo así, un sistema portal² (Fig 4).

Esta disposición vascular hace posible el transporte de hormonas de la porción craneal del tallo pituitario a las células de la "pars distalis". Hay dos arterias hipofisiales menores corriendo a lo largo de la glándula y abasteciendo el lóbulo posterior de la pituitaria. La sangre de ambos lóbulos pituitarios, drena al seno cavernoso a través de muchos canales venosos² (Fig 4).

El abastecimiento nervioso del lóbulo anterior se deriva del plexo carotideo que acompaña a las ramas anteriores. Estos nervios parecen tener una función vasomotora y no afectan directamente a las células del lóbulo anterior².

1.2.2.- Estructura celular de la hipófisis.

Se clasifican en tres tipos en base a la hormona que secretan y a sus características de tinción².

a) Células somatotrópicas.

Ultraestructuralmente se observan con el microscopio electrónico por sus numerosos gránulos secretores densos de 300-350 nm de diámetro. La célula tiene un núcleo central cerca del cual se encuentra un gran aparato de Golgi. Están relacionadas con la producción de hormonas de crecimiento².

b) Células mamotrópicas.

Al microscopio electrónico se observan con gránulos secretores densos 550-600 nm de diámetro y son de varias formas. El número y tamaño de estas células aumenta durante el embarazo y la lactancia. Secretan hormona lactogénica (hormona luteotrópica, LTH, también llamada prolactina)².

c) Células gonadotropas.

Las células que producen la FSH muestran, tanto al microscopio óptico como electrónico, un cuerpo celular

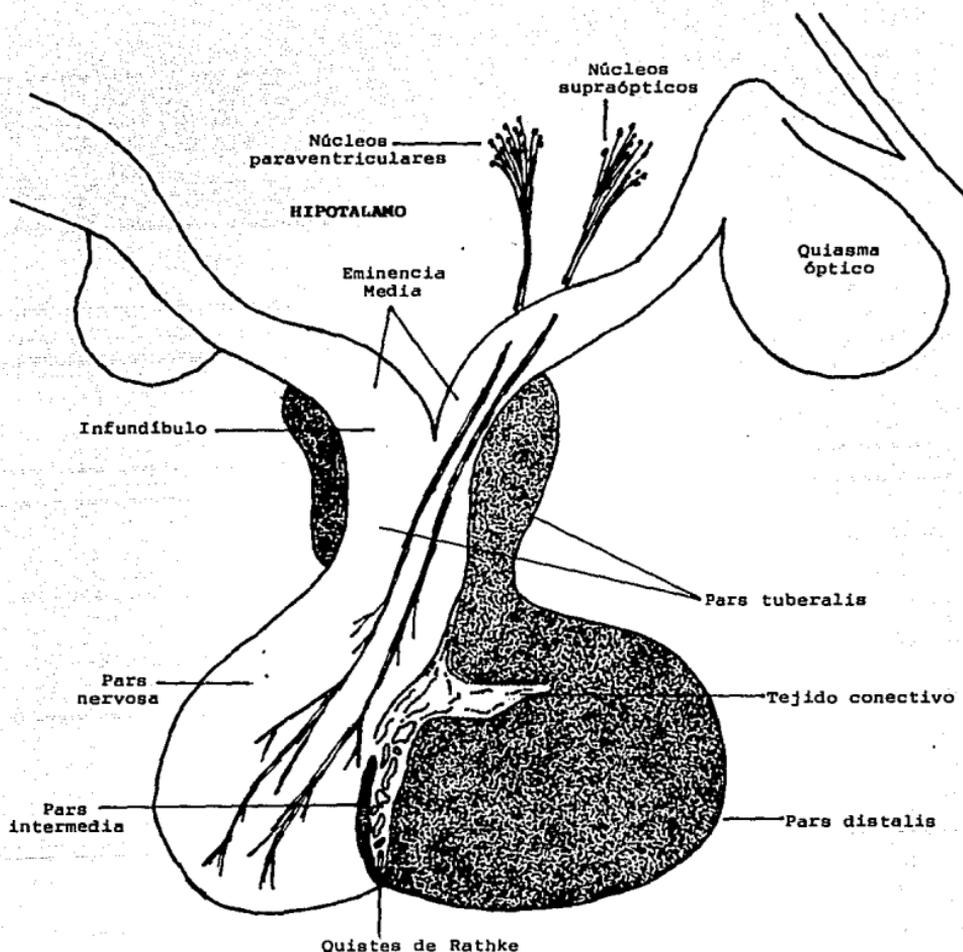


FIGURA 3: PARTES QUE COMPONEN LA PITUITARIA Y SU RELACION CON EL HIPOTALAMO. (Junqueira L.C. 1977. Basic Histology. Lange Medical Publications. Redibujado E. Mercado).

redondo y grande. En el citoplasma se observan gránulos secretorios densos usualmente de 200 nm de diámetro. El aparato de Golgi está bien desarrollado. El retículo endoplásmico granular está compuesto de elementos vesiculares distendidos.

Por otro lado están las células gonadotropas que secretan LH (en el macho también se llama hormona estimuladora de las células intersticiales (ISCH)). Estas células son pequeñas y redondas, con granulos densos más grandes y más uniformes en tamaño - aproximadamente 250 nm de diámetro- que los que producen FSH.

En el humano ambos tipos de células gonadotropas se distribuyen únicamente a lo largo de la pituitaria, y ambas pertenecen al subgrupo basófilo.

d) Células tirotrópicas. Producen TSH (hormona estimuladora de la tiroides o tirotrófina), están localizadas principalmente en la parte central de la adenohipófisis. Son largas y poliédricas, fácilmente identificables en el microscopio electrónico por sus granulos pequeños (120-200 nm de diámetro).

e) Células corticotropas y melanotropas.

Las células corticotropas producen hormona adrenocorticotropa, (corticotropina, ACTH) y las células melanotrópicas producen hormona estimulante de los melanocitos (MSH). Las células humanas corticotropas humanas se identifican por inmunotinción con un antisuero específico para corticotropina. Se encuentran principalmente en la parte central de la pituitaria, algunas en la porción lateral y algunas en la pars tuberalis.

1.2.3.- Pars distalis.

En oposición a la neurohipófisis que tiene algunas características del sistema nervioso, la parte de la pituitaria que deriva del ectodermo oral presenta la apariencia típica de una glándula endócrina, compuesta de células agrupadas en cordones y folículos. Sus capilares sinusoides son clásicamente considerados como parte del sistema macrofágico, aunque ha sido verificado que sus líneas celulares no tienen la capacidad de fagocitar².

En esta región se han descrito tres tipos de células: foliculares, cromóforas y cromófilas.

Las células foliculares son largas, con procesos citoplásmicos en forma de estrella que se interconectan formando una red que parece constituir puentes entre los capilares. Han sido descritos en varias especies (incluyendo la humana), tienen un citoplasma claramente perinuclear con pocos organelos y pocos o ningún gránulo secretorio. Probablemente forman parte del estroma de soporte de las células glandulares².

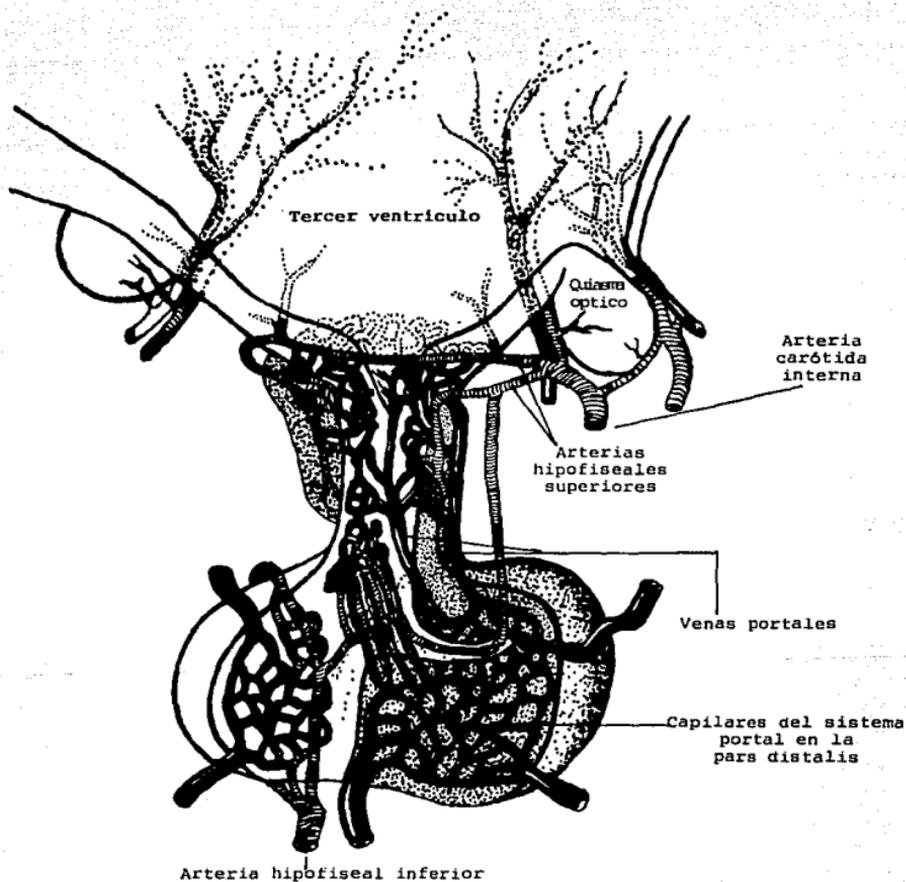


FIGURA 4: ABASTECIMIENTO DE SANGRE EN LA HIPOFISIS.
 (Junqueira L.C. 1977 Basic Histology. Lange Medical Publications. Redibujado M. Sánchez).

Las células cromóforas reciben éste nombre porque no tienen afinidad con las tinciones normalmente usadas en histología. Cuando se observan en el microscópio óptico no presentan gránulos secretorios visibles pero en el microscópio electrónico la mayoría de ellos los presenta y por ello son células glandulares activas².

Las células cromófilas contienen gránulos citoplasmáticos específicos que tienen gran afinidad con algunas tinciones. Se encuentran generalmente cerca de los capilares. Se clasifican como acidófilas o basófilas según la afinidad de sus gránulos para las tinciones ácidas o básicas.

Las hormonas sintetizadas en la pars distalis son capaces de ejercer varias clases de efectos. Algunas tienen acciones metabólicas generales en el organismo completo, mientras que otras actúan sobre estructuras específicas conocidas como "órgano blanco", éstos últimos incluyen casi todas las demás glándulas endócrinas² (Fig 5).

Estudios del abastecimiento de sangre a la pituitaria revelan que su sistema portal puede transportar sustancias a la pars distalis, producidas en el hipotálamo y acumuladas en la región infundibular y tuberal del hipotálamo. Se les han llamado factores liberadores o inhibidores de acuerdo a su capacidad para estimular o inhibir la liberación de hormonas producidas por las células de la pars distalis. Del hipotálamo de mamíferos se han extraído los siguientes factores:

- Factor liberador de la hormona de crecimiento
- Factor inhibidor de la hormona de crecimiento
- Factor liberador de la prolactina
- Factor inhibidor de la prolactina
- Factor liberador de la tirotropina
- Factor liberador de la hormona folículo estimulante
- Factor liberador de la hormona luteinizante
- Factor liberador de la corticotropina

Se ha postulado que éstos factores son sintetizados en el cuerpo de neuronas hipotalámicas o extrahipotalámicas aún desconocidas, y transportadas por sus axones a una región específica del hipotálamo: la eminencia media. En ésta región, se cree que los factores son acumulados en forma de gránulos secretorios en dilataciones con forma de bulbos al final de los axones. Estas estructuras están muy cercanas a vasos capilares primarios del sistema portal pituitario, mediante el cual se transportan los polipéptidos activos liberados de la eminencia media a la pars distalis. El control de la función de las glándulas por la influencia de las hormonas de la pars distalis es uno de los papeles más importantes de la pituitaria y está acompañado por mecanismos de retroalimentación².

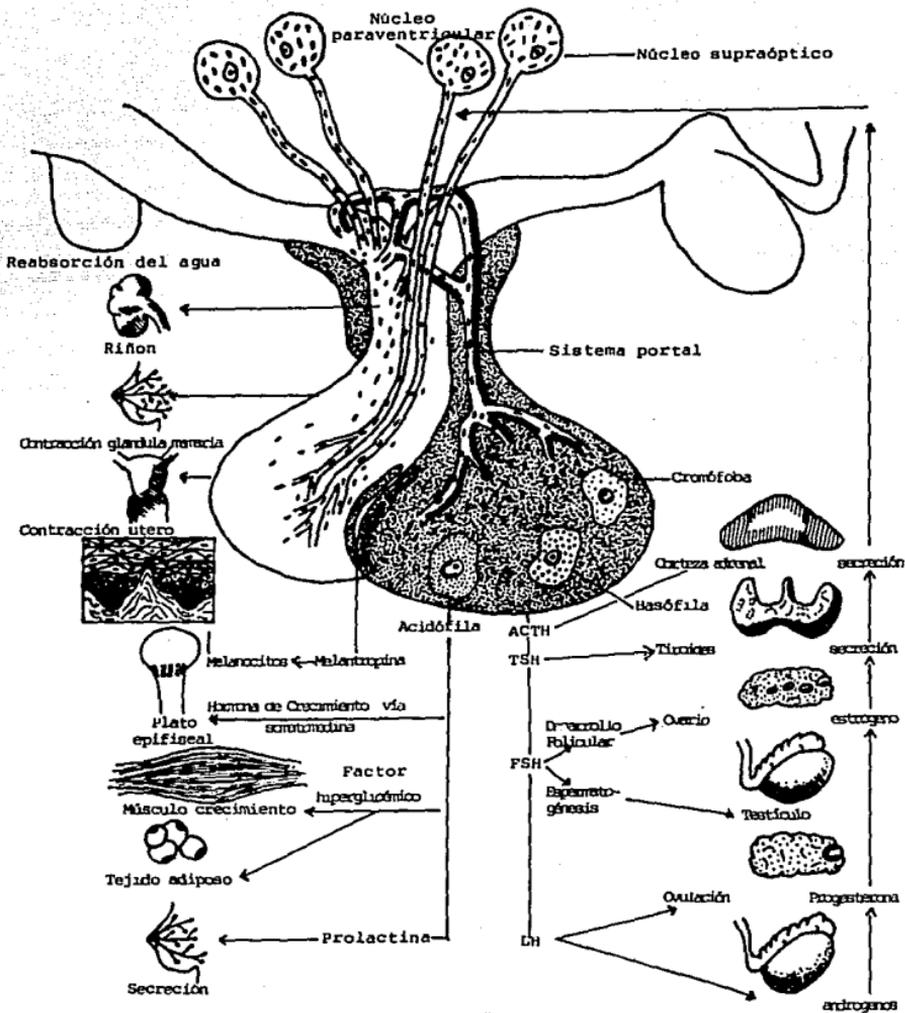


FIGURA 5: EFECTO DE VARIAS HORMONAS PITUITARIAS SOBRE ORGANOS Y BLANCOS. (Junqueira L.C. 1977. *Histology*. Lange Medical Publications. Redibujado E. Mexado).

1.2.4.- Pars tuberalis.

Es la región que rodea el infundíbulo de la neurohipófisis, microscópicamente está muy vascularizada; para lo cual se conecta con las arterias hipofisiales superiores que forman, en ésta región, la parte inicial del sistema portal hipofiseal. Sus células difieren en estructura e histoquímica de las de la pars distalis. Están arregladas en cordones alrededor de los vasos sanguíneos y su función aún se desconoce².

1.2.5.- Pars intermedia.

En el humano es una región rudimentaria, compuesta de células basófilas que presentan gránulos secretores pequeños (200-300 nm) apenas visibles en el microscópio electrónico. La fisura que se origina de la bolsa de Rathke, raramente se encuentra en el adulto y, en su lugar, aparecen folículos alineados por epitelio cuboidal; conocidos como quistes de Rathke. La pars intermedia sintetiza un polipéptido, la hormona estimuladora de los melanocitos, que en los anfibios actúa sobre los melanóforos, causando dispersión de los gránulos de melanina y, consecuentemente, oscureciendo la piel del animal. En el hombre la función de ésta región no guarda paralelismo.

1.3.- CARACTERISTICAS ANATOMICAS DEL OVARIO, CICLO OVARICO Y CICLO HORMONAL.

La influencia de la FSH y la LH en la formación de óvulos y espermatozoides en las gónadas es muy importante, ya que de ellas depende en gran parte la concepción de un nuevo organismo y el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-gónada³.

Las células que darán origen a los óvulos y espermatozoides, embrionariamente derivan de las células germinales primordiales (CGP), que se encuentran inicialmente en el endodermo del saco vitelino, cerca del alantoides. Conforme avanza el desarrollo del organismo van migrando, ayudadas por pseudópodos y corrientes sanguíneas, primero al intestino (aproximadamente de 13-20 somitas), luego al mesonefros (aproximadamente 20 somitas y alrededor de los 30 días después de la fertilización) y, finalmente, hacia el quinto mes de vida intrauterina, al primordio gonadal; donde la diferenciación en la zona cortical resultará en los ovarios y en la zona medular en los testículos³ (Fig 6).

Durante todo el trayecto, el número de células aumenta por mitosis, pero el aumento es mayor al llegar a la región gonadal (Tabla 1). Después de la última división mitótica, comienza la interfase celular, durante la cual se replica ADN para la meiosis y el núcleo se aprecia como una mancha, ésta etapa también se conoce con el nombre de preleptóteno por ser previa a la profase meiótica que comienza inmediatamente después con el leptóteno, identificado por el número diploide de cromosomas del padre y de la madre, seguido del cigóteno que se caracteriza por la atracción de los cromosomas homólogos y su apareamiento o sinápsis en algún punto, la duración de ésta fase es muy corta y continúa con la etapa de paquíteno, un poco más larga en comparación, en la que los cromosomas están apareados en toda su longitud, acortándose y engrosándose por espiralización mientras que se lleva a cabo el intercambio genético. En la siguiente fase, paquíteno tardío, se observa la formación de tétradas; seguido de ésta, el dictióteno marca un período de letargo durante el cual los cromosomas son altamente difusos y se replica ARN mensajero. Finalmente, la repulsión de los cromosomas y su separación excepto en las zonas donde ha ocurrido el entrecruzamiento (quiasmas) marca la etapa del diplóteno³.

Hasta ésta fase el proceso es idéntico para espermatogénesis y ovogénesis; posteriormente los ovocitos entran en un letargo que se termina poco antes de la ovulación, con cambios meióticos preovulatorios en el folículo de Graff. En especies como la humana, el primer ovocito viable lleva a cabo la meiosis en la pubertad, y el último en pasar por la maduración preovulatoria se encuentra en mujeres de 45 a 50 años³.

TABLA 1**DIFERENCIACION DE LAS CELULAS GERMINALES
EN EL OVARIO FETAL HUMANO**

ETAPA DE DESARROLLO	EDAD FETAL (SEMANAS)	APARIENCIA DEL OVARIO
INDIFERENCIA SEXUAL	4 - 6	CELULAS GERMINALES MIGRAN AL CANAL GENITAL
DIFERENCIACION SEXUAL DE LAS GONADAS	6 - 9	DIFERENCIACION TESTICULAR EVIDENTE, OVARIO NO DIFERENCIADO CON CELULAS GERMINALES PRIMITIVAS
PROLIFERACION DE OVOGONIAS	9 - 11	OVOGONIAS EN INTERFASE Y MITOSIS
INICIA LA OVOGENESIS	11 - 12	COMIENZA LA MEIOSIS
DIFERENCIACION DEL OVOCITO	12 - 18	OVOCITOS PASAN A LA PROFASE MEIOTICA, LAS OVOGONIAS PRESENTAN MUCHAS CELULAS GERMINALES EN DEGENERACION
FORMACION DEL FOLICULO	18 - 20	COMIENZA LA FORMACION DEL FOLICULO
CRECIMIENTO DEL FOLICULO	20 - FINAL	CONTINUA LA FORMACION DEL FOLICULO, SE COMPLETA LA DIFERENCIACION DEL OVOCITO HASTA EL DIPLOTENO Y COMIENZA EL CRECIMIENTO DEL FOLICULO

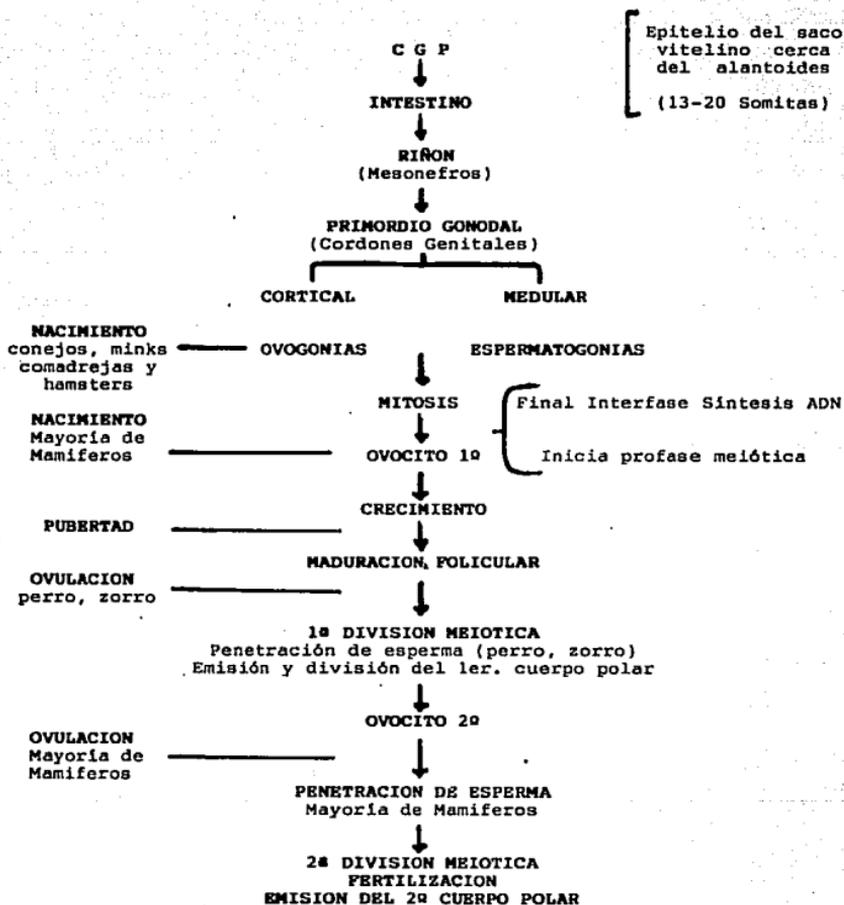


FIGURA 6: ETAPAS DE LA OVOGENESIS.
 (CGP = Células Germinales Primordiales)
 Agustín C.R. 1972. Reproduction in Mammals.
 Cambridge University Press.

En contraste, la meiosis en el macho comienza hasta la pubertad pero continúa sin interrupción durante toda la vida adulta³.

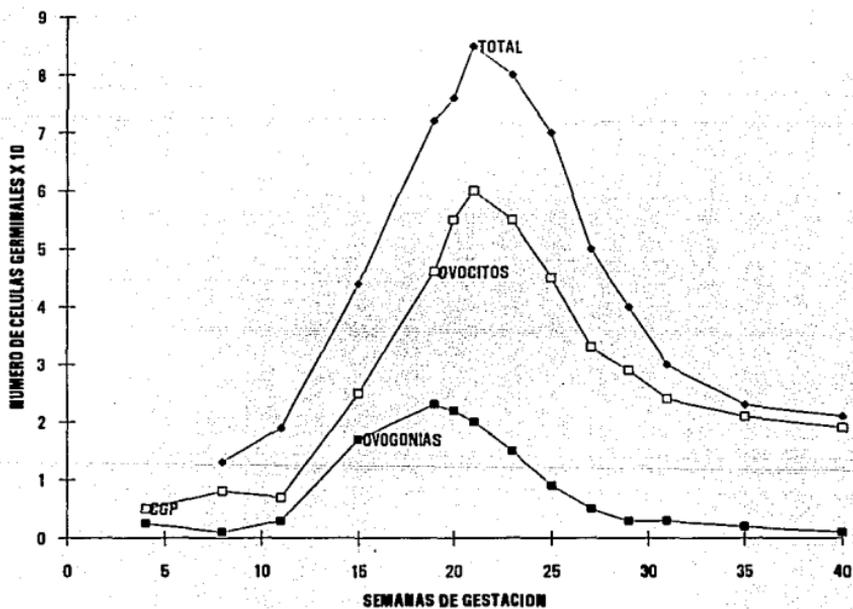
Muchas de las células germinales degeneran durante el período prefolicular, esto ocurre de tres formas distintas: afectando las ovogonias en mitosis, a los ovocitos en paquiteno o en diplóteno. El resultado es una reducción marcada en el número de ovocitos de un pico de 7 millones a mitad de la gestación, a aproximadamente 2 millones al momento del nacimiento (Fig 7). Posteriormente, en la hembra, el número de ovocitos también se reduce durante la atresia y la ovulación, en contraste a lo que ocurre en el macho, en el que los espermatoцитos pasan por las fases de la meiosis continuamente durante la vida adulta³.

Al momento del nacimiento, los ovarios de ratas, cuyos, ovejas, vacas, monos y humanos poseen ovocitos en etapa de diplóteno. Pero los ovarios de conejos, comadrejas, minks y hamsters dorados; poseen ovogonias y la profase de la meiosis se completa durante las primeras semanas de nacidos. Después del nacimiento, el posterior crecimiento de los ovocitos se da al desarrollarse células epiteliales alrededor de éstos, lo cual hace que el ovocito aumente de tamaño, identificándose como "folículo primordial" (Fig 6). En este momento el ovocito mide aproximadamente 25 Micras de diámetro, posee una membrana basal y una sola capa de células de granulosa y se encuentra en la zona cortical ovárica. Durante esta etapa no hay participación de las gonadotropinas³ (Fig 8).

Cuando el ovocito ha alcanzado un tamaño de aproximadamente 200 Micras comienza el crecimiento por multiplicación de las capas de células de granulosa. Se observa síntesis de ADN y el ovocito se aproxima a la médula, que es una zona muy vascularizada y endocrinológicamente más activa, formando las tecas (tejido que rodea al folículo). Además, aparecen las uniones de hendidura, que son sitios especializados en las células de la granulosa (cg) que facilitan el paso de información. Al final de esta etapa que caracteriza al folículo primario, el ovocito se encuentra rodeado por la zona pelúcida y continúa sin cambios hasta la ovulación. Esta última zona consiste de mucopolisacáridos y material digerible por tripsina, es una acumulación de material fibrilar entre las células de la granulosa y la superficie del ovocito, que posteriormente se va fusionando para formar una capa gelatinosa; cuya función es la transferencia de nutrientes y el bloqueo del paso de solutos de alto peso molecular como polisacáridos y proteínas. Alrededor del folículo también se desarrolla una capa vascular, llamada teca interna, que representa una fuente de nutrientes³ (Fig 9).

En el aspecto hormonal, aparecen los receptores de FSH y estrógenos, hay síntesis de receptores de testosterona y se dispone ya de una estructura enzimática para la síntesis de esteroides como progesterona, andrógenos y estrógenos (aunque su producción es limitada), hay aromatización de

**FIGURA 7.- NUMERO DE CELULAS GERMINALES EN EL OVARIO FETAL
CORRELACIONADO CON LA EDAD GESTACIONAL (CGP=CELULAS GERMINALES
PRIMORDIALES)**



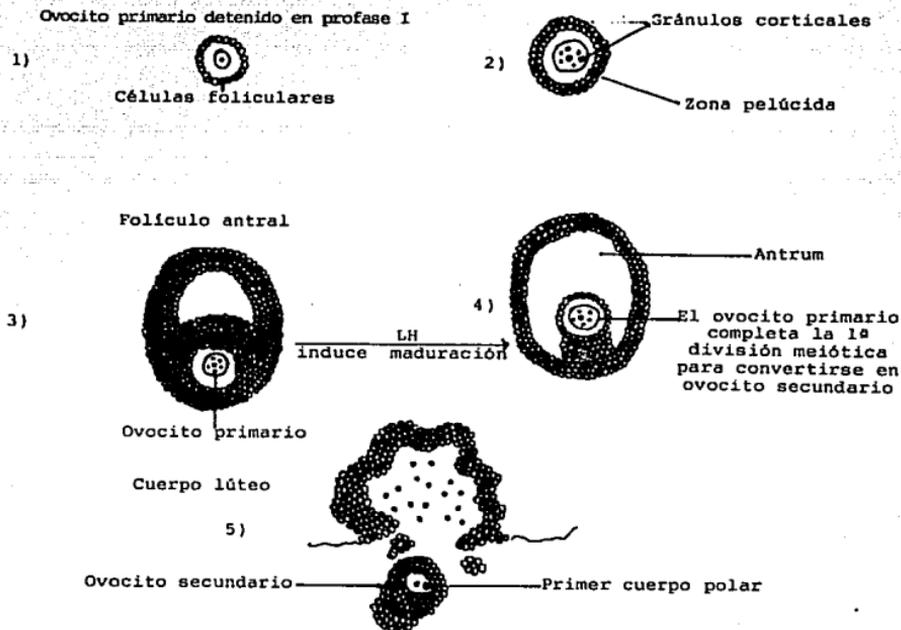


FIGURA 8: ETAPAS DEL DESARROLLO DEL OVOCITO HUMANO.

- 1) Antes del nacimiento, una pequeña porción de folículos primordiales comienza a crecer secuencialmente.
- 2) Algunos folículos en desarrollo acumulan fluido para convertirse en folículos antrales.
- 3) En la pubertad, una vez al mes, la elevación de LH activa alrededor de 20 folículos para acelerar su crecimiento, sin embargo, sólo uno de éstos llega a la madurez y ovula; el ovocito primario en éste folículo completa la Meiosis I para formar un cuerpo polar y un ovocito secundario.
- 4) El ovocito secundario, detenido en la metafase de la meiosis II, es liberado junto con el cuerpo polar y varias capas de células foliculares, al momento de la ruptura del folículo en la superficie del ovario. El ovocito secundario completará la segunda división meiótica para convertirse en un óvulo maduro, sólomente si es fertilizado.

Albert B. 1989. Molecular Biology of the Cell.
Garland Publishing Inc.

andrógenos que facilitan la síntesis de receptores de FSH y estrógenos así como la multiplicación de las células de la granulosa. La producción de andrógenos se debe a la teca y es dependiente de LH³.

Posteriormente el folículo secundario o antral se caracteriza por la formación de espacios confluentes que se van llenando de líquido folicular y poco a poco desplazan al ovocito a un polo para formar el *cumulus ophorus* (latín *cumulus*, montón *oon*, huevo, *phorus*, portador) (Fig 8). La formación del antro folicular favorece la nutrición del ovocito y las células de la granulosa, ya que el líquido folicular contiene mucopolisacáridos (secretados por las cg) y es un reservorio hormonal (Tabla 2). Se hace evidente la dominancia del folículo debido a la vascularización tecal y a la actividad de las gonadotropinas y de otros factores como la inhibina. El estradiol y la FSH que se encuentran en el líquido folicular garantizan el crecimiento posterior del folículo, facilitando la multiplicación de las células de la granulosa y por tanto una mejor expresión de las aromatasas. La concentración de LH es baja durante ésta fase y continúa así hasta que el folículo está próximo a la ovulación, también se desarrollan receptores de prostaglandinas y prolactina y comienza la esteroidogénesis³ (Tabla 3).

Finalmente, el folículo terciario o preovulatorio se caracteriza por tener un antro completamente formado, el *cumulus ophorus* se encuentra separado del resto de las células y flota libremente en el líquido folicular, el ovocito ha alcanzado los 20 mm de diámetro, las células de granulosa se encuentran cargadas de lípidos precursores de una esteroidogénesis más activa y se inicia la división reduccional (Fig 8). Hormonalmente se observa una máxima producción estrogénica que se mantiene por más de dos días y que genera una retroalimentación positiva para la oleada de LH, entre las 25 y las 35 horas antes de la ovulación. Comienza la producción de progesterona y los estrógenos ejercen una retroalimentación negativa sobre la FSH. La LH participará posteriormente en la ovulación y en la luteinización. La progesterona presenta niveles altos aproximadamente 24-48 horas antes de la ovulación, contribuyendo al pico de LH, ejerciendo una retroalimentación positiva sobre los estrógenos y actuando como mensajera de que el folículo se encuentra listo para la ovulación³.

Mientras tanto, la división reduccional se ha reiniciado dentro del ovocito. La "maduración preovulatoria" comienza con la metafase I; caracterizada por la unión de los cromosomas bivalentes y su disposición en microtúbulos en el ecuador del huso, continuando con la anafase I, que implica el movimiento de los cromosomas bivalentes a los extremos del huso y la orientación de éste radialmente, su rotación completa concluye en la telofase; en la que se observa la repulsión de los cromosomas y la división del citoplasma que origina dos células hijas; una con menos citoplasma que formará el primer cuerpo polar y otra con mayor citoplasma que será el ovocito secundario. Este último a su vez,

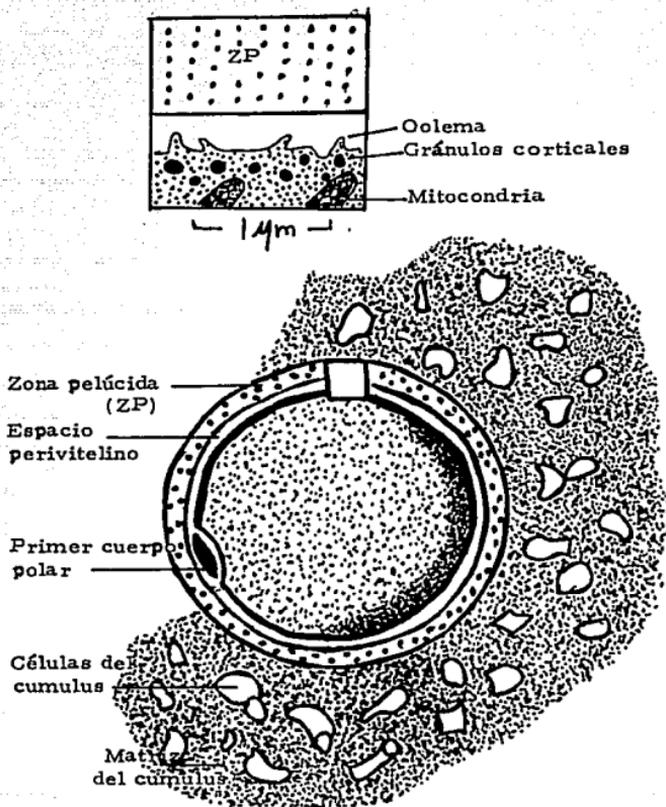


FIG 9.- DIAGRAMA DE UN OVOCITO DE MAMIFERO

Mesami E. 1989. Handbook of Human Growth and Developmental Biology. C.R.C. Press Inc. (Redibujado E. Mercado)

TABLA 2

**CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS Y PROTEINAS
EN EL FLUIDO FOLICULAR DE VACAS Y HUMANOS**

VACAS		
CARBOHIDRATOS		FLUIDO FOLICULAR (mg/100 ml)
GLUCOSA		39 - 43
OTROS CARBOHIDRATOS		8.3 - 10.5
ACIDO LACTICO		78 - 95
AZUCARES REDUCTORAS		35.3
HEXOSAS UNIDAS A PROTEINAS	FOLICULOS PEQUEÑOS	119.1
	FOLICULOS GRANDES	91.9
HUMANOS		
PROTEINAS		FLUIDO FOLICULAR (mg%)
ALBUMINA		2560
α_1 GLICOPROTEINA		45
Ig G		580
β , A - GLOBULINA		45
TRANSFERRINA		149
HAPTOGLOBULINA		65
Ig A		75
Ig M		17
α_2 MACROGLOBULINA		28

TABLA 3

ETAPAS Y CARACTERISTICAS DEL DESARROLLO DEL FOLICULO

FOLICULO PRIMORDIAL	
CARACTERISTICAS GENERALES	HORMONAS PARTICIPANTES
<ul style="list-style-type: none"> - OVOCITO 25µm DE DIAMETRO - OVOCITO, MEMBRANA BASAL Y CAPA DE CELULAS CUBICOPLANAS DE GRANULOSA - EN CORTICAL OVARICA 	<p>NO PARTICIPAN GONADOTROPINAS</p>
FOLICULO PRIMARIO	
<ul style="list-style-type: none"> - 200µm - CRECIMIENTO (SINTESIS DNA, MULTIPLICACION DE CELULAS DE LA GRANULOSA, DE 3 A 5 CAPAS) - APROXIMA A MEDULA PARA FORMAR TECAS - APARECEN UNIONES DE HENDIDURA (SITIOS ESPECIALIZADOS EN CELULAS GRANULOSAS QUE FACILITAN EL PASO DE INFORMACION) - FORMACION DE TECAS (TEJIDO QUE RODEA AL FOLICULO) - MIGRACION A LA MEDULA (ZONA VASCULARIZADA, ENDOCRINOLOGICAMENTE ACTIVA) - AL FINAL ESTA RODEADO POR ZONA PELUCIDA Y CONTINUA SIN CAMBIOS HASTA LA OVULACION 	<ul style="list-style-type: none"> - APARECEN RECEPTORES FSH Y EE - SINTESIS DE RECEPTORES DE TESTOSTERONA - DISPONE DE ESTRUCTURA ENZIMATICA PARA LA SINTESIS DE ESTEROIDES (PROGESTERONA, ANDROGENOS Y ESTROGENOS) PERO SU PRODUCCION ES LIMITADA EN ESTE PERIODO - AROMATIZACION DE ANDROGENOS, FACILITANDO SINTESIS DE RECEPTORES FSH Y EE - MULTIPLICACION DE CELULAS DE LA GRANULOSA - ANDROGENOS PRODUCIDOS POR TECA DEPENDIENTES DE LH
FOLICULO SECUNDARIO O ANTRAL	
<ul style="list-style-type: none"> - LOS ESPACIOS CONFLUENTES SE LLENAN DE LIQUIDO FOLICULAR Y DESPLAZAN AL OVOCITO A UN POLO PARA FORMAR EL CUMULUS OOFORUS - FORMACION DE ANTRO FOLICULAR (NUTRICION DEL OVOCITO Y CELULAS DE LA GRANULOSA) - CRECIMIENTO A 200µm - 20mm (ANTES DE LA OVULACION) - LIQUIDO FOLICULAR (MUCOPOLISACARIDOS SECRETADOS POR CELULAS DE LA GRANULOSA, RESERVORIO HORMONAL) - DOMINANCIA DEBIDA A LA VASCULARIZACION TECAL, LA ACTIVIDAD DE LAS GONADOTROPINAS Y OTROS FACTORES COMO LA INHIBINA 	<ul style="list-style-type: none"> - ESTRADIOL Y FSH EN LIQUIDO FOLICULAR QUE GARANTIZAN EL CRECIMIENTO POSTERIOR DEL FOLICULO, FACILITAN LA MULTIPLICACION DE CELULAS DE LA GRANULOSA Y POR LO TANTO MEJOR EXPRESION DE AROMATOSAS - DISMINUCION DE LH HASTA QUE EL FOLICULO ESTA PROXIMO A LA OVULACION - ESTEROIDOGENESIS - DESARROLLO DE RECEPTORES DE PROSTAGLANDINAS Y PROLACTINA
FOLICULO TERCARIO O PREOVULATORIO	
<ul style="list-style-type: none"> - ANTRO COMPLETAMENTE FORMADO - CUMULUS SEPARADO DEL RESTO DE LAS CELULAS Y FLOTANDO LIBREMENTE EN EL LIQUIDO FOLICULAR - REINICIO DE DIVISION REDUCCIONAL - CELULAS DE LA GRANULOSA CARGADAS DE LIPIDOS PRECURSORES DE UNA ESTEROIDOGENESIS MAS ACTIVA - LAS CELULAS TECALAS SE VACUOLIZAN - 20 mm DE DIAMETRO 	<ul style="list-style-type: none"> - MAXIMA PRODUCCION ESTROGENICA QUE SE MANTIENE POR MAS DE DOS DIAS Y QUE GENERA UNA RETROALIMENTACION POSITIVA POR OLEADA DE LH ENTRE 25 Y 35 HRS ANTES DE LA OVULACION - COMIENZA LA PRODUCCION DE PROGESTERONA - ESTROGENOS, RETROALIMENTACION NEGATIVA POR FSH ANTES DEL PICO DE FSH₂ DE MAYOR MAGNITUD QUE LH (OVULACION, ATRESIA, LUTEINIZACION) - AUMENTO DE PROGESTERONA (24 - 48 HRS ANTES DE LA OVULACION, CONTRIBUYE AL PICO LH, RETROALIMENTACION POSITIVA DE ESTROGENOS, MENSAJERO)

continuará con la segunda división meiótica, iniciando con una profase muy corta o casi inexistente, seguida de la metafase II, que en la mayoría de las especies es de desarrollo letárgico y se lleva a cabo durante la ovulación en la mayoría de los mamíferos. Después de la segunda división meiótica, en la metafase, el proceso se detiene hasta la penetración del espermatozoide³ (Fig 10).

Durante la ovulación el ovocito sale del folículo de Graff, estimulado por un aumento de LH, la pared del folículo de Graff se adelgaza formando el estigma, luego, en el área de las células de granulosa ocurre una picnosis celular y las células son fagocitadas o arrojadas a la cavidad folicular hasta que se abre un hueco y sale fluido folicular junto con el ovocito, que es llevado a la Trompa de Falopio por corrientes ciliares. Se cree que los mecanismos de ruptura del folículo se deben a un aumento de prostaglandinas iniciado por LH, que aumenta el volúmen del líquido y que, probablemente; la pared sea digerida por enzimas proteolíticas especiales y/o que por contracción de las fibras musculares lisas se expulse el *cumulus oophorus*³.

Lo que queda del folículo después de la ovulación, se convierte en el cuerpo amarillo o cuerpo lúteo y funciona como una glándula endócrina que secreta progesterona, controla la duración del ciclo reproductivo y mantiene el embarazo. Tiene una vida finita dependiendo de que exista embarazo, después degenera y deja una cicatriz llamada *corpus albicans*. En caso de no haber embarazo, se da la luteólisis, es decir; la pérdida de sensibilidad del cuerpo lúteo a LH por reducción del número de receptores y, por ende, la reducción de la esteroidogénesis. La inhibición de la unión de la LH a su receptor se debe a la cibernina y el fenómeno es iniciado por estradiol y mediado por prostaglandinas³.



FIGURA 10.- ETAPAS DE LA MEIOSIS DENTRO DEL OVOCITO.

1.4.- RELACION DE LA INHIBINA CON EL EJE HIPOTALAMO HIPOFISIS GONADA.

Cuando el ovocito y el *cumulus oophorus* han sido expulsados del ovario, son transportados por corrientes ciliares hacia el infundíbulo. Como resultado de los movimientos de éste último sobre la superficie del ovario, durante la ovulación, el ovocito es capturado y llevado a las profundidades del oviducto, donde el transporte ocurre tanto por corrientes ciliares como por contracciones musculares.

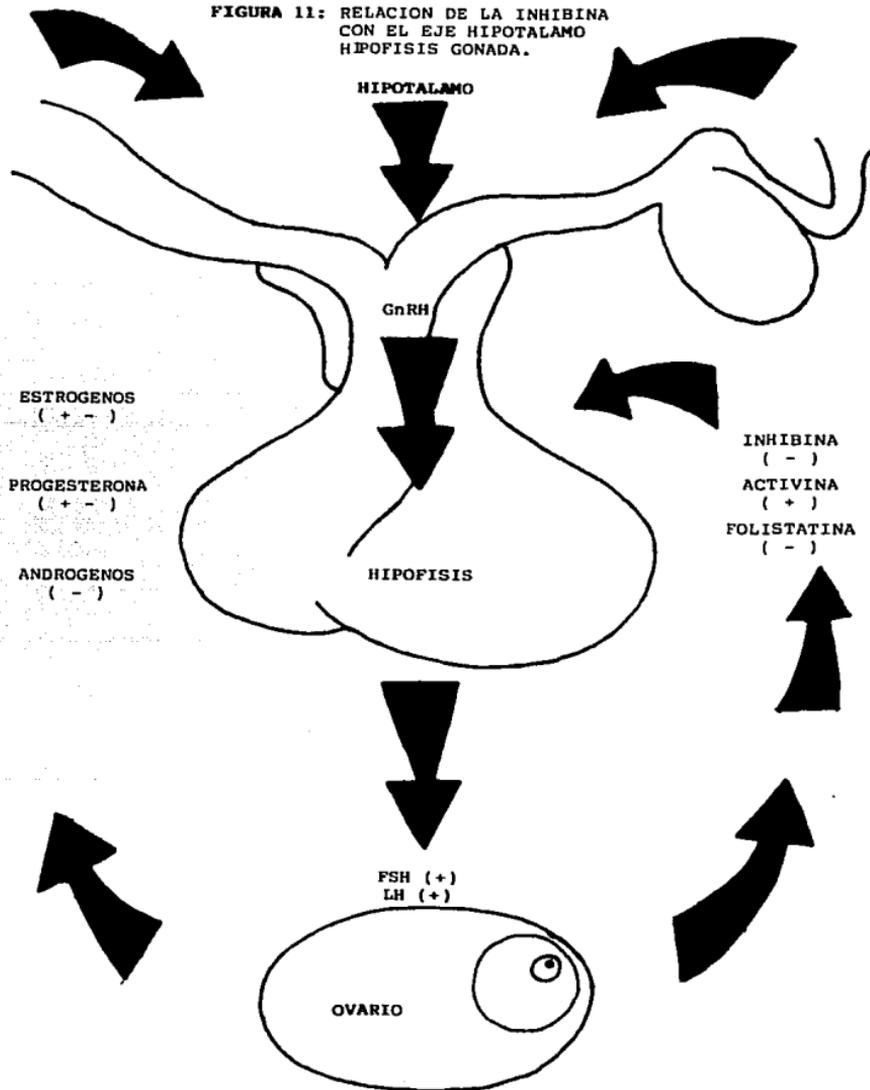
Por otra parte, los espermatozoides pasan del testículo al epidídimo siguiendo hacia un conducto de dimensiones mayores, el *vas deferens* y posteriormente a la uretra, de donde son expulsados durante la eyaculación ayudados por contracciones musculares y secreciones de algunas glándulas accesorias cuyos ductos desembocan en la parte terminal del *vas deferens* o en la uretra. En conjunto, las contribuciones de éstas fuentes, las secreciones del testículo, epidídimo, *vas deferens* y los espermatozoides suspendidos constituyen el semen.

El plasma seminal o líquido seminal contiene además, sustancias químicas como fructosa, sorbitol, inositol, ácido cítrico, fosforilcolina, ergotioneína y glicerilfosforilcolina, todas ellas relacionadas con el metabolismo de los espermatozoides. No obstante, también se localizan en éste sustancias que actúan como inhibidores de la reacción acrosomal y que son de naturaleza glicoprotéica.

El semen eyaculado en la vagina es filtrado en el moco cervical, en el cual pierde el líquido seminal y con él todos los factores inhibidores. A continuación se produce la capacitación del espermatozoide y, al alcanzar la superficie del óvulo, la reacción acrosomal que permite la penetración del material genético del espermatozoide al seno del plasma del óvulo. El siguiente paso es la decondensación de los pronúcleos masculinos y femeninos, el reconocimiento de los cromosomas homólogos, la alineación de éstos en el huso acromático y la primera segmentación que da origen a un pre-embrión de dos blastómeros.

Los eventos anteriores se presentan de forma normal en ciclos naturales, en cambio, en los ciclos inducidos se presenta el problema de que no todos los ovocitos alcanzan el mismo grado de madurez durante la inducción y que la morfología de éstos al microscópio no siempre está sincronizada con los niveles de hormonas en el líquido folicular, por lo que sería importante hacer mediciones de compuestos como la inhibina (Fig 11) en el microambiente de cada óvulo en particular para conocer mejor el estado fisiológico en el que se encuentra cada ovocito y programar, de ésta forma, los procedimientos a seguir con cada uno de ellos en particular.

FIGURA 11: RELACION DE LA INHIBINA
CON EL EJE HIPOTALAMO
HIPOFISIS GONADA.



2.- REVISION DEL CONOCIMIENTO ACTUAL DE LA INHIBINA.

2.1.- COMPOSICION QUIMICA, ANALISIS ESTRUCTURAL, AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION.

De Jong y Robertson ⁶ revisaron los diversos trabajos existentes acerca de la inhibina y encontraron los siguientes aportes:

Desde 1923 Morttram y Cramer ⁶ habían observado la hipertrofia de las células de pituitaria después de la irradiación de los testículos de ratas adultas. Encontraron que las únicas estructuras testiculares afectadas por el tratamiento eran los túbulos seminíferos, de aquí se postuló que el estado del epitelio seminífero podría influenciar a la glándula pituitaria. Posteriormente, ésta interacción fué investigada por McGullag en 1932⁶; quien demostró que la inyección de un extracto de testículo bovino, soluble en agua, podía inhibir la aparición de "células de castración" hipertrofiadas. Este autor le llamó "inhibina" al principio activo. El desarrollo posterior del concepto de inhibina se realizó después del descubrimiento de dos diferentes hormonas pituitarias: FSH y LH.

En 1942 Klinefelter y col. ⁶ postularon que la inhibina ejercía una retroalimetación específica sobre la secreción de FSH de la pituitaria, basándose en la influencia de la FSH sobre los túbulos seminíferos y que en hombres oligo o azoospermicos había una mayor excreción urinaria de FSH.

Por otro lado, Heller y Nelson en 1948⁶ sugirieron que la mayor secreción de FSH en éstos pacientes era causada por la falta de su uso en los túbulos dañados, y consideraron poco probable la secreción de hormonas por las espermatogonias, ya que se encontraban "ocupadas" en el proceso de espermatogenesis. Pero en 1974, varios autores (Lee y col., Lugaro y col., Setchell y Jacks⁶) demostraron que la inyección de preparaciones testiculares podía suprimir específicamente los niveles de FSH medidos por RIA en animales experimentales; lo cual anulaba la hipótesis anterior.

Desde entonces se han descrito los efectos supresores de preparaciones testiculares libres de esteroides y de varios orígenes (diferentes especies) sobre la producción y secreción de FSH de la pituitaria en muchos sistemas de prueba *in vivo* e *in vitro*. Para 1976 y 1977 otros autores (De Jong y Sharpe, 1976; Hopkinson y col., 1977; Schwartz y Channing, 1977⁶) descubrieron la actividad supresora de FSH en fluido folicular ovárico; entonces, Schwartz y Channing acuñaron el término "foliculostatina" para la actividad parecida a inhibina de origen ovárico. Ying y col. (1981)⁶ usaron el nombre "gonadostatina" para la misma actividad

biológica en ovario y testículo. La confusión de sus características se debe a los distintos nombres que ha recibido ésta sustancia, a la combinación de varias preparaciones gonadales o derivadas (fluido de red de testis, linfa testicular, plasma seminal, fluido folicular ovárico), al uso de diferentes especies (ovinos, bovinos, porcinos, simios, murinos, equinos y humanos) como fuente para la purificación de la inhibina y a los distintos bioensayos de especificidad poco definida.

Desde 1978 Franchimont⁴ inició estudios relacionados con la caracterización fisicoquímica e inmunoquímica de la inhibina. Sin embargo, como lo menciona Rosemary y col. en 1982⁴, la purificación y caracterización de la actividad supresora de FSH ha enfrentado diversos problemas; debido entre otras razones, al uso de bioensayos indirectos y no cuantitativos y a una amplia variedad en la fuente de material estudiado.

En 1985 De Jong y Robertson⁶ concluyen que hay por lo menos dos entidades para las cuales se ha usado el término de inhibina: una proteína asociada con un peso molecular relativamente grande, probablemente glicosilada, que puede ser aislada de extractos de testículos, fluido de red de testis y fluido folicular ovárico; la cual suprime la secreción de FSH en ensayos *in vivo* e *in vitro* utilizando la secreción espontánea ó estimulada por LHRH o el contenido celular de FSH como parámetro para la actividad de la inhibina. La otra entidad está representada por péptidos más pequeños y no glicosilados que han sido aislados de plasma seminal y que suprimen la liberación de FSH en ensayos *in vitro* de igual forma que la anterior; excepto que no influencian la secreción espontánea de FSH.

Rivier y col.⁷ también mencionan que entre las moléculas llamadas inhibinas se deben distinguir: a) aquellas que actúan a nivel de cultivo de células de pituitaria de rata para inhibir la secreción de FSH y b) aquellas biológicamente activas en ensayos *in vitro* con pituitarias completas o en bioensayos *in vivo* y que fueron aisladas en base a tales pruebas. Otra forma de discriminar entre las distintas inhibinas es basándose en las fuentes naturales de las que han sido aisladas; que son principalmente tres: fluido seminal, fluido folicular y fluido de red de testis.

2.1.1.- Peso molecular.

Los estudios practicados por Franchimont desde 1978 hasta 1980⁴, sobre preparaciones de inhibina de líquido seminal reportan fracciones protéicas de peso molecular < 5,000 Daltones. En FRT encontró dos formas de inhibina: una de peso molecular > 10,000 Daltones y otra < 5,000 Daltones, que fué cromatografiada en Sephadex G-200; sugirió que la forma de alto peso molecular podría ser un polímero de menor

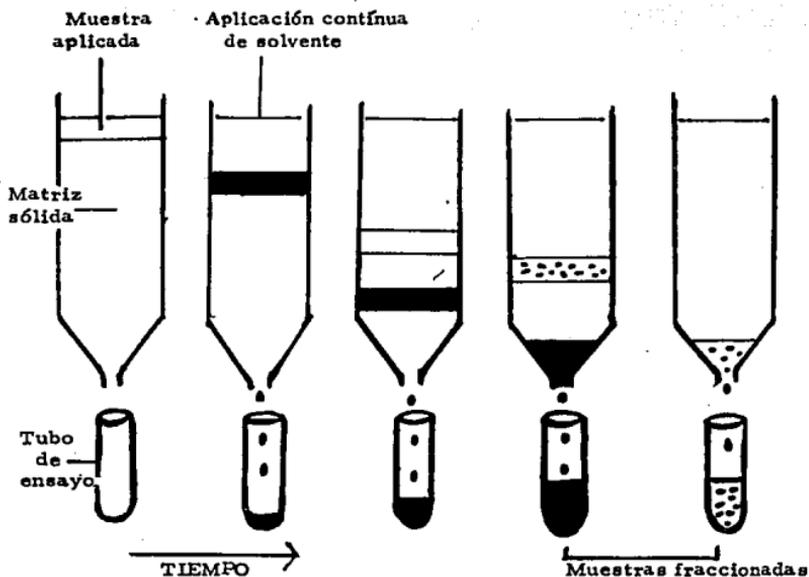


FIG 12 SEPARACION DE MOLECULAS POR CROMATOGRAFIA DE COLUMNA.

La muestra se aplica a la parte superior de un tubo cilíndrico o columna de plástico, empacado con una matriz sólida permeable, como la celulosa, inmersa en un solvente. Después se agrega lentamente una gran cantidad de solvente a través de la columna y se colecta en tubos separados conforme emerge del fondo. Los diversos componentes de la muestra viajan a distintas velocidades según su peso molecular.

(Sheeler P. 1980. Cell Biology. John Wiley and Sons Inc.

peso o representar la combinación de la inhibina nativa con un transportador o un precursor único capaz de liberar el fragmento activo en las condiciones adecuadas.

Por otro lado, Vijayalakshmi y col.¹⁰ también aislaron y caracterizaron péptidos con peso molecular de 5,000 de ovarios de borrego, utilizando filtración en gel de Sephadex G-100 y G-25. En la fracción testicular obtuvieron un pico de elusión correspondiente a la inhibina activa y en la fracción ovárica se manifestó en dos picos.

En la revisión realizada por Rosemary y col.⁴ se menciona que el peso molecular reportado varía desde 1,500 hasta 160,000 Daltones (Ward y col., 1981⁴); debido probablemente a las distintas pruebas usadas para medir la actividad y a las diferentes fuentes de material utilizado. A pesar de esto, la mayoría de los estudios en los que el fluido folicular ha sido sujeto a ultrafiltración y diálisis indican que el principio activo tiene un peso molecular mayor a 10,000, lo cual es cierto para fluido folicular de origen bovino (de Jong & Sharpe, 1976; de Jong y col., 1981⁴), porcino (Lorenzen y col., 1978; Legacé y col., 1979⁴), de hamster (Chappel y col., 1979⁴) y humano (Batta y col., 1978⁴). La fracción de fluido folicular mayor de 10,000 daltones no suprime la secreción de FSH *in vivo* (de Jong & Sharpe, 1976; Lorenzen y col., 1978⁴) ni *in vitro* en cultivos basales de células de pituitaria (Legacé y col., 1979; de Jong y col., 1979b⁴). Se ha observado la supresión de la liberación de FSH y LH en cultivos estimulados con GnRH al aplicar dosis altas de la fracción mayor de 10,000 daltones (Legacé y col., 1979; de Jong y col., 1979b⁴), pero esto podría reflejar susceptibilidad del método utilizado a efectos tóxicos no específicos (Baker y col., 1981⁴). Las experiencias de Rosemary y col.⁴, han indicado la posibilidad de una molécula mucho más grande de lo previamente reportado. En sus experimentos de 2.5 años (Ward y col., 1981⁴) encontraron que la fracción mayor o igual a 10,000 PM de fluido folicular porcino estuvo inicialmente sujeta a un filtrado molecular en una columna de BioGel P-30. Toda la actividad parecía estar en una fracción de peso molecular más alto. Se usó entonces una columna de BioGel P-60 y toda la actividad se encontró al frente del cromatograma; por ello se utilizó una filtración en Sephadex G-100 y G-200, al compuesto así obtenido se le llamó foliculostatina. Los resultados indicaron que ésta tenía un alto peso molecular. Pero éstos procedimientos no proporcionaban una estimación confiable del peso molecular y se intentó medirlo con una técnica de inactivación radioactiva (ver apéndice), a través de la cual se estimó su valor en 182,000. Estos resultados indican que la actividad biológica de la foliculostatina está asociada a una molécula grande, que no está compuesta por subunidades y no tiene otro tipo de estructura agregada; sugiriendo que la molécula completa es necesaria para la actividad biológica. Estos resultados han sido corroborados por ultracentrifugación en gradiente de sucrosa del

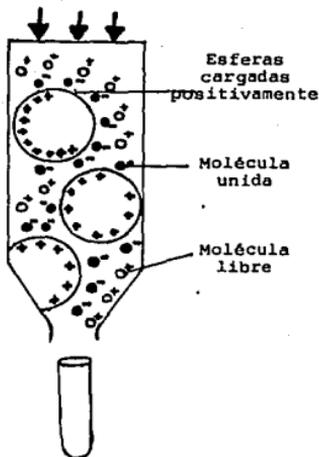


FIG. 13: CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO.

La matriz insoluble lleva cargas iónicas que retienen las moléculas de carga opuesta. Las matrices comunmente usadas para separar proteínas son: dietil amino etil celulosa (DEAE), que está cargada positivamente, carboximetil celulosa (CM) y fosfo-celulosa, que están cargadas negativamente. La fuerza de asociación entre las moléculas disueltas y la matriz de intercambio iónico, depende tanto de la fuerza iónica como del pH de la solución eluyente, que deberá ser variado para conseguir una separación efectiva.

Sheeler P. 1980.

Cell Biology.

John Wiley and Sons Inc.

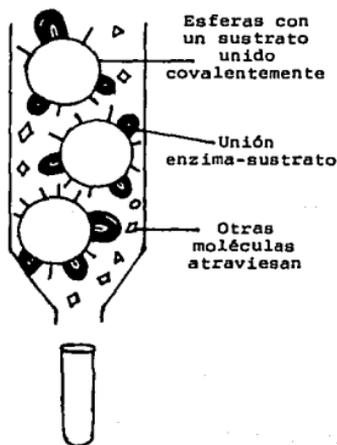


FIG. 14: CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD.

Utiliza una matriz insoluble que está unida covalentemente a un ligando específico; como por ejemplo, un anticuerpo o un sustrato enzimático, que unirán una proteína específica. Las moléculas que se unen a los sustratos inmóviles en éstas columnas, pueden ser eluidas con una solución concentrada de la forma libre de la molécula sustrato, mientras que, las moléculas que se unen a anticuerpos inmóviles pueden ser eluidas por disociación del complejo antígeno-anticuerpo con soluciones salinas concentradas o soluciones de pH alto o bajo. Usualmente se obtienen altos grados de purificación en un sólo paso, a través de una columna de afinidad.

Sheeler P. 1980.

Cell Biology.

John Wiley and Sons Inc.

precipitado de etanol de fluido folicular porcino (ver apéndice).

Contrastando con las cifras anteriores Baker y col.^{8,9} han reportado que el peso molecular de la proteína de FRT (inhibina) varía con las condiciones experimentales. Bajo condiciones neutras o básicas, la inhibina corre junto con las proteínas de peso molecular aparente de 90,000 en Sefacril S-200 y S-300, y de 350,000 en Sefarosa 6B; en condiciones ácidas, en cromatografía con Biogel P-60 o P-150 con 1 M de ácido acético se sugiere un peso molecular menor de 60,000, pero la cifra no puede ser realmente estimada por éste último, ya que las proteínas estándar corren anormalmente en condiciones ácidas. Por otro lado, de acuerdo al método de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (EGP DSS, Fig 16) el peso molecular aparente es de 30,000; también se encontraron diferencias tanto en condiciones básicas como ácidas así como por electroforesis en Licrosorb diol. Además, la actividad de inhibina fué retenida en membranas de diálisis con peso molecular límite de 12,000 a 14,000. De igual forma, observaron que conforme se purifica la inhibina de proteínas de FRT, su comportamiento en filtración de gel con soluciones amortiguadoras neutras resulta en una actividad de elusión en una zona muy amplia, con una resolución muy pobre; debido a interacciones entre la inhibina y otras proteínas en el FRT. En ésta revisión de Baker y col.⁹ se reportan pesos moleculares altos encontrados por otros autores, usando diferentes técnicas o fuentes de inhibina, por ejemplo: mayor de 100,000 por ultrafiltración de FRT (Cahoreau y col., 1979⁹), 180,000 por inactivación de rayos X en FFP (Ward y col., 1981⁹) y 115,000 por filtración en gel de FFP y pesos moleculares bajos con filtración de gel que contenía soluciones amortiguadoras de urea (William & Lipner, 1982⁹).

Como ya se mencionó, De Jong y Robertson⁶ clasifican los datos encontrados en su revisión (Tabla 4) en tres puntos, según la fuente de inhibina empleada:

1.- Los estudios que utilizaron fluido de red de testis y extractos testiculares comenzaron desde 1979 (Davies y col.; Franchimont y col.; Cahoreau y col.⁶), mencionando que la actividad de la inhibina estaba asociada a una gran proteína de pesos moleculares variables, que sugirieron la posibilidad de interacciones de la molécula bioactiva con otras proteínas o su auto agregación, dando como resultado la sobreestimación del peso molecular aparente o una subestimación por interacción con el gel de filtración (Tabla 4).

2.- Utilizando plasma seminal bovino como punto de partida para la purificación de la inhibina, se aislaron fracciones de 15-20 kDa obtenidas por precipitación con acetona (Chari y col., 1978⁶) o mediante filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico o técnicas similares y electroforesis de gel de disco (Fig 17). Resultados similares se reportaron en plasma seminal humano por Vaze y col. (1979)⁶ y Thakur y col. (1981)⁶, quienes obtuvieron una masa

TABLA 4
PESOS MOLECULARES Y FACTORES DE PURIFICACION PARA
INHIBINA DE DIVERSAS FUENTES (DE JONG Y ROBERTSON 1985)

FUENTE	PESO MOLECULAR (kDa)	ESTIMADO USANDO	FACTOR DE PURIFICACION	MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE INHIBINA POR SUPRESION DE	REFERENCIA
TESTICULO					
TESTICULO HUMANO	"BAJO"	(FLT GEL)	-	PESO OVARICO + FSH IN VIVO	KRISHNAN Y COL (1982)
FRT OVINO	30	(EPOSS)	30	FSH IN VITRO	BAKER Y COL (1982)
TESTICULO OVINO	20	(FLT GEL)	770	PESO UTERINO	MODDAL Y COL (1986)
TESTICULO OVINO	< 1.8	(FLT GEL)	-	PESO OVARICO + FSH IN VIVO	VJAYALAKSHMI Y COL (1980)
TESTICULO DE RATA	60 - 80	(FLT GEL)	-	FSH IN VITRO	AU Y COL (1983)
PLASMA SEMINAL					
BOVINO	1	(FLT GEL)	-	FSH Y LH IN VITRO	YMO Y COL (1981)
	0.8 - 1		-	UNION A FSH	LUGARO Y COL (1981)
	13	(COMP AA)	-	FSH Y LH IN VITRO	ESCH Y COL (1983 B)
	18	(EPOSS)	800	PESO UTERINO + FSH IN VIVO + FSH Y LH IN VITRO	SARAFI Y COL (1981 B)
HUMANO	"BAJO"	(FLT GEL)	-	PESO OVARICO + FSH IN VIVO	KRISHNAN Y COL (1982)
	8, 10, 30, 80	(FLT GEL)	-	FSH Y LH IN VIVO + FSH IN VITRO	COLBERG Y COL (1982)
	4 - 6	(COMP AA)	-	FSH Y LH IN VITRO + FSH IN VIVO	RAMABHARMA Y COL (1984) SDDAH Y COL (1984 A)
	10.7	(COMP AA)	-	FSH Y LH IN VITRO + FSH IN VIVO	SDDAH Y COL (1984 B) SMITH Y COL (1984)
	18	(EPOSS)	17.6	FSH IN VIVO	THAKUR Y COL (1981)
FLUIDO FOLICULAR OVARICO					
BOVINO	65	(EPOSS)	328	FSH IN VITRO	ROBERTSON Y COL (1986)
	85	(EPOSS)	80	FSH IN VITRO	JANSEN Y COL (1981)
	85	(EPOSS)	20 - 45	FSH IN VITRO	YAM OJK Y COL (1984)
	105	(EPOSS)	76	FSH IN VITRO	GODROUT Y LABRIE (1984 B)
HUMANO	23	(EPOSS)	-	PESO OVARICO + FSH IN VIVO	CHARE Y COL (1970)
OVINO	< 1.8	(FLT GEL)	-	PESO OVARICO + FSH IN VIVO	VJAYALAKSHMI Y COL (1980)
	80	(FLT GEL)	23	FSH IN VITRO	DOROS Y COL (1983)
PORCINO	10 - 12	(FLT GEL)	27000	FSH IN VITRO	RUIVEN Y COL (1984)
	10 - 35	(FLT GEL)	-	FSH IN VIVO	WILLIAMS Y COL (1978)
	25 - 30, 43	(EPOSS)	300	FSH IN VITRO	SARAFI Y COL (1985)
	> 80	(FLT GEL)	-		
	140	(EPOSS)	76	FSH IN VITRO	SARAFI Y COL (1985) GODROUT Y LABRIE (1984 A)
	184	(INACT RAD)	-	FSH IN VIVO	WARD Y COL (1983)

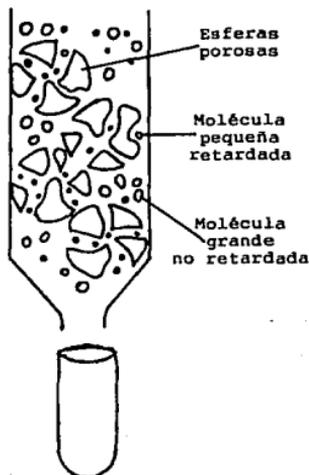
FRT = FLUIDO DE RED DE TESTIS; EPOSS = ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON DODECIL SULFATO DE SODIO; FLT GEL = FILTRACION EN GEL; INACT RAD = INACTIVACION RADIOACTIVA; COMP AA = COMPOSICION DE AMINOCIDOS.

molecular de 19 KDa en oposición a Ying y col. (1981)⁶ y Lugaro y col. (1984)⁶ que observaron moléculas con actividad parecida a inhibina de 1 KDa en plasma seminal bovino. En 1982 Goldberg y col.⁶ dieron evidencia del carácter glicoprotéico de la actividad parecida a inhibina de plasma seminal humano, que consistía en especies de diversos pesos moleculares que se unían a la concanavalina A-Sefarosa. Sheth y col. (1984)⁶ utilizando HPLC observaron un peso molecular aparente de 14 KDa (Tabla 4).

3.- El fluido folicular ovárico, es la fuente más rica de inhibina conocida hasta ahora, se han reportado pesos moleculares de 23 KDa para inhibina de fluido folicular humano (Chari y col., 1979)⁶, 65 KDa para inhibina de ffb (Jansen y col., 1981)⁶. Dobos y col. en 1983⁶ aplicaron la técnica de HPCL en fluido folicular ovino por primera vez. Esta técnica combinada con la elusión de la proteína después de la electroforesis en gel de poliacrilamida ha sido usada por Godbout y Labrie (1984a)⁶ en ff bovino y porcino, y por Robertson y col. (1985)⁶ en material bovino. De la misma forma, Sairam y col. (1985)⁶ describieron el uso de la cromatografía rápida de fase líquida (FPLC) y HPLC en el aislamiento de la inhibina de fluido folicular porcino, Van Dijk y col. (1984)⁶ también usaron la FPLC pero con fluido folicular bovino. Estos autores han encontrado pesos moleculares que varían desde 55 hasta 194 KDa. (Tabla 4).

Robertson y col.¹¹ presentan un procedimiento para la purificación de la inhibina de FFb, en el que utilizan una combinación de técnicas (filtración en gel, HPLC de fase revertida y electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio, EGP-DSS) mediante las cuales aíslan una fracción activa altamente potente capaz de suprimir el contenido celular de FSH en un ensayo *in vitro*. El ffb, libre de fluido quístico, se colectó en presencia de aprotinina y fluoruro de metil fenil sulfonilo, se fraccionó en una columna de Sephacryl S-200 a pH 7.0 y las fracciones < 0.2 Kd (peso molecular > 100,000) se cromatografiaron en una columna de Sephadex G-100 o G-200 en ácido acético 4 M. La actividad de inhibina se encontró en una fracción con valores de 0.6-0.8 Kd (peso molecular 20,000 - 60,000). Esta fracción se liofilizó y fraccionó por fase revertida HPLC y las fracciones activas se colocaron en EGP-DSS bajo condiciones no reductoras, las bandas de proteína se visualizaron usando una tinción ligera de azul de Coomassie antes de ser seccionadas en el gel. La actividad de inhibina, determinada por un ensayo *in vitro* se recuperó de las porciones de gel por elusión electroforética. La actividad biológica específica de la fracción purificada fué de 212,000 U/mg de proteína, dando un resultado inhibidor dosis-respuesta en el ensayo *in vitro*. El contenido de LH, TSH (hormona estimuladora de la tiroidea) y Pr medido por RIA en células de pituitaria, no se afectó. El producto final del EGP-DSS bajo condiciones no reductoras dio una sola banda con un peso molecular de 56,000 ± 1,000. Bajo condiciones reductoras se observaron 2 bandas

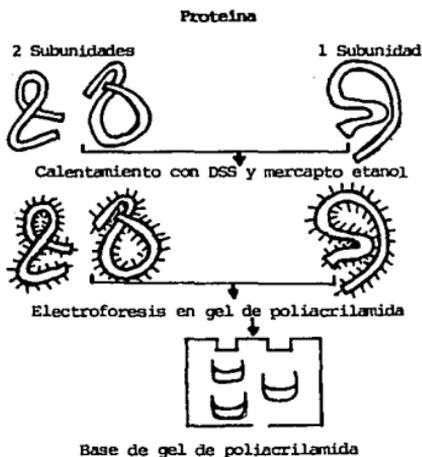
FIG. 15: CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN GEL.



Utiliza una matriz inerte pero porosa. Las moléculas que son lo suficientemente pequeñas para penetrar en la matriz, son retenidas y viajan más lentamente a través de la columna. Las esferas de intercambio de polisacáridos (dexteno o agarosa) están disponibles en el mercado, en un amplio rango de tamaños de poro, lo cual los hace adecuados para el fraccionamiento de moléculas de diversos pesos moleculares menores de 500 hasta mayores de 5×10^6 .

Sheeler P. 1980.
Cell Biology.
 John Wiley and Sons Inc.

FIG. 16: ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON D.S.S.



Las Cadenas polipeptídicas individuales, forman un complejo con moléculas cargadas negativamente de la solución de dodecil sulfato de sodio (DSS) y migran, como un complejo proteína-DSS cargado negativamente, a través de un gel poroso de poliacrilamida. Debido a que la velocidad de migración bajo estas condiciones es mayor conforme el polipéptido es más pequeño, esta técnica puede usarse para determinar el peso molecular aproximado de una cadena polipeptídica, así como la composición de la subunidad de una proteína.

Sheeler P. 1980.
Cell Biology.
 John Wiley and Sons Inc.

principales con pesos moleculares de $44,000 \pm 3,000$ y $14,000 \pm 2,000$, con alta actividad específica.

En otros estudios Ling y col.¹² aislaron y caracterizaron parcialmente una proteína de M_r 32,000 con actividad de inhibina de ff porcino. Purificaron 2 proteínas (A y B) con actividad de inhibina mediante cromatografía de afinidad heparina y sefarosa, filtración en gel sobre Sephacryl S-200 desarrollado en 30 % de ácido acético y cuatro pasos de fase revertida HPLC. La proteína B fué homogénea con un peso molecular de 32,000 sobre NaDodSO_4 /EGP bajo condiciones no reductoras. Este peso aparente es mucho más grande que el determinado por filtración en gel con Sephacryl S-200. El peso molecular más bajo obtenido para la proteína B por cromatografía en Sepacryl indica que, en 30% de ácido acético, la proteína B adquiere una conformación más compacta (radio de rotación más pequeño) que la proteína A. La molécula intacta de la proteína B se compone de dos cadenas de M_r 18,000 y 14,000, unidas por enlaces disulfuro. Aparentemente la actividad de la inhibina requiere de ambas, ya que la reducción de los enlaces disulfuro por ditioneitol destruyó completamente la bioactividad. La proteína A, aislada en mucho mayor cantidad que la B, fué heterogénea en NaDodSO_4 /PAGE bajo condiciones reductoras y no reductoras. En la filtración en gel en Sephacryl S-200 se detectó un material parecido a inhibina de mayor peso molecular que el de las proteínas A y B. No se conoce la relación existente entre éstos pero la molécula podría ser un precursor o un agregado de la inhibina de M_r 32,000.

2.1.2.- Digestión enzimática, temperatura y estabilidad de la molécula de inhibina.

El material activo de alto peso molecular pierde su actividad por digestión de tripsina y pepsina y por su exposición a 60 grados durante una hora.

Para medir el efecto del calor y la digestión triptica sobre la inhibina, Vijayalakshmi y col.¹⁰ calentaron las soluciones de inhibina testicular y ovárica de ovino en agua a 100°C durante 30 min y luego las probaron en ratas machos castrados. La digestión triptica de éstas preparaciones de inhibina se llevó a cabo en una concentración enzima-sustrato de 1:50 durante 2 horas a 37°C . La actividad de la inhibina se destruyó por digestión triptica pero no le afectó el calor.

Rosemary y col.⁴, trabajaron con actividad supresora de FSH derivada de fuentes ováricas y concluyeron que la foliculostatina no es un esteroide, sino que es de naturaleza protéica y al congelarla su actividad se conserva por lo menos un año.

Por su parte Baker y col.⁶ observaron que al agregarse un inhibidor proteolítico de enzimas, fluoruro de fenil metil sulfato (PMSF) no desaparece la actividad.

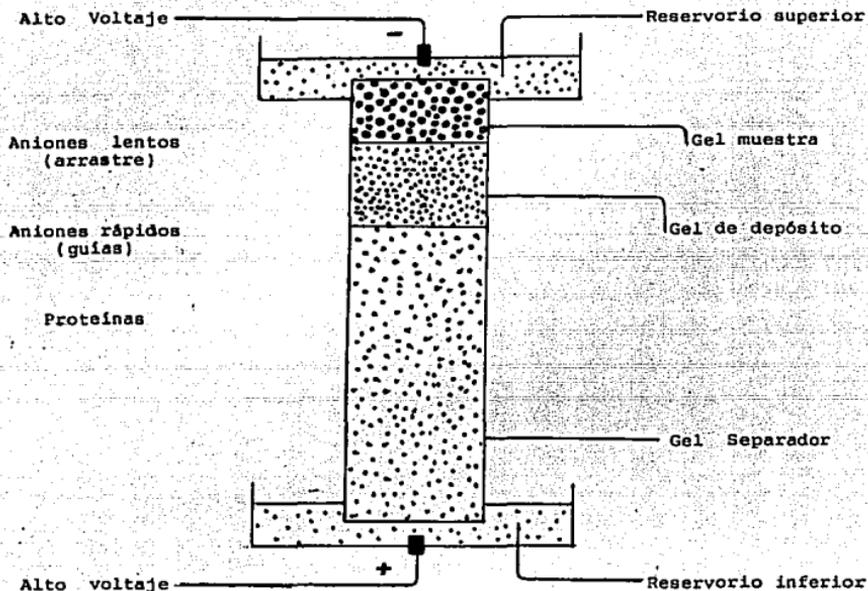


FIGURA 17: COMPONENTES ESENCIALES DE UNA ELECTROFORESIS DISCONTINUA O DE DISCO.

Se compone de bloques cilíndricos o capas delgadas de poliacrilamida suspendidas entre dos reservorios de solución amortiguadora o de electrolitos. El gel de poliacrilamida está dividido en tres regiones llamadas: Gel muestra, Gel de depósito y Gel separador. El Gel muestra, contiene la mezcla de proteínas que se separaran y se prepara usando bajas concentraciones de poliacrilamida, de modo que el tamaño del poro sea grande y no afecte la migración de la proteína. El Gel de depósito es similar al Gel muestra, pero sin las proteínas. Los dos Geles contienen el mismo pH (usualmente 8.3). El Gel separador tiene un pH más alto (usualmente 9.5) y se prepara con mayores concentraciones de poliacrilamida; con lo cual se tienen tamaños de poros más pequeños y el efecto de tamiz.

Sheeler P. 1980. Cell Biology.
John Wiley and Sons Inc.

Reporta también resultados similares en los que se suprime dicha actividad por calentamiento y digestión enzimática; también se han encontrado varios grados de pérdida de actividad seguidos a la exposición de fluido folicular y de rete testis o de proteínas de fluido folicular bovino a solventes orgánicos, carbón, oxidantes y reductores. Además se observó que las preparaciones de proteína cruda liofilizada retienen la actividad de la inhibina por años ⁹.

2.1.3.- pH y Punto Isoeléctrico.

La proteína de rete testis precipita en pH entre 4 y 7 y la actividad de la inhibina disminuye, la pérdida máxima ocurre entre pH 5 y 5.5, la proteína de FRT recupera su actividad de inhibina con pH menor a 4.0⁸. En cuanto al punto isoelectrico los autores han mostrado que la inhibina eluye en una amplia zona de diétilaminoetil o a celulosa a pH 8-9. También se une a celulosa de carboximetil a pH 3.4. En electroforesis de microzona (Fig 18), la inhibina eluye en una amplia zona entre pH 4 y 6, con dos picos a 5.5 y 4.4.

La inhibina parece ser una proteína hidrofóbica, ácida (pI 5-6) y una glicoproteína que podría agregarse y unirse a otras proteínas en los fluidos foliculares o testiculares ⁹. El punto isoelectrico de proteínas de FRT es de aproximadamente 5.5 pero su actividad sugiere una heterogeneidad de carga. La inhibina ovina también se une a resinas de intercambio iónico diétilaminoetil a pH alto y a resinas carboxymethyl a pH bajo; sin embargo, por elusión con gradientes salinos produce una amplia zona de actividad con un campo pobre. Las proteínas de FRT también precipitan entre pH 4 y 6 con una considerable pérdida de actividad ⁹. Algunos datos revisados por Rosemary y col.⁴ señalan que la foliculostatina es una molécula ácida con un pH 5.0-5.8 (Williams y col., 1979⁴), pero su grupo⁴ muestra que la actividad supresora de FSH precipita a pH 4-5.4, otros autores sugieren un punto isoelectrico en este rango (Ward y col., 1981; Jansen y col., 1981; Baker y col., 1980⁴).

2.1.4.- Purificación.

En estudios realizados para la purificación de inhibina por Baker y col. (1982)⁸ se utiliza el bioensayo basado en la supresión de FSH por la secreción estimulada con GnRH en cultivos de pituitaria anterior de ratas machos adultos, con un estándar de proteína de linfa testicular de ovino. Posteriormente, en 1983⁹, mencionan que procedimientos valiosos en la purificación de la inhibina incluyen la precipitación diferencial con sulfato de amonio, filtración en gel (especialmente bajo condiciones ácidas Fig 15), cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de

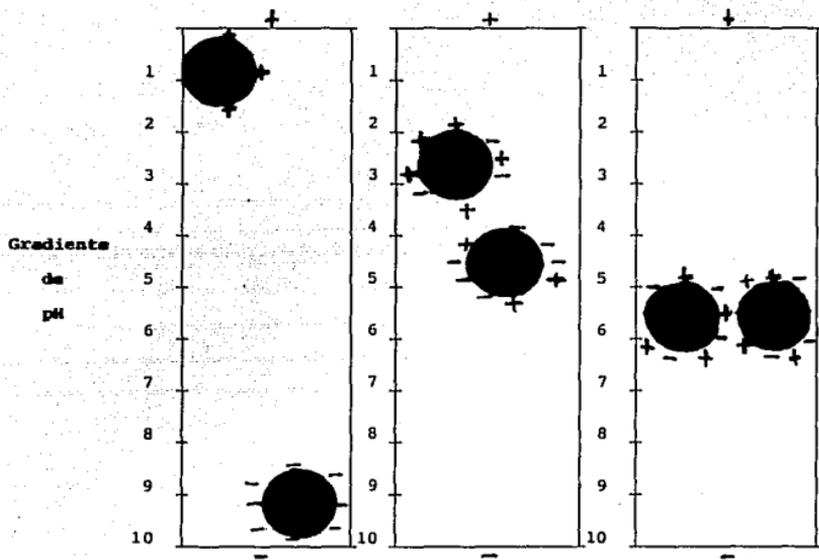


FIGURA 16: SEPARACION DE LAS MOLECULAS DE UNA PROTEINA POR ELECTROFORESIS DE ZONA.

A pH bajo (alta concentración de H^+), los grupos de ácidos carboxílicos de las proteínas, tienden a permanecer sin carga ($-COOH$) y sus grupos básicos que contienen Nitrógeno, están completamente cargados (ej.: NH_3^+), dándole a la mayoría de las proteínas una carga neta positiva. A pH alto los grupos de ácidos carboxílicos están cargados negativamente ($-COO^-$) y los grupos básicos tienden a permanecer sin carga (ej.: $-NH_2$), dándole a la mayoría de las proteínas una carga neta negativa. A su pH isoelectrónico, la proteína no tiene carga neta, ya que hay un balance entre las cargas netas positivas y negativas. De ésta manera, cuando un tubo que contiene un gradiente de pH fijo se somete a un fuerte campo isoelectrónico, cada tipo de proteínas presentes migrarán hasta formar una banda en el punto isoelectrónico.

Sheeler P. 1980. Cell Biology.
John Wiley and Sons Inc.

afinidad con varias lectinas (concanavalina A y lentil lectina) y el colorante rojo de proci6n. Otro de los m6todos utilizados con 6xito es la cromatograf1a l1quida (HPLC) de alta resoluci6n (Dobos y col., 1983⁹).

Para la purificaci6n de la foliculostatina Rosemary y col.⁴ utilizaron la cromatograf1a de intercambio i6nico (Fig 12 y 13); y sus resultados indicaron que mediante 6ste tipo de cromatograf1a se obtienen fracciones activas con poca actividad espec1fica y una recuperaci6n pobre (Jansen y col., 1981⁴); por lo cual 6sta t6cnica no ser1a particularmente 6til para la purificaci6n de la foliculostatina. Muchos investigadores citados en la revisi6n de Rosemary y col.⁴ han utilizado m6todos menos convencionales, como t6cnicas de afinidad. Por ejemplo: azul de Affi-Gel (Williams y col., 1979⁴ ver ap6ndice) se reporta como deficiente en el c6culo de la actividad espec1fica de la foliculostatina y la recuperaci6n de la misma. Por el m6todo que utiliza matrices de afinidad (Jansen y col., 1981⁴ ver ap6ndice); se sugiere que la actividad supresora de FSH en FFB est1 asociada con una glicoprote1na (Fig 14).

2.1.5.- Secuencia amino6cida.

De Jong y Robertson⁶ citan los estudios de Sheth y col. (1984) que reportaron la composici6n amino6cida de la inhibina junto con una secuencia de 30 amino6cidos N-terminales. Posterior a 6sto Seidah y col. (1984)⁶ identificaron la secuencia completa de 94 amino6cidos y sugirieron que el p6ptido C-terminal de 27 amino6cidos podr1a contener la actividad completa de la mol6cula. Otros autores encontraron p6ptidos hom6logos al PC-109 purificado de plasma seminal humano (Esch y col., 1983b⁶) y se1alaron que 6ste podr1a ser id6ntico al ant1geno encontrado en la cubierta del espermatozoide; se cree que 6ste se sintetiza en el tejido prost1tico (Johansson y col., 1984⁶). Sin embargo, se publicaron datos de p6ptidos de 33 a 35 amino6cidos obtenidos de plasma seminal humano (Sheth y col., 1984; Seidah y col., 1984a y b; Ramasharma y col., 1984⁶) con una secuencia de 31 amino6cidos. Otro compuesto, llamado plasmina seminal, se encontr6 en 1983 por Theil y Scheit⁶; 6ste presentaba altas concentraciones en el plasma seminal y un efecto inhibidor sobre la s1ntesis de RNAm y prote1nas en c6lulas eucari6ticas. Lo anterior, junto con las aparentes diferencias entre las propiedades fisicoqu1micas de la inhibina gonadal y prost1tica indica que son dos sustancias con actividades biol6gicas distintas.

Li y col.¹⁸ aislaron dos p6ptidos con actividad parecida a inhibina de plasma seminal humano, uno formado por 52 amino6cidos y el otro por 92; se les llam6 alfa-inhibina-52 y alfa-inhibina-92. El analisis de las secuencias muestra que los 31 amino6cidos del extremo NH₂ terminal de la alfa-inhibina-52 son id6nticos a una estructura previamente

totalmente básico y tiene sólo un residuo de histidina. Esta inhibina también se ha encontrado que es inactiva en cultivos de células de pituitaria (Li y col., 1987⁷). Se han aislado otras proteínas con actividad parecida a inhibina de plasma seminal bovino (Sairam y col., 1981⁷) pero ninguna ha sido totalmente caracterizada.

B) Fluido folicular, a partir del cual se han caracterizado varias proteínas con actividad parecida a inhibina, que fué reconocida como una proteína con 2 subunidades disociables bajo condiciones reductoras. Robertson y col. (1985⁷) fueron los primeros en proponer tres residuos N-terminales de las unidades alfa y beta de una inhibina de 56-Kd de fluido folicular bovino.

Miyamoto y col. (1986⁷) descubrieron los cuatro primeros residuos correctos para ambas cadenas de una inhibina de 32 Kd aislada de fluido folicular porcino.

Posteriormente debido a la disponibilidad de anticuerpos cultivados contra fragmentos químicamente caracterizados de la cadena alfa de la inhibina (Rivier y col., 1985⁷) se ha logrado determinar la estructura completa de ésta con un peso molecular de ca. 32 kd, de dos cadenas (MW ca. 14 y 18 kd) con N-terminales idénticas a las propuestas inicialmente por Miyamoto y col. Las secuencias completas de aminoácidos de los precursores de la subunidad alfa de la inhibina de porcino (Mason y col., 1985⁷), humano (Mason y col., 1986⁷), bovino¹⁹ y murino (Woodruff y col., 1987⁷) y las secuencias de los precursores de las subunidades beta (beta-A y beta-B) de bovino¹⁹, dos distintas de porcino (revisión Mason y col., 1985⁷) y de humano (revisión Mason y col., 1986⁷) han sido deducidas a partir de secuencias complementarias de ADN (Tabla 5). Mientras que los datos de los precursores de la cadena alfa explicarían formas más grandes de inhibina en base a otros sitios de procesamiento, también es evidente que la subunidad alfa tiene 2 sitios potenciales de N-glicosilación (Mason y col., 1985⁷), uno de los cuales está contenido en la subunidad alfa corta (18-Kd) en Asn en posición 36 (según la tabla 5). Este fragmento es común a las tres secuencias de cuatro orígenes diferentes (tejidos y especies); el otro se encuentra en la parte N-terminal de la inhibina de 56-Kd. La cadena alfa de 18-Kd contiene 7 cisteínas contra 9 de la subunidad beta; se espera que al menos una de éstas en cada cadena sea usada para enlace entre ellas.

Es notable el alto grado de conservación de las estructuras de las subunidades beta-A y beta-B entre el tejido de origen y las especies.

C) Fluido de rete testis de carnero, del cual se ha aislado y caracterizado parcialmente una proteína parecida a inhibina compuesta de dos subunidades relacionadas a las inhibinas aisladas de fluido folicular (Bardin y col., 1987⁷).

TABLA 5

**ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA INHIBINA
DE DIFERENTES ESPECIES
(DE RIVIER Y COL. 1987)**

SUBUNIDADES ALFA	
o/p-H	STPLMSWPWS P A ALRLLQRP PEEPAAHANC HRVALN I SFQ ELGWERWIVY
o-P	STAPLPWPWS PAALRLLQRP PEEPAVHADC HRA B LNISFQ ELGW D RWIVH
o-B	STPPLPWPWS PAALRLLQRP PEEPAAHADC HRA B LNISFQ ELGW D RWIVH
o/p-H	PPSFIFMYCH GCGGLHIPP N LSLPVPGAPP TPAQPYSLP GAQPCCAALP
o-P	PPSFIFMYCH GCGGLPTLP N LPLSVPGAPP TPVQPLLLVP GAQPCCAALP
o-B	PPSFIFYCH GCGGLSPPO D LPLPVPGVPP TPVQPLSLVP GAQPCCAALP
o/p-H	GTMRLMVRT TSDGGYSFKY ETVPNLLTQH CACI
o-P	GTMRS L RVRT TSDGGYSFKY ETVPNLLTQH CACI
o-B	GTMR L RVRT TSDGGYSFKY EMV P NLLTQH CACI
SUBUNIDADES BETA	
o-H/P β _A	GLECDGK V NI CCKKQFFV S F KDIGW N DWII APSGYH A NYC EGECPSHIAG
o-H β _A	GLECDGRTNL CCRQ Q FFIDF RLIGW N DWII APTGYG N NYC EGSCPAYLAG
o-P β _A	GLECDGRTNL CCRQ Q FFIDF RLIGW N DWII APTGYG N NYC EGSCPAYLAG
o-H/P β _B	TSGSSLSFHS TVINHYRMRG HSPFANLKSC CVPTKLR O MS MLYYDGGQNI
o-H β _B	VPGSASSFHT AVVNQYRMRG LNP _ GTVMSC CIPTKLSTMS MLYFDDEYNI
o-P β _B	VPGSASSFHT AVVNQYRMRG LNP _ GTVMSC CIPTKLSTMS MLYFDDEYNI
o-H/P β _A	VK R DIQNMIV EECGCS
o-H β _A	VK R DVPNMIV EECGCA
o-P β _A	VK R DVPNMIV EECGCA

o = Ovarico; p = Placentario; B = Bovino; H = Humano; P = Porcino; N es el sitio potencial de glicosilación.

NOTA: El H β _B y P β _B tiene solo 15 residuos, debido a la delección de la Phe 74

2.1.6.- Estudios inmunológicos.

Desde 1977 Franchimont ha realizado ensayos, en los cuales concluye que cuando la fracción de FRT es marcada con ^{125}I reacciona con su antisuero homólogo, y observa una reacción cruzada incompleta con la inhibina humana y una reacción cruzada completa con la extraída de líquido folicular. Para 1975, mediante la inmunización de la fracción de peso molecular superior a 10,000 Daltones se obtienen anticuerpos (Fig 19), que inyectados a ratas machos o hembras adultas inmaduras provocaron disminución de los niveles basales de FSH y éste efecto esta ligado a la neutralización de la inhibina endógena ⁴.

Moodbidri y col, en 1980¹³ cultivaron suero de conejo anti-inhibina para inhibina aislada de plasma seminal humano y encontraron que éste antisuero es muy específico; no une hormonas proteicas como LH, FSH o PRL de origen humano, ovino o murino ni esteroides como testosterona, dihidrotestosterona, estradiol 17-beta y progesterona. Este antisuero se ha usado ¹⁴ con ratas machos de 5, 10, 14, 17 y 24 días de edad para medir el aumento de FSH endógena después de una inyección subcutánea. Los resultados sugieren que la retroalimentación inhibina-FSH está relacionada con cambios dependientes de la edad.

La existencia de anticuerpos contra la inhibina de fluido folicular porcino también la observaron Channing y col.¹⁵, en ella se vió que la inyección repetida de FFp tratado con Carbón a monas rhesus, disminuía la capacidad de supresión de FSH y esto es nuevamente demostrable (después de un lapso de 6 meses) pero transitorio después de 10 a 14 días de administración de dosis altas de FFp; indicaron que las monas continuaban respondiendo inmunológicamente al antígeno(s) del FFp. Concluyen que la inhibina folicular porcina presente en el fluido folicular es altamente inmunogénica en éstas monas y algunos anticuerpos generados reaccionan cruzadamente con el componente activo de la inhibina de FFh. Baker y col.⁹ intentaron inmunizar conejos con preparaciones de inhibina parcialmente purificada de FRT y FFb, pero ningún suero pudo demostrar la neutralización de la inhibina.

Por su parte, van Dijk y col en 1986¹⁶ cultivaron anticuerpos contra inhibina parcialmente purificada de FFp en borregos y demostraron que el antisuero neutraliza la actividad de inhibina bovina en ensayos de células de pituitaria y además que, una reacción cruzada entre la actividad de la inhibina de origen porcino, bovino, humano y de rata. El antisuero fue más potente para bloquear la actividad de FFb comparado con las preparaciones de las otras especies e indicaron su capacidad para bloquear el efecto de la inhibina; por ello, sugieren una estructura inmunológicamente similar en las especies estudiadas.

Anticuerpos
 (los anticuerpos del conejo dirigidos al antígeno A).

**Antígeno A
 inmovilizado**

**Anticuerpos
 2os.**
 (anticuerpos marca-
 dos, dirigidos a
 los anticuerpos de
 conejo).

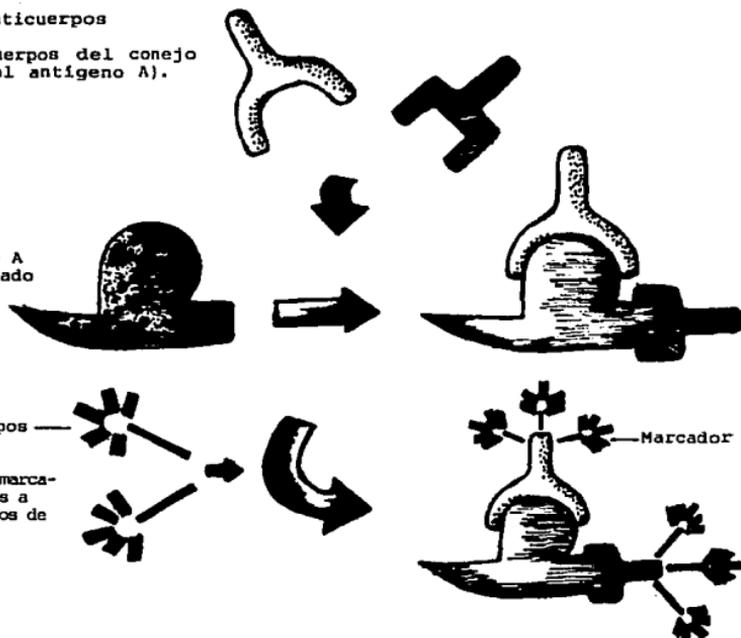


FIGURA 19: FORMA EN QUE SE USAN LOS ANTICUERPOS PARA DETECTAR UNA MOLECULA PARTICULAR.

El método ilustrado (conocido como inmunocitoquímica) tiene una sensibilidad reforzada, ya que el anticuerpo primario (definido como molécula de anticuerpo que se une a una molécula de antígeno reconocida) es reconocido por un segundo tipo de anticuerpo, que está unido covalentemente a un marcador que lo hace fácilmente detectable.

Las moléculas marcadoras comúnmente usadas incluyen tinciones de fluoresceína o rodamina (para microscopio de fluorescencia), la enzima peroxidasa de rábano (ya sea para microscopio de campo claro o microscopio electrónico), la proteína que contiene hierro (ferritina) o esferas de oro coloidal (para microscopio electrónico) y la enzima fosfatasa alcalina (para detección bioquímica).

(Redibujado M. Sánchez).

También, Lee y col. 17 examinaron la posibilidad de cultivar anticuerpos monoclonales para inhibina ovárica de rata; usaron extractos acuosos libres de esteroides de ratas tratadas con PMSG como inmunógeno. Los anticuerpos monoclonales generados fueron examinados cuidadosamente para unirse a secciones de tejido ovárico y se probaron para la neutralización de bioactividad de inhibina *in vitro* utilizando cultivos de células de pituitaria (ver apéndice). Se les encontró con capacidad para unirse a células de granulosa y para eliminar la acción supresora de la inhibina sobre la secreción de FSH por la pituitaria de manera dosis-respuesta. Por otro lado los anticuerpos solo afectan la inhibición de FSH por inhibina sin afectar la secreción basal de LH. Por ello, es probable su utilización en el desarrollo de un radioinmunoensayo para inhibina de rata y, alternativamente, en cromatografías de afinidad para la purificación de ésta. La observación de la neutralización de la bioactividad de la inhibina del PHM15 (líneas celulares de hibridomas, Fig 20) de la folicular de varias especies indica similitudes inmunológicas entre ellas.

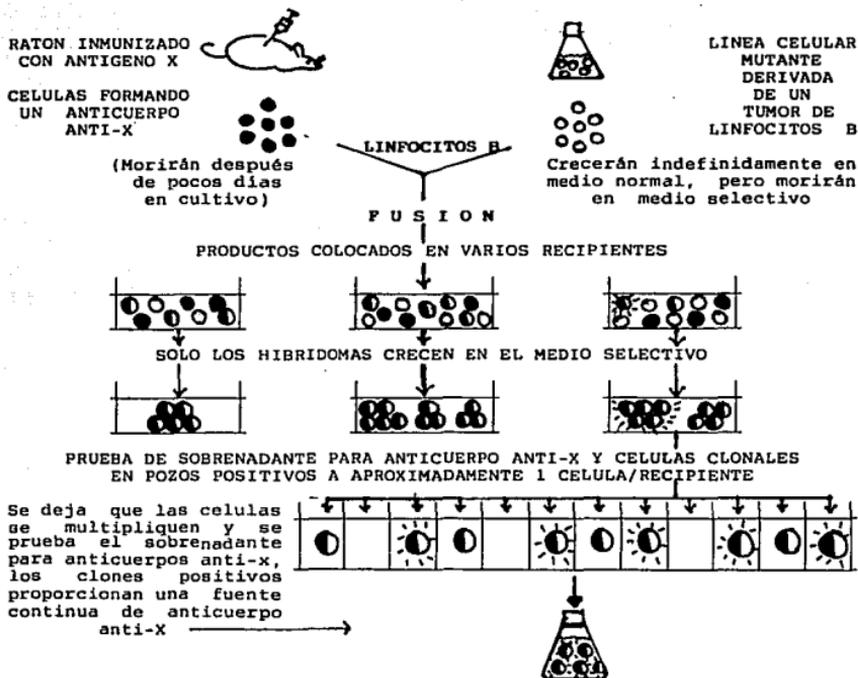


FIGURA 20: PREPARACION DE CELULAS HIBRIDAS E HIBRIDOMAS, QUE SECRETAN ANTICUERPOS MONOCLONALES HOMOGENEOS CONTRA UN ANTIGENO PARTICULAR.

El medio de crecimiento utilizado contiene un inhibidor (aminopterina) que bloquea las rutas biosintéticas normales por las cuales se forman los nucleótidos. Por esto las células deben usar una ruta alterna para sintetizar sus ácidos nucleicos y ésta ruta es defectuosa en la línea celular mutante, a la cual se fusionan los linfocitos B normales. Debido a que ningún tipo celular usado para la fusión inicial puede crecer por sí mismo, solamente sobreviven los híbridos celulares.

Albert B. 1989. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Inc.

2.2.- ORGANOS Y TEJIDOS PRODUCTORES DE INHIBINA.

Al referirse a estudios *in vitro* Rosemary y col.⁵ mencionan los primeros hallazgos de cocultivos de células de Sertoli con células de pituitaria anterior que llevaron a la supresión selectiva de la síntesis y secreción de FSH (Steinberg & Steinberg, 1976; Chowdhury y col., 1978⁵). También se ha encontrado que el fluido folicular porcino, bovino y humano (Legacé y col., 1979; De Jong y col., 1979a; Paolo y col., 1979; Chappel y col., 1980⁵) suprime la secreción de FSH en cultivos de células de pituitaria de ratas, hamsters o porcinos.

Para determinar el origen de la inhibina Demoulin y col. en 1980²², cultivaron fragmentos testiculares de ratones de 4 a 6 meses con medio 199 y los incubaron a 37 o 31° C. Después de 20 días los medios de cultivo fueron colectados y almacenados a -20° C, ya que se supone que la inhibina producida por el testículo fué liberada al medio. Posteriormente se realizó un estudio histológico de los fragmentos. Los esteroides se eliminaron con un tratamiento de carbón y Dextrano T-70 para evitar interferencias en los cultivos posteriores. Los diferentes medios de cultivo sin esteroides se pusieron en presencia de células de hipófisis de rata. Las secreciones de FSH, LH y prolactina se evaluaron después de un período de incubación de 3 días, por dosis radioinmunitaria. Los niveles de gonadotropinas en el medio de cultivo demostraron que los explantes testiculares liberan, bajo ciertas condiciones, una sustancia no esteroide que reduce preferencialmente la secreción de FSH sin modificar la de LH y PRL. Esta sustancia, al parecer inhibina, es destruída por el calor y la tripsina. El experimento también demuestra que la inhibina es secretada por las células de Sertoli y que a 37° C éstas células no son capaces de producir dicha hormona. Demoulin y col.²² basaron sus estudios en las experiencias de Channing y col. (1978²²) y de Erickson & Hsueh (1978²²) en las que se demuestra que a nivel del ovario, las células de la granulosa son responsables de la síntesis y la liberación de la inhibina.

Lee y col.²³ observaron la disminución rápida de inhibina en sangre después de la ovariectomía; ésto sugiere que los ovarios son la principal, pero no la única fuente de inhibina circulante. Estos ensayos señalaron que la producción de inhibina aumentaba en ratas tratadas con PMSG; lo cual podría deberse al incremento del número de células de la granulosa y de folículos no atróficos, ésto hace pensar en las células de la granulosa como las productoras de inhibina.

Baker y col.⁹ mencionan que las fuentes de inhibina se han encontrado en tejidos gonadales, secreciones y suero de varias especies^{8, 23}.

2.3.- HOMOLOGIAS DE LA INHIBINA EN DIFERENTES ESPECIES Y SEXOS.

Una homología estructural entre la inhibina humana y la porcina se reportó al observar la neutralización de la actividad de inhibina en fluido folicular humano por anti-fluido folicular porcino de mona rhesus¹⁵. De igual forma, otros autores¹⁶ encontraron una estructura inmunológicamente similar entre preparaciones de fh, ffb y ffr.

Murray-McIntosh y col.²⁰ demuestran los efectos de la inhibina de ovino en menos de 4 minutos en una respuesta electrofisiológica a gonadotropinas coriónicas en foliculos de Xenopus laevis. La hCG causa el rompimiento de la vesícula germinal dentro de los foliculos de Xenopus sp, abre los canales de K^+ y presumiblemente activa el proceso de maduración. Después de menos de 4 min de incubación de los foliculos con inhibina, se eliminó la respuesta aparente del cAMP producido por la estimulación de hCG. La acción de la inhibina en éste caso parece específica, ya que ni la activina ni una solución control causaron efecto electrofisiológico. La concentración de inhibina bovina requerida para bloquear la hiperpolarización de los foliculos de Xenopus laevis a temperatura ambiente (19-21°C) es de aproximadamente 5nM. Mientras que la inhibina previno la hiperpolarización estimulada por hCG, que ha demostrado estar asociada con la apertura de canales de K^+ y aumentos en cAMP, no se inhibieron las oscilaciones retardadas de la actividad de los canales Cl^- aparentemente dependientes de Ca^{2+} . No puede demostrarse ninguna influencia significativa de la inhibina en el tiempo de rompimiento de la vesícula germinal de los ovocitos de Xenopus sp inducido por hCG en concentraciones de inhibina mayores de aquellas que bloquean las respuestas electrofisiológicas a éste nivel de hCG inducido por GVBD (rompimiento de la vesícula germinal). Además, sugieren que la acción funcional de la inhibina podría estar relacionada a otros procesos de desarrollo dentro de las células foliculares o el ovocito, inducidos por gonadotropinas.

En 1988, Tsonis y col.²¹ realizaron estudios para determinar si la inhibina se encontraba en el ovario de gallina y si era producida por las células de la granulosa o de la teca. El estudio, que demuestra por primera vez la existencia de la inhibina en el ovario de la gallina doméstica, se basa en la supresión de la liberación de FSH de células de pituitaria de ovino en cultivo. Las capas de granulosa y tecales/estromales fueron separadas de la yema e incubadas durante 18 horas. La inhibina se encontró predominantemente en el medio incubado con células de granulosa; también se observó un aumento progresivo en la cantidad de inhibina producida por mg de proteína de capa granulosa durante los 5-6 días antes de la ovulación. También se encontró un factor mitogénético no producido por las capas de la granulosa y que estimula la división de las células de pituitaria *in vitro*.

2.4.- METODOS UTILIZADOS PARA LA CUANTIFICACION DE LA INHIBINA.

IN VIVO.

Para la cuantificación de los efectos de la inhibina Moodbidri y col.¹³ realizaron una serie de experimentos in vivo, basados en la supresión de la elevación de FSH causada por gonadectomía, como índice indirecto de la actividad de inhibina. Para ello utilizaron ratas machos y hembras. En ratas machos castrados a largo plazo (15 días antes del ensayo) encontraron que, por tratamiento previo con preparaciones de inhibina aisladas de distintas fuentes (testículos de carnero, rata, hombre y pollo, y ovarios de borrego y plasma seminal humano), los niveles de FSH disminuían sin presentar cambios en las concentraciones de LH y además, la respuesta del sistema hipotálamo-hipófisis a la inhibina cambiaba con el tiempo después de la castración; por lo cual éste método resultaba poco confiable. Otros experimentos con ratas y ratones recién castrados de 35 días de edad (Nandini y col., 1976; Davies y col., 1976; Marder y col., 1977; Lorenzen y col., 1978¹³) consisten en la supresión del aumento de FSH por ovariectomía mediante la inyección de preparaciones de inhibina. Los efectos se miden en muestras de sangre colectadas 17 horas después, encontrando una reducción de los niveles de FSH sérico en animales tratados con FFP o FFb. En relación a esto, Rosemary y col.⁵ llevaron a cabo un ensayo en el que la rata se ovariectomiza en el día del metaestro y el material de prueba se inyecta 3.5 horas después, al cabo de dos horas se miden las concentraciones de FSH séricas por una prueba estándar de equilibrio.

Los estudios que miden la supresión de la secreción de FSH seguida de la infusión de preparaciones de inhibina también utilizan carneros castrados prepupalmente y de igual forma señalan la disminución de los niveles de FSH Baker y col., 1976¹³).

Por otra parte, trabajos realizados durante 1982 sobre los niveles de inhibina en ratas hembras inmaduras tratadas con gonadotropinas antes y después de la castración²³ demuestran que el tratamiento de éstas ratas con PMSG induce un aumento progresivo en los niveles ováricos y circulantes de inhibina dependiendo de una acción específica sobre FSH y no sobre LH, por lo cual se considera al componente FSH de la molécula de PMSG como el responsable del aumento de los niveles de inhibina periférica y ovárica. La relación inversa entre los niveles circulantes de FSH e inhibina apoya el papel inhibitorio de ésta en la secreción de FSH. La inhibición del aumento de FSH postcastración por PMSG requiere de la presencia de los ovarios al momento de la inyección de PMSG. Se hallaron 2 intervalos de desaparición de los niveles de inhibina sanguínea en las ratas tratadas

con PMSG, probablemente desaparece en 2 fases debido a dos diferentes pesos moleculares.

Cummins y col.²⁴ demostraron que el tratamiento de ovejas ovariectomizadas con fluido folicular ovino libre de esteroides tiene efectos dosis y tiempo dependientes sobre las concentraciones periféricas de FSH en dos variedades de ésta especie (Booroola y Merino -control-). Aunque las ovejas Booroola, más fecundas, fueron más sensibles a las inyecciones de fluido folicular, sus ovarios sólo contenían 1/3 de la inhibina de los ovarios de las Merino. Los folículos antrales de las primeras presentaron menor volumen de células de granulosa comparados con los de las ovejas control. Esto podría explicar el bajo contenido de inhibina en los ovarios de las ovejas Booroola. Alternativamente, la razón de liberación de inhibina en los folículos podría ser mayor en Booroola que en los controles. Se concluye que la retroalimentación inhibina/FSH podría ser importante en la regulación de la secreción de gonadotropinas y por tanto, directa o indirectamente, jugaría un papel en la regulación de la tasa de ovulación en éstas razas de ovejas genéticamente diferentes.

Los resultados obtenidos por Sander y col.²⁵ en ratas hembras inmaduras de diferentes edades indican claramente que un factor parecido a inhibina está presente sus homogenados ováricos a partir de los 18 días. A ésta edad (18 días), la ovariectomía uni o bilateral no aumenta la secreción de FSH en un período de 8 horas, pero si hay un aumento significativo a las 5 y 8 horas después de la operación en edades posteriores. En ratas unilateralmente ovariectomizadas (ULO) de edades mayores a 18 días, los niveles de FSH disminuyeron a valores casi comparables a los control, 24 horas después de la operación; lo que indica una producción compensatoria de inhibina por el ovario remanente. En contraste, en ratas bilateralmente ovariectomizadas (BLO) la concentración de FSH aumentó 24 horas después de la operación. Estos hallazgos demuestran que la actividad similar a inhibina podría estar presente desde los 18 días de edad en los ovarios de ratas inmaduras y que juega un papel fisiológico en la regulación de la secreción de FSH desde los 23 días de edad. La concentraciones de LH encontradas a las 5 y 8 horas después de la ovariectomía uni o bilateral en varias edades no mostraron cambios, concluyendo que la actividad parecida a inhibina juega un papel específico, solamente en la regulación de la secreción de FSH. Sander y col. (1985) sugieren que a partir de los 23 días de edad la inhibina podría, mediante un mecanismo regulador a corto plazo, ajustar las concentraciones de FSH presentes y con ello, regular el crecimiento final del folículo dando lugar a la primera ovulación.

Otro modelo *in vivo* utilizado para estudiar la fisiología de la secreción de la inhibina se aplicó a hombres con cáncer de próstata que se sometieron a castración. Ishida y col.²⁶ usaron un RIA (basado en un antisuero para inhibina

de Ffb de 31 kDa) mediante el cual, demostraron que los niveles de inhibina circulantes disminuyen rápidamente después de la castración; apoyando la idea de que en el hombre la inhibina sérica inmunoreactiva (ir) es principalmente de origen gonadal pues se detectan niveles altos de ésta en el tejido testicular y en sangre venosa espermática (comparados con los niveles en sangre venosa periférica).

Finalmente la cuantificación de los efectos de la inhibina también ha sido observada en la reducción del peso ovárico (Chari y col., 1976) y uterino (Ramasharma y col., 1979); basándose en que la administración de hCG a ratas o ratones inmaduros causa un aumento de éstos pesos como resultado del sinergismo entre la FSH endógena y el hCG administrado, de ésta forma, la inhibina suprime la secreción endógena de FSH e inhibe el aumento en el peso ovárico o uterino. Al respecto Vijayalakshmi y col.¹⁰, utilizando ratones de 23-24 días de edad preparados con hCG e inyectados dos veces al día con preparaciones de inhibina observaron la supresión significativa del aumento en el peso ovárico¹³.

IN VITRO.

Los ensayos *in vitro* se basan en la reducción de la liberación de la FSH inducida por GnRH agregada al medio de cultivo de mitades de pituitaria de ratas maduras o de células de pituitaria aisladas por métodos enzimáticos¹³. Las células de pituitaria se cultivan en Medio de Eagle modificado por Dulbecco durante dos o tres días, al cabo de los cuales el medio se cambia y se agrega el material que se probará para la actividad similar a inhibina y la incubación se continúa por un período de tres días. El medio se colecta para análisis de LH y FSH y es reemplazado por uno fresco que contenga la misma cantidad de sustancia base del análisis, además de una concentración máxima de GnRH. Seis horas más tarde, el medio se colecta y se prueba nuevamente para LH y FSH. Utilizando medio de cultivo de células de Sertoli, fluido testicular ovino y preparaciones de inhibina de plasma seminal humano se observó una reducción de la liberación de FSH tanto basal como inducida por GnRH.

La fuente de material, tiempo de incubación y sustancias utilizadas varían según distintos grupos de investigación, por ejemplo; Scott y col.²⁷ utilizaron preparaciones de inhibina de linfa testicular de ovino (OTLP, tratada con carbón) proteína de FRT y FFh con células de pituitaria tratadas con tripsina. Encontraron que el bioensayo depende del cambio en el contenido de FSH de las células de pituitaria en cultivo y que éstas liberan FSH al medio de incubación, reforzada por la adición de LHRH. El porcentaje de supresión de FSH en cualquier dosis de OTLP fué menor con concentraciones menores de LHRH.

En otros experimentos²⁸ se estima la actividad parecida a inhibina secretada al medio por células de granulosa en cultivos a largo plazo. La adición de medio de

cultivo condicionado por células de granulosa de ratas no tratadas a células de pituitaria *in vitro* suprimió selectivamente los niveles de FSH en el medio de las células de pituitaria. La cantidad de supresión alcanzada dependió del número de células de granulosa en cultivo. El medio condicionado por células de granulosa de rata, tiene un factor con las características de inhibina que suprime la liberación de FSH sin afectar los niveles de LH. La observación de que la liberación basal de la actividad similar a inhibina tiene lugar después de períodos más largos de cultivo (posiblemente induciendo cambios en las características citológicas y bioquímicas de las células) indica que las células del cuerpo lúteo y las intersticiales deberían ser investigadas como candidatos potenciales para la producción de ésta actividad.

Otro tipo de ensayos *in vitro* reportados por Moodbidri y col.¹³ se basa en experimentos realizados por Davies y col. (1978¹³); usan mitades de pituitarias extirpadas de ratas machos adultos que son incubadas por una hora en medio 199 a 37°C en una atmósfera de 95% de oxígeno y 5% de CO₂. Al final del período de preincubación el medio es reemplazado por uno al que se le agregó fluido de red de testis, extractos testiculares de ovino y fluido folicular. La incubación se continúa por una hora. Luego se agrega GnRH a una concentración que produce una estimulación submáxima de la secreción de gonadotropinas. Después de una incubación de tres horas el medio se colecta para medirle la FSH. Con éste ensayo se observó una supresión dosis respuesta de la liberación de gonadotropinas estimulada por GnRH mediante la adición de las sustancias mencionadas.

2.4.1.- VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS METODOS UTILIZADOS PARA LA CUANTIFICACION DE LA INHIBINA.

Rosemary y col.⁵ evalúan los criterios tomados en cuenta para medir los efectos de la inhibina y señalan que las pruebas *in vivo* que utilizan animales castrados son altamente específicas para la supresión de FSH, pero algunas desventajas que presentan se deben al costo del gran número de ratas que se utilizan para obtener resultados confiables y al tiempo empleado entre la purificación y los resultados finales; la mayor parte del cual es usado por el RIA. Los ensayos basados en la disminución del peso ovárico se consideran menos caros que los ensayos *in vivo* por que requieren menor tiempo. Sin embargo, el problema básico radica en el gran número de factores presentes en el fluido folicular como proteoglicanos, proteínas (Edwards, 1974⁵) y otros factores identificados, que pueden alterar la función de la pituitaria y las gónadas (Franchimont & Channing, 1981⁵). Lo anterior coincide con observaciones realizadas más tarde por Baker y col.⁹, quienes además mencionan que la supresión de los niveles de FSH sérico por inyección o

infusión de material con inhibina a animales grandes como borregos y monos es altamente reproducible y su respuesta tiene un efecto dosis dependiente, pero es poco práctica para utilizarse como ensayo de rutina. Otros procedimientos similares en animales más pequeños como ratas y ratones son mucho más prácticos pero poco confiables. También Rivier y col.⁷ están de acuerdo con éstas observaciones.

Los ensayos *in vitro*, basados en cultivos de células de pituitaria anterior de rata, inicialmente se preparaban estándares de laboratorio de linfa testicular de ovino (OTLP, OTLS) a las que arbitrariamente se les asignaba una potencia de 1 U/mg; también se ha usado un estándar de fluido de rete testis de ovino (FRT) que tiene una potencia de 208 U/ampula, en base a los viejos estándares de linfa. Según éstos se toman en cuenta tres puntos finales de ensayo; 1) medición de las concentraciones de FSH en medio de cultivo seguido de la incubación de las células con una concentración máxima efectiva de hormona liberadora de gonadotropinas (Eddie y col., 1979⁹, 2) la concentración de FSH en lisados de células de pituitaria lavadas (ensayo de contenido celular²⁷ y 3) medición de FSH en el medio sin estimulación (prueba de secreción basal, Lee y col.²³). Los primeros dos ensayos son eficientes y han sido utilizados para monitorear pasos de purificación y para algunos estudios fisiológicos. El tercer método, ensayo de secreción basal, fue desarrollado principalmente para estudios fisiológicos.

Mediante el uso de preparaciones de inhibina de actividad biológica conocida hay gran acuerdo entre los resultados del bioensayo de estimulación con GnRH y el grado de supresión de los niveles séricos de FSH en borregos castrados inyectados con preparaciones de inhibina (Baker y col., 1981⁹). Esto indica que la estimulación por GnRH responde en la misma forma en el animal completo; sin embargo, muchas sustancias distintas a la inhibina afectan la secreción de FSH de células de pituitaria en cultivo, entre éstas se incluyen: varios químicos, hormonas esteroides, extractos de tejidos como el hígado y el suero de animales castrados; éstas producen la supresión de la secreción de FSH no paralela al efecto del estándar de inhibina con posibles evidencias de toxicidad celular, cambios morfológicos, desprendimiento de células de los recipientes de cultivo o liberación aumentada de cromo radioactivo (Baker, y col., 1981⁹).

Hasta el momento, los ensayos de inhibina basados en la supresión de la secreción de FSH o en el contenido de células de pituitaria anterior de rata en cultivo, son los métodos disponibles mejor caracterizados, confiables y precisos. Sin embargo, el diseño paralelo y el chequeo de la toxicidad celular mediante la medición de la liberación de cromo radioactivo o LH, son esenciales para reducir las posibilidades de una supresión no específica de FSH por otros compuestos distintos a inhibina⁹.

Por otro lado, Rosemary y col.⁵, reportan las pruebas *in vitro* como más sensibles que las técnicas *in vivo* y menos

caras por fracción de prueba; ya que una rata puede servir como donador para muchas células de pituitaria y el tiempo que se emplea es aproximadamente igual debido a que el RIA para medir FSH en el medio es el mismo que el utilizado en el suero. Por otra parte, los cultivos de células basales parecen ser más válidos para medir la actividad supresora de FSH, pues los efectos se asemejan a los observados *in vivo*. También se ha demostrado que éstas pruebas son confiables y cuantitativas⁷.

2.5.- ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y MECANISMOS DE RETROALIMENTACION.

2.5.1.- Actividad biológica de la inhibina.

Rosemary y col.⁵ resumen la acción *in vivo* de la foliculostatina en cuatro puntos principales:

1.- El fluido folicular de muchas especies de mamíferos suprime la secreción de FSH significativa y selectivamente cuando se inyecta intraperitonealmente o por vía intravenosa a animales uni o bilateralmente ovariectomizados.

2.- El grado de supresión de FSH es proporcional a la dosis administrada estén o no presentes los ovarios en el animal utilizado (Schwartz & Channing, 1977; Campbell & Schwartz, 1979; Grady y col., 1981⁵).

3.- La latencia de la supresión de FSH por fluido folicular porcino administrado intravenosamente es de 1.4 horas, cercano a la vida media del FSH sérico (Gay y col., 1970⁵).

4.- Una supresión altamente significativa de los niveles de FSH es posible después de inyectar fluido folicular, sin alterar notablemente los niveles de LH sérico.

En 1981 Scott y Burger²⁹ reportan que en cultivos de pituitaria, la inhibina testicular suprime específicamente la secreción de FSH sin alterar el contenido de LH; mientras que, en cultivos estimulados por GnRH se suprime la secreción de FSH y LH.

Al parecer⁵, la foliculostatina es específica en suprimir los niveles de FSH sin alterar los de LH, tanto *in vivo* como *in vitro*, pero existe una paradoja entre ambos: la secreción de LH y FSH *in vivo* se considera bajo el control de la GnRH, y la foliculostatina sólo afecta selectivamente los niveles de FSH *in vivo*. Los pocos casos reportados sobre supresión de LH inducida por fluido folicular *in vivo* resultan del uso de dosis altas que podrían contener sustancias contaminantes no específicas y, alternativamente, su supresión podría ocurrir sólo con niveles de GnRH elevados previamente como sucede en el proestro (De Paolo y col., 1979; Rush y col., 1980⁵). Es por esto que los cultivos realizados con GnRH en condiciones basales o bajas

son los que mejor reflejan la actividad *in vivo* de la foliculostatina.

Por otro lado, Rosemary y col.⁵ mencionan que hay cuatro clases de evidencia que sugieren que la sustancia en el fluido folicular causante de la supresión específica de FSH *in vivo* e *in vitro* podría ser una hormona:

1a.) El estradiol no es un candidato adecuado para ser la única señal de retroalimentación negativa en el control de la FSH en animales intactos, ya que no logra suprimir los niveles de FSH tan efectivamente como los de LH en animales que carecen de ovarios. En cambio el fluido folicular sirve como terapia de reemplazo para suprimir el FSH sérico en ratas ovariectomizadas a largo plazo o recientes (Campbell & Schwartz, 1979⁵).

2a.) Los cambios en la concentración de la actividad de la foliculostatina en el fluido folicular o en extractos ováricos ocurren junto con cambios en el tamaño del folículo o dependiendo de la etapa del ciclo.

3a.) Las mediciones de la actividad supresora de FSH en sangre venosa, periférica u ovárica: Se ha demostrado la elevación de la actividad de la foliculostatina en plasma periférico después de un tratamiento con PMSG en ratas hembras inmaduras (Lee y col., 1981⁵). En otros estudios se ha visto que la capacidad supresora de FSH en plasma venoso ovárico cambia sólo en el proestro tardío después de la elevación primaria de gonadotropinas (de Paolo y col., 1979⁵), sugiriendo una correlación inversa entre los niveles séricos de FSH y la actividad de la foliculostatina.

4a.) Los trasplantes a riñón o bazo de ratas adultas ovariectomizadas: Los trasplantes ováricos a riñón suprimieron la LH y FSH séricas. Los trasplantes ováricos a bazo, que no restauraron los niveles de estrógenos debido a la limpieza de productos esteroides por el hígado, restauraron los niveles de FSH a valores tónicos; mientras que los niveles de LH se elevaron aún más (Uilenbroek y col., 1978; Greep & Jones, 1950⁵). Sugiriendo que el ovario secreta la hormona al menos cuando está en la circulación esplácica y que puede suprimir la FSH sin afectar la LH.

Para proporcionar evidencia adicional del papel de la inhibina en la regulación de la secreción tónica de FSH en conejos hembras adultos Goodman y col.³⁰ examinaron dos hipótesis sobre la inhibina: 1) la inhibina puede actuar directamente sobre las células de pituitaria de conejo para inhibir la secreción preferencial de FSH y 2) las células de granulosa secretan una sustancia parecida a inhibina. Los resultados indican que las células de pituitaria anterior son responsables de la secreción de inhibina *in vitro* y que el PFF inhibe preferencialmente la secreción de FSH en forma

directa graduada y reversible. Demostraron también que las células de la granulosa de folículos antrales parecen secretar una sustancia parecida a inhibina. Por ello, la inhibina juega un papel importante en la regulación de la folículoogénesis y la secreción tónica de gonadotropinas, y si en realidad así sucede, ésta sustancia podría ser utilizada como un criterio válido para distinguir entre los folículos sanos y los atresicos.

De Jong y Robertson⁶ hicieron una revisión en la que encuentran que las concentraciones periféricas de FSH disminuyen después de la inyección de preparaciones de inhibina, el efecto podría ser causado por:

- 1) Acción directa sobre la síntesis y la secreción de FSH en la glándula pituitaria,
- 2) Por inhibición de la acción FSHRH o
- 3) Por acción a nivel de hipotálamo

Lumpkin y col.³¹ y Condon y col.⁶ postularon las últimas dos formas de acción de la inhibina, pero la mayoría de los datos experimentales indican una acción directa sobre la gonadotropina pituitaria (²⁷, De Jong y col., 1983⁶). Aunque el mecanismo aún se desconoce Franchimont y col.⁶ en 1983 demostraron que la adición de preparaciones con inhibina a células de pituitaria causaba un aumento en la secreción de cGMP y una disminución en la secreción de cAMP. Jenner (1983) encontró que un aumento de cAMP en hemipituitarias incubadas provoca una disminución en la síntesis y secreción de FSH. Los efectos postulados hasta el momento se basan en sistemas de ensayo cuyo principal problema es el uso de diferentes puntos finales inhibidores. Por ejemplo, en estudios *in vivo* la supresión de FSH circulante o una consecuencia de ésta como la disminución del peso ovárico o uterino y el radioinmunoensayo, en estudios *in vitro* la liberación de FSH, LH y otras hormonas al medio. La interpretación de éste punto final inhibidor ha llevado a conclusiones erróneas debido a la poca especificidad del método.

Por otro lado, Baker y col.⁸ en estudios realizados desde 1982 encuentran que las actividades específicas más altas de la inhibina se observan en el fluido de red de testis de ovino (200-400 U/mg, 300-800 U/ml) y fluido folicular bovino y ovino (50-200 U/mg, 3,060-12,000 U/ml); los niveles son moderadamente altos en fluido folicular de rata (50-200 U/mg, 2,500-10,000 U/ml) especialmente después del tratamiento con PMSG. Otras fuentes demuestran una actividad baja (<10 U/mg), como por ejemplo: medios de cultivo de células de Sertoli o células de granulosa y extractos de testículos y ovarios. El fluido folicular (2 U/mg, 100 U/ml) y el plasma seminal humanos (0.7 U/mg, 30 u/ml) también presentan niveles bajos cuando se prueban con células de pituitaria. Las variaciones de la actividad específica de la inhibina posiblemente dependen de su estructura en diferentes especies⁹ (Tabla 6).

TABLA 6

**ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA INHIBINA
EN DIFERENTES ESPECIES
(BAKER Y COL. 1982)**

FUENTE DE MATERIAL UTILIZADO	ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LA INHIBINA
FLUIDO DE RED DE TESTIS OVINO	200 - 400 U/mg, 300 - 800 U/ml
FLUIDO FOLICULAR BOVINO / OVINO	50 - 200 U/mg, 3,060 - 12,000 U/ml
CELULAS SERTOLI CELULAS GRANULOSA EXTRACTOS TESTICULARES Y OVARICOS	< 10 U/mg
FLUIDO FOLICULAR HUMANO	0.7 U/mg, 300 U/ml

En lo referente a la producción de inhibina por la hipófisis, Au y col.³² demostraron que después de la hipofisectomía en ratas adultas no hay una disminución inmediata de la producción de inhibina y que el contenido de inhibina testicular y la producción de ésta no disminuyeron hasta una semana después del tratamiento. Los niveles fueron muy bajos o no detectables a los 30-42 días. También demuestran que en ratas hipofisectomizadas a largo plazo, el contenido de inhibina de los testículos puede ser estimulado por FSH durante períodos cortos. Lo cual concuerda con la hipótesis de que la FSH estimula el tejido blanco para producir una sustancia de retroalimentación, la inhibina, involucrada específicamente en el control de su secreción con la glándula pituitaria.

También se han estudiado los efectos de una forma altamente purificada de PRF (proteína reguladora del folículo), en la fertilidad así como en la función del epitelio seminífero en la rata³³. Se confirman observaciones previas de que la FRP, una proteína ovárica, cuando se inyecta sistémicamente a un macho intacto puede alterar tanto las funciones esteroideogénicas como las gametogénicas del testículo sin suprimir los niveles de FSH sérico. Se observó un aparente aumento en los niveles de FSH en grupos tratados con FRP a largo plazo y una inhibición dosis-tiempo dependientes de los conteos de cabezas de esperma (sperm head counts), medida indirecta de la producción de éstos, y de la secreción testicular de andrógenos, con clara reducción de la fertilidad. Estos hallazgos apoyan el papel de las proteínas intragonadales en la regulación de la respuesta gonadal a las gonadotropinas y sugiere su utilidad en la diagnosis y terapia de la fertilidad y lo relacionado a estos desórdenes.

2.5.2.- Inhibina y hormonas esteroides.

En lo referente a la relación de la inhibina con esteroides y gonadotropinas, Franchimont⁴ menciona que las preparaciones de inhibina no contienen esteroides (testosterona, dihidrotestosterona, 17 B-estradiol, progesterona, etc) capaces de explicar sus efectos biológicos y que tampoco fijan ninguno de éstos compuestos. La sustancia no es igual a la proteína de unión a andrógenos (ABP) secretada por la células de Sertoli en presencia de FSH y las fracciones activas no poseen ninguna reacción cruzada con FSH y LH humanas, ovinas y murinas.

En la revisión realizada por Rosemary y col.⁵ se citan algunos experimentos, en ellos el estradiol no es la única sustancia influyente en la retroalimentación negativa de la FSH; se basan en el hecho de que en todas las especies estudiadas, la extirpación de los ovarios eventualmente conduce a la elevación de los niveles séricos de FSH; sin

modificar los niveles de estradiol (que se mantienen por secreción adrenal Campbell y col., 1977) y LH.

Henderson y Franchimont³⁴ han realizado estudios que comparan la eficiencia relativa de la producción de inhibina *in vitro* de tejidos foliculares bovinos; tejido tecal, células de la granulosa y tejido ovárico estromal y luteal, en base a los efectos del anti-andrógeno de acetato de ciproterona, andrógenos sintéticos, mesterolona y metilestrenolona. Demuestran que sólo el tejido ovárico tiene la capacidad de producir inhibina *in vitro*. Observaron que el tejido ovárico estromal y luteal no contenían ni produjeron cantidades detectables de inhibina, sugiriendo nuevamente que las células de la granulosa son probablemente el sitio principal de producción de inhibina, ya que éstas células fueron las más activas con respecto a la producción de esta sustancia *in vitro*. El desprendimiento de las células de la granulosa de la pared del folículo intacto, dejando una capa tecal; causó que la producción de inhibina disminuyera a menos del 20% de su valor original. El anti-andrógeno de acetato de ciproterona suprimió la producción de inhibina del tejido folicular bovino en cultivo, lo cual es probablemente el resultado de una acción de las células de la granulosa. Esta sustancia ejerce su efecto anti-androgénico inhibiendo la asociación del andrógeno a receptores citosólicos y previniendo la retención nuclear de complejos andrógeno-receptor. Lo anterior sugiere que un receptor citosólico de testosterona similar, capaz de producir una translocación nuclear podría estar presente en las células de granulosa de bovino y que receptores a éste tipo podrían mediar la estimulación androgénica de la producción de inhibina por células de la granulosa. El acetato de ciproterona también inhibió la producción basal de inhibina de las células de la granulosa en cultivo, implicando la acción de andrógenos en éste proceso y que mediante el bloqueo de la acción de testosterona es como el cyproterone acetate ejerce su efecto inhibitorio en la producción de inhibina basal. Se especula que la producción de inhibina folicular podría involucrar una interacción cooperativa entre las células de la teca y la granulosa³⁴.

Otros investigadores³⁵ demuestran efectos específicos y diferenciales de los esteroides sexuales y la inhibina de células granulosas porcinas sobre la secreción de LH y FSH por acción directa a nivel de pituitaria anterior de rata. Señalan que ésta actividad parecida a inhibina proviene de la capa de células de la granulosa y no de las células luteales y funciona cambiando los efectos estimuladores y potenciando los efectos inhibidores de los esteroides sexuales en la secreción de gonadotropinas.

Bicsak y col.³⁶ examinaron la regulación hormonal de la producción de inhibina de células de granulosa en cultivo de ratas inmaduras hipofisectomizadas tratadas con estrógenos, usando un RIA específico para la porción N-terminal de la cadena alfa de la inhibina. Encontraron que el cAMP es mediador en la producción de inhibina y que el FCI-I

(factor de crecimiento parecido a insulina) y el PVI (péptido vasoactivo intestinal) tienen efectos estimuladores en la síntesis de inhibina y/o en la secreción a nivel de células de la granulosa. El FEC (factor epidérmico de crecimiento) y la GnRH inhibieron la estimulación de FSH de la secreción de inhibina. Hallaron niveles bajos del contenido de inhibina en extractos ováricos de ratas tratadas con FSH cuando se compararon con los niveles elevados de inhibina sérica, ésto significa que la mayor parte de la inhibina no es almacenada sino secretada después de su síntesis. La cantidad de inhibina producida por las células en respuesta a LH y FSH a sus dosis máximas efectivas igualó la cantidad inducible por FSH. El hallazgo de que la LH y FSH aumentan la secreción de inhibina sugiere mecanismos importantes de retroalimentación. La PRL no alteró la producción de inhibina en células tratadas con FSH, por tanto su acción no estaría asociada con cambios en la producción de inhibina ovárica. La FSH y LH actúan como señales endócrinas para modular la producción de inhibina, además los factores de crecimiento y los péptidos reguladores podrían ejercer un control parácrino local. Las hormonas moduladoras estudiadas ejercen su acción por distintas rutas, incluyendo proteína-cinasa A (FSH, LH y PVI), proteína-cinasa C (GnRH) y tirosina-cinasa (IGF-I y EGF); las células de la granulosa podrían proporcionar un modelo único para estudiar la activación del gene de la inhibina.

Baird y col.³⁷ examinaron los efectos de la supresión de FSH en la secreción de hormonas ováricas, en ovejas con ovarios transplantados al cuello durante la fase folicular del ciclo, cuando la selección del folículo había ocurrido. Muestran que el FFO causa una inhibición inmediata de la secreción de estradiol ovárico, androstenediona, testosterona e inhibina; precedida de una disminución en los niveles plasmáticos de FSH, atribuible a grandes cantidades de inhibina en el FFO. En conclusión, el folículo ovulatorio tiene un requerimiento finito de FSH y la disminución de FSH bajo éste umbral resulta en la atresia del folículo ovulatorio y en la consecuente caída de los productos de secreción de éste. Se observó un aumento del nivel de LH después del tratamiento con FFO en el cual el ovario es incapaz de responder normalmente (secreción pulsátil) a ésta estimulación, probablemente debido a la presencia de inhibidores de crecimiento en el fluido folicular.

Martin y col.³⁸ por medio de un RIA para inhibina de Ffb, observaron que los niveles de ésta en el folículo ovulatorio de terneras disminuían después de la inyección de PG y alcanzaban sus niveles más bajos durante la elevación de LH; ésta disminución preovulatoria podría ser importante en el desarrollo de los folículos dominantes. En contraste, las concentraciones intrafoliculares de estradiol aumentaron durante el crecimiento del folículo, de modo que la inhibina podría jugar un papel local importante en su producción, inducida con FSH, por células de la granulosa. En los folículos no ovulatorios, las concentraciones de inhibina,

estradiol y progesterona aumentaron y quizá actuen sinérgicamente para suprimir la secreción de gonadotropinas y el reclutamiento de otros folículos.

2.5.3.- Inhibina y gonadotropinas.

En lo que respecta a las gonadotropinas, Kimura y col.³⁹ investigaron la relación entre el aumento y la disminución de las concentraciones de FSH en plasma periférico y la cantidad inhibidora de FSH (AI-FSH) en plasma venoso ovárico durante el período de ovulación inducida por HCG en ratas adultas. Observaron una disminución significativa de la AI-FSH 6 horas después de la inyección de HCG; cuando han aumentado los niveles plasmáticos de FSH, probablemente debido a cambios en la función de las células de la granulosa de los folículos de Graaf destinados a ovular. Posteriormente, las concentraciones de AI-FSH aumentaron tal vez debido al aumento de la secreción de inhibina de nuevos folículos en crecimiento, dando como resultado el fin de la etapa de elevación de FSH.

En otros experimentos, se midieron las concentraciones de inhibina en muestras de suero de monas Rhesus, para determinar si la secreción ovárica de inhibina reforzada era la causante de la disminución característica en las concentraciones de FSH de los ciclos ovulatorios de monas tratadas con estrona⁴⁰. En éstos animales las concentraciones de FSH circulante fueron significativamente menores comparados con los control; lo cual no se atribuyó a una elevada secreción de inhibina, pues las concentraciones de ésta proteína en suero se encontraron disminuidas durante la fase folicular. Esto indica que tanto la FSH inactivo como la bioactividad de ésta es menor en éstos animales. Estas concentraciones bajas de FSH asociadas con las de Inhibina en las monas tratadas con estrona coinciden, con los niveles de estrógenos como el principal determinante de la secreción basal de FSH por pituitaria, atribuyendo a la FSH la respuesta de la secreción de inhibina ovárica durante la fase folicular. Los patrones de variación de la inhibina a lo largo del ciclo ovulatorio de las monas rhesus son similares en humanos (McLachlan y col., 1987⁴⁰) y macacos (Fraser y col., 1989⁴⁰); su concentración es baja durante la fase folicular y aumenta ligeramente cuando se da la elevación de FSH y LH a medio ciclo; y luego de una meseta o disminución ligera, se encuentra un pico durante la fase luteal. En las monas tratadas con estrona el principal efecto de los estrógenos sobre la inhibina fue durante la fase folicular, dónde el ratio de las concentraciones de Inhibina de la fase luteal a la folicular fué muy alto, no se observaron cambios en los niveles de LH en animales control ni en los tratados con estrona.

La posibilidad de que la LH regulara la producción de inhibina folicular fue examinada por Zhang y col.⁴¹, quienes midieron la respuesta de gonadotropinas purificadas de rata (FSH y LH), gonadotropina coriónica humana (hCG, actividad de LH) y PMSG (actividad mezclada de FSH y LH) en un cultivo *in vitro* de células de granulosa. Demostrando que mientras la PMSG o la FSH estimulaban la producción de inhibina, la hCG o la LH no tenían ningún efecto sobre la misma, probablemente debido a un número limitado de receptores para LH. Sin embargo, el tratamiento concomitante de las células de granulosa con LH o hCG, suprimió la producción de inhibina inducida por PMSG de forma dosis respuesta. Cuando se comparó el efecto de la hCG sobre la producción de inhibina estimulada por FSH con la inducida con PMSG en un sistema de cultivo, encontraron que la exposición a largo plazo de las células de la granulosa a concentraciones excesivas de LH/hCG, con dosis elevadas de la última disminuía la regulación del receptor a LH en las células de la granulosa, lo cual podría originar una disminución en la producción de inhibina. Los resultados así obtenidos indican que la producción de inhibina está bajo control directo de la FSH y la LH y posiblemente estén relacionadas con las alteraciones en su actividad durante la ovulación *in vivo*.

Otros autores⁴² reportan los efectos *in vitro* de una inhibina bovina libre de esteroides y altamente purificada (M_r 32,000) sobre la secreción de LH y FSH inducida por GnRH, en cultivos primarios de células de pituitaria de ovino, evidenciando la influencia de la inhibina en la secreción de LH en éstas células a diferencia de su acción en células de rata. Debido a ésta diferencia de acción, se llevaron a cabo 4 experimentos:

Experimento 1.- Demuestra que tanto el FFB tratado con carbón, como la inhibina bovina altamente purificada (M_r 32,000) tienen efectos cualitativos indistinguibles sobre las células. Y que ambas preparaciones provocan la liberación de LH inducida por GnRH de forma tiempo y dosis respuesta.

Experimento 2.- Por medio de la inmunoneutralización de la acción de la inhibina se demostró la capacidad del FFB para suprimir la liberación de FSH inducida por GnRH, mientras que la liberación de LH inducida por FSH se bloqueó completamente en presencia del antisuero.

Experimento 3.- Reveló que la subunidad alfa de inhibina libre no afecta la secreción basal de FSH y LH inducida por GnRH en células de pituitaria de ovino.

Experimento 4.- En éste se encontró que mientras el estradiol 17-beta suprime la secreción basal de FSH. La liberación de LH basal e inducida por GnRH no se afectan aún en concentraciones de máxima supresión de FSH basal. Concluyeron que el efecto estimulador reportado para el FFB no es atribuible a la presencia de estradiol 17-beta.

Estos hallazgos sugieren que la inhibina suprime directamente la secreción tónica de FSH de la pituitaria anterior de ovejas y, al mismo tiempo, refuerza la liberación pulsátil de LH sensibilizando las gonadotropas a la acción

estimuladora de la GnRH. De éste modo contribuiría de forma inesperada a la generación del pico preovulatorio de LH en la oveja.

Por su parte Rivier y col.43 han usado la inhibina humana recombinante (hr) en la rata hembra ovariectomizada, investigando su capacidad para alterar la secreción de gonadotropinas durante el proestro y el estro. Compararon éstos efectos con los de un antagonista de GnRH y estudiaron el efecto del bloqueo inducido de inhibina en la elevación secundaria de FSH durante la ovulación. La inyección de inhibina A hr en la mañana del proestro, disminuye significativamente la elevación primaria de FSH. Los cambios en la liberación de FSH durante el proestro dependen de la GnRH endógena. La disminución de la secreción de FSH se atribuyó a la capacidad del FF para interferir con la acción estimulante de la GnRH en la secreción de FSH. Se observó que grandes dosis de inhibina A hr no suprimieron la elevación primaria de FSH e interfirieron con la cantidad total de LH liberada. Aún no se sabe si otras proteínas distintas a la inhibina son responsables del efecto diferencial del FF e inhibina rh. Los niveles de inhibina alfa (medidos por RIA), reducidos por bloqueo de receptores de GnRH y restaurados por LH exógena, muestran una disminución marcada durante el proestro tardío. Esto apoya la hipótesis de que los cambios inducidos por LH en la liberación de inhibina juegan un papel en la modulación de la elevación secundaria de LH e indican que la secreción de FSH durante el estro está bajo la influencia tónica inhibidora de la inhibina. Finalmente, el bloqueo de los receptores de GnRH no tiene efecto medible en la liberación de FSH cuando se administra en el proestro tardío. Los resultados demuestran que la inhibina interfiere con la elevación secundaria de FSH y que ésta disminución no fué suficiente para alterar el número de folículos reclutados en el siguiente ciclo.

Al respecto, Brannian y col.44 usaron un modelo in vitro de células de granulosa no luteinizadas y luteinizadas para probar la hipótesis de que la producción de inhibina por éstas células de primates y su regulación por FSH y LH cambian durante el intervalo periovulatorio. Señalaron que en especies no primates las células de la granulosa son la fuente primaria de inhibina ovárica, mientras que en primates es el cuerpo lúteo (McLachlan y col., 1987; Smith y col., 199044). Los objetivos de éste trabajo fueron a) determinar las condiciones óptimas para la producción de inhibina in vitro, por células de granulosa luteinizadas de monas rhesus y b) comparar la producción de inhibina y progesterona por células de granulosa no luteinizadas y luteinizadas en presencia o ausencia de agonistas. Las monas recibieron uno o dos regímenes de gonadotropinas humanas para inducir el desarrollo de varios folículos. Se inyectaron con hFSH combinada o no con hLH, después de lo cual recibieron o no estímulos con hCG para inducir la ovulación y colectar las células. Los folículos se aspiraron por laparotomía. Después del removimiento de los ovocitos se obtuvo una preparación de

células de la granulosa por centrifugación. Las células se contaron y se determinó su viabilidad por exclusión de azul de tripano; luego se cultivaron de dos formas:

Estudio 1) Las células de la granulosa no luteinizadas se cultivaron en presencia o ausencia de hCG con o sin suplementos (insulina, suero fetal bovino o suero plus que contenía suero fetal bovino con factores de crecimiento) durante 8 días.

Estudio 2) Se cultivaron células de la granulosa luteinizadas y no luteinizadas durante 4 días en F-10 suplementado con 10% de suero de monas rhesus anovulatorias con o sin adición de hCG.

Las concentraciones de progesterona e inhibina fueron determinadas por RIA. Los resultados obtenidos por Brannian y col.44 indican que las células de granulosa de macacos producen una sustancia inmunoreactiva parecida a inhibina, por un proceso estimulado por factores séricos y varios agonistas dependientes de cAMP. Las células de la granulosa luteinizadas y no luteinizadas produjeron niveles similares de inhibina inmunoreactiva, las CGL sintetizaron mucho más progesterona que las CGN. La producción de inhibina por éstas aumentó durante la exposición a FSH pero no a hCG, mientras que la producción de hCG en las CGL estuvo reforzada por ambas gonadotropinas. La hCG fué el estimulador más efectivo en la producción de inhibina tanto en CGN como en CGL. La producción de inhibina por las células de la granulosa dependió de la presencia del suero. Este reforzó y sostuvo la producción de inhibina durante 8 días de cultivo y facilitó su síntesis estimulada por hCG. Se desconocen los componentes séricos responsables de promover la producción de inhibina, es posible que estén involucrados factores de crecimiento o esteroides. El medio con una alta concentración de insulina no estimuló la producción de inhibina. Según lo observado por McLachlan y col. (198744) y Fraser y col. (198944), los niveles circulantes de inhibina inmunoreactiva en mujeres y monas, primero se elevan sobre una línea basal en la fase folicular tardía y después aumentan rápidamente en la fase luteal temprana del ciclo; con ello Brannian y col.44 sugieren que la luteinización estuvo asociada con una capacidad creciente de las células de la granulosa para sintetizar y secretar inhibina. Sin embargo, los datos obtenidos señalan que las células de la granulosa del folículo preovulatorio pueden producir grandes cantidades de sustancias parecidas a inhibina y que ésta capacidad sintética no es alterada marcadamente por el pico de gonadotropinas de los eventos periovulatorios. El hallazgo de que la PGE2 (prostaglandinas) estimula la producción de inhibina en CGN y CGL implica que las prostaglandinas sintetizadas localmente juegan un papel en la regulación de la síntesis de inhibina en el folículo en desarrollo y el cuerpo lúteo; la acción de éstos agonoistas sobre la producción de inhibina tal vez ocurra vía producción de cAMP, ya que el db-cAMP fué un estimulador potente de la producción de inhibina de CG sin importar el estado o tiempo de cultivo.

El mecanismo por el cual actúa el cAMP para aumentar la producción de inhibina es poco claro, aunque Pei y col. (199144) identificaron un elemento en el gene de la subunidad alfa de la inhibina.

Kaneko y col.45 investigaron la relación entre los cambios en los niveles periféricos de FSH y la inhibina en vacas después del tratamiento con GcE (gonadotropina coriónica de equino), examinaron también, las concentraciones de estradiol 17-beta, progesterona y LH en plasma periférico. El estudio reportó por primera vez los cambios de la inhibina bioactiva e inmunoreactiva en plasma periférico de vacas superovulantes junto con un examen del desarrollo folicular usando un análisis ultrasonográfico. Este indica dos curvas de crecimiento de los folículos grandes > 10mm de diámetro. La primera, ocurre junto al desarrollo de folículos medianos (> 7 < 10 mm) y pequeños (> 4 < 7mm) y continúa hasta la ovulación y la segunda comienza en el día 1 de la ovulación. La bioactividad de la inhibina aumento durante las dos curvas de crecimiento. Los cambios en la inmunoreactividad de la inhibina en plasma periférico se emparejaron con los de la inhibina bioactiva en animales tratados con eCG. Por el aumento de la bioactividad y la inmunoreactividad de la inhibina durante las dos curvas de crecimiento de los folículos grandes se supone que éstos folículos son la fuente principal de inhibina. No hubo correlación entre los niveles circulantes de inhibina y los de progesterona; por ello los autores consideran que el cuerpo lúteo no es la fuente de inhibina circulante. Las concentraciones plasmáticas de estradiol 17-beta aumentaron en respuesta al tratamiento con GcE y se emparejaron con los niveles de inhibina circulante. Por tanto también se considera a los folículos grandes como fuente de estradiol 17-beta.

2.5.4.- Mecanismos de transporte de la inhibina.

Baker y col.9 especulan que el transporte de la inhibina para llegar a la circulación es por medio de los linfáticos gonadales. Este tema se ha estudiado indirectamente, mediante transplantes de ovarios al bazo de ratas castradas; con ello se suprimen los niveles de FSH mientras que los de LH permanecen elevados, indicando que la inhibina no es inactivada en el hígado como los esteroides (Ullenbroeck y col., 19789).

En otros trabajos Sander y col.46 investigaron si el rango de variación de la liberación del material parecido a inhibina por células de granulosa in vitro mostraba variaciones cíclicas en los días siguientes al ciclo estral. Querían hallar una posible explicación a los cambios tiempo relacionados encontrados durante el ciclo en plasma venoso ovárico (OVP) y fluido folicular. Encontraron que la cantidad de inhibina liberada por las células de granulosa en cultivo varia según el día del ciclo, siendo más alta en el día del

proestro, sin embargo el transporte de inhibina del folículo a la circulación durante este periodo está bloqueada, ya que la alta producción de inhibina no se refleja en una reducción de las concentraciones de FSH plasmático.

2.5.5.- Inhibina y su relación con el cambio en forma y tamaño de las células foliculares.

Algunos experimentos parecen indicar que la cantidad de actividad similar a inhibina cambia junto con la morfología de las células²⁸. Observaron que durante los primeros cinco días del período de cultivo, cuando las células se están dividiendo, dispersando y probablemente diferenciando, hay una disminución de la actividad parecida a inhibina en el medio, seguida de una producción más o menos estable de inhibina hasta el día 15; durante los días 14-21 aumenta su producción, y después hay una marcada disminución probablemente debida a la edad y muerte de las células. Las explicaciones a las diferencias en la cantidad de actividad parecida a inhibina encontradas en el medio condicionado por células de la granulosa aún son especulaciones sin la cuantificación del número de células viables presentes en los días del cultivo.

Baker y col.⁹ sugieren que la medición de la inhibina quizá proporciona un indicio de la función de las células de la granulosa por lo menos en folículos grandes. La sugerencia se basa en observaciones; en dónde se encontró que las concentraciones de inhibina aumentan con el tamaño folicular. En folículos atrésicos el contenido de ésta disminuye comparado con los no atrésicos, según la etapa de crecimiento (Scott y col., 1980b⁹).

Tsonis, y col.⁴⁷, trabajaron con folículos de borrego y encontraron que el contenido de inhibina variaba con el volumen de fluido folicular y el diámetro del folículo pero no con el grado de atresia, atribuido por criterios morfológicos. En folículos > 3.5 mm, la actividad aromática en las células de la granulosa o la concentración de estradiol 17-Beta en el fluido folicular estuvieron altamente relacionados tanto con el contenido de inhibina como con la concentración. Si se consideran pocos cambios en la concentración de inhibina por célula de granulosa, el contenido de inhibina podría esperarse aumentara con el diámetro de folículos sanos en crecimiento hasta la curva de LH y la luteinización, mientras que la concentración de inhibina en los folículos no se alteraría tan dramáticamente debido al incremento en el volumen del fluido antral.

Por otro lado, los trabajos realizados por Henderson y col. 48 también señalan que la producción folicular de inhibina y la actividad aromática de las c.g. están influenciadas por el tamaño y salud foliculares. La creciente capacidad de las células de la granulosa de folículos sanos para producir inhibina conforme aumenta su diámetro podría

ser consecuencia de una acción previa de gonadotropinas sobre los folículos.

En éstos y otros trabajos realizados por el mismo grupo de investigadores⁴⁸ se señalan tres puntos importantes sobre la influencia de la LH y la FSH en la producción de inhibina:

1.- La LH estimularía la producción de andrógenos tecaes, que a su vez, aumentaría la capacidad de las c.g. para producir inhibina.

2.- La FSH aumentaría directamente la producción de inhibina de las c.g. de folículos sanos.

3.- En contraste, la LH no estimula la producción de andrógenos en teca interna de folículos atrésicos ni la FSH estimula la producción de inhibina de células de granulosa de folículos atrésicos.

2.5.6.- Inhibina y su relación con la edad.

Por otra parte, Ultee-van Gessel y col.⁴⁹ estudiaron la influencia de la hemicastración neonatal en el eje pituitario-testicular. Para determinar a que edad se vuelve aparente el papel de la inhibina testicular en la regulación de la secreción de FSH, trabajaron con grupos de ratas machos hemicastrados en el primer día de vida, y se investigó la función pituitaria y testicular in vitro a los 21, 42 y 63 días de edad. La producción de hormonas por la glándula pituitaria, las células de Leydig y las células de Sertoli se estudió por separado en un ensayo in vitro para evitar interacciones entre los componentes del eje. Estos estudios confirmaron que la hemicastración neonatal causa una hipertrofia testicular compensatoria, observada a los 21 días de edad y que el peso de los testículos remanentes en ratas hemicastradas de 42 y 63 días de edad aumenta significativamente al compararlos con los control. La extirpación de los testículos en el primer día de vida afecta la retroalimentación negativa de las gónadas en la secreción de la pituitaria y se refleja en altos niveles de FSH en ratas de 21 y 63 días de edad. Los niveles plasmáticos de LH se elevaron sólo en ratas de 21 días de edad, en las demás edades se encontraron niveles normales de ésta hormona; posiblemente debido a que a los 21 días se necesita mayor cantidad de LH para estimular la población más pequeña de células de Leydig a fin de obtener concentraciones normales de testosterona periférica en animales hemicastrados.

La liberación espontánea de FSH inducida por LHRH en glándulas hemipituitarias in vitro aumentó notablemente en el día 21 de edad en el grupo experimental; en cambio, en animales más grandes la secreción basal de FSH e inducida por LHRH fué similar en los grupos controles y experimentales. Esto indica una menor secreción de inhibina de los testículos remanentes en las ratas hemicastradas de 21 días de edad. Las

células de Sertoli de ratas hemicastradas neonatalmente de mayor edad, no secretaron más inhibina comparadas con los grupos control; mientras que en las ratas inmaduras castradas neonatalmente la secreción de inhibina in vitro es mucho menor que en los grupos control.

El aumento de los niveles periféricos, la secreción in vitro y el contenido de FSH de la pituitaria después de la hemicastración neonatal, que resultó mayor en el día 21 de edad que en las demás edades estudiadas; indicó que la inhibina juega un papel menor en la regulación de la retroalimentación de la secreción de FSH en animales de mayor edad; la testosterona podría ser el factor más importante en ésta regulación. En conclusión Ultee-van Gessel y col.49, hacen ver que la hemicastración neonatal causa un aumento selectivo en el FSH plasmático de ratas inmaduras y adultas, más no concluyen acerca de la importancia de la inhibina en la secreción de FSH en animales mayores debido al crecimiento hipertrófico de los testículos y a la mayor secreción hormonal de las células testiculares (Tabla 7).

2.5.7.- Localización de ARN mensajero de inhibina.

En estudios realizados por Einspanier y col.50, se reportan por primera vez niveles detectables de ARNm de relaxina, oxitocina, prolactina e inhibina en tipos celulares ováricos, células de granulosa y luteales, indicando el potencial de éstas para producir las hormonas respectivas. Los niveles de ARNm para la oxitocina y prolactina fueron más bajos en células de granulosa porcinas que en células luteales, sugiriendo menor producción en el tipo de células originales. Posiblemente actúan en forma paracrina, afectando la esteroidogénesis. La oxitocina no modificó la secreción de progesterona de las células de la granulosa y la prolactina tuvo un fuerte efecto estimulador; las diferencias parecen indicar un alto grado de especificidad.

Otros estudios utilizan la técnica de hibridación histoquímica^a (ver apéndice) para investigar la distribución celular del ARNm de las subunidades alfa y beta-A de la inhibina en ovarios de vacas 51. La localización citológica del ARNm para las subunidades alfa y beta-A de la inhibina en folículos ováricos apoya los resultados de estudios previos que identificaron a las células de la granulosa como el sitio de producción de inhibina. Este estudio también evidencia la regulación independiente de la producción de la subunidad de inhibina, demostrando la expresión de la subunidad alfa del ARNm en una mayor población de células que la subunidad Beta-A.

Los niveles aumentados de ARNm para las subunidades^s alfa y beta-A conforme aumenta el diámetro folicular confirman la correlación entre el contenido de inhibina y el diámetro folicular 51. Los folículos antrales y preantrales pequeños (<1.4 mm) contienen ARNm para las subunidades de

TABLA 7

EXPERIMENTO ULTEE - VAN GESSEL Y COL. (1985)

EXPERIMENTO	DIAS DESPUES DE LA HEMICASTRACION		
	21	42	63
RATAS MACHOS HEMICASTRADOS DESDE EL 1 ^{ER} DIA DE VIDA IN VIVO	HIPERTROFIA TESTICULAR	AUMENTO DEL PESO TESTICULAR	
	AUMENTO DE FSH AUMENTO DE LH	MAYOR LONGITUD DE TUBULOS SEMINIFEROS MAYOR NUMERO DE CELULAS DE SERTOLI MAYOR NUMERO DE CELULAS ESPERMATICAS	
		---	AUMENTO DE FSH
		NIVELES DE LH NORMALES	
LIBERACION ESPONTANEA DE FSH EN HEMIPITUITARIAS (INDUCIDA POR LHRH) IN VITRO	AUMENTO EN LA LIBERACION DE FSH	SECRECION BASAL DE FSH E INDUCIDA POR LHRH SIMILAR AL GRUPO CONTROL	
CONCLUSION	MAYOR SECRECION DE INHIBINA POR TESTICULO REMANENTE	LA INHIBINA NO JUEGA UN PAPEL IMPORTANTE EN LA RETROALIMENTACION EN ESTAS EDADES	

inhibina, ésto sugiere que los folículos de éste tamaño son capaces de secretar inhibina. En varios de los folículos grandes examinados (1.0-3.0mm) no se localizó la prueba alfa en las células de granulosa y teca; ni la prueba beta-A en las primeras, debido a la atresia de algunos de éstos. Las observaciones realizadas in situ en folículos de ganado sugieren que la expresión de la subunidad Beta-A sería el paso limitador en la formación del dímero de la inhibina.

La creciente intensidad en las pruebas de hibridación de ADNc en células de granulosa antrales en algunos folículos, propone la existencia de subpoblaciones de éstas dentro de un determinado folículo⁵¹. La localización preferencial de ARNm de inhibina en células de la granulosa antrales y su alta concentración en el fluido folicular indica que ésta proteína podría contribuir al microambiente del folículo. No se encuentra hibridación de pruebas de ADNc para ninguna subunidad de inhibina en el cuerpo lúteo de bovinos, probablemente su producción en éstos sea especie específica, ya que ⁵² han encontrado concentraciones séricas de inhibina elevadas en la fase luteal de humanos (McLachlan y col., 1987 51).

Turner y col.⁵² demuestran que la expresión de las subunidades de ARNm de inhibina alfa, beta-A y beta-B está bajo control directo de la FSH. Señalan una diferencia intersexual en el control hormonal de la producción gonadal de inhibina. Las células de Sertoli, homólogos testiculares de las células de la granulosa, también las expresan; sin embargo, la producción de la subunidad alfa de ARNm en células de granulosa y Sertoli es estimulada directamente por FSH; mientras que la producción de las subunidades Beta-A y Beta-B del ARNm por las células de Sertoli no presenta respuesta a la FSH ni in vivo ni in vitro (Feng y col., 1988; Keinan y col., 1989 52). Debido a ésto la FSH causa una expresión diferencial en las subunidades de inhibina de células de Sertoli, en tanto ejerce una inducción coordinada sobre las subunidades de ARNm de inhibina en células de granulosa. También se observó la inducción por estradiol de las subunidades de ARNm alfa y beta-B en ausencia de FSH. El estudio sugiere que los genes codificantes de las tres subunidades están bajo control endócrino primario de FSH y bajo un control secundario a nivel parácrino mediado por estrógenos.

D'Angostino y col.⁵³ observaron que la ovariectomía unilateral (ULO) resultó en un aumento significativo de los niveles de FSH sérico, sin cambios detectables en la concentración de LH sérico. El reclutamiento folicular fué observado a las 24 horas como un aumento en el número de folículos ováricos con diámetro mayor de 350 micras. Cada folículo reclutado recientemente (FRR) mostró niveles reforzados tanto de subunidades de ARNm de inhibina alfa como de beta-A en relación a los folículos no reclutados; concluyen que los cambios temporales en las concentraciones de FSH sérico podrían ser importantes en la regulación del ARNm de inhibina en los folículos en desarrollo.

Se observaron 2 clases de folículos sanos madurando a las 24 horas de la ULO; una hibridación más intensa se detectó en la clase más grande de folículos, previamente reclutados durante la elevación secundaria de FSH, aproximadamente 24 horas antes del comienzo del estudio (FRR-1)53. La segunda clase incluyó folículos más pequeños reclutados como resultado de la ULO (FRR-2). La intensidad de hibridación fué mayor en FRR-1 que en FRR-2 en la mayoría de los folículos. Los FRR-1 se expusieron a gonadotropinas aproximadamente 24 horas más que los FRR-2 después del reclutamiento, lo cual influiría para los niveles reforzados de ARNm de inhibina en los folículos reclutados previamente (FRR-1). La intensidad de hibridación observada en FRR-1 reflejaría variaciones en madurez que originan una respuesta diferencial a las gonadotropinas circulantes. Además, se observaron folículos pequeños (< 350 micras), que hibridizaron para la prueba alfa, pero no para la Beta-A, por lo cual sugieren una regulación diferencial de los genes de inhibina antes del reclutamiento que permita una expresión continua del ARNm alfa a bajos niveles en folículos antrales.

Por otra parte, se sabe que la cicloheximida (CHX) mimetiza la acción de la inhibina en la secreción basal de FSH en cultivo de células de pituitaria en monocapa así como la secreción pulsátil de GnRH estimulada por FSH y LH en un sistema de perfusión de pituitaria (Fukuda y col., 1987 y Jakubowiak y col., 1989 54). En éste estudio, Attardi y col.54 compararon los efectos de la CHX e inhibina (pSCI para células de Sertoli de primates) sobre la secreción de gonadotropinas y sobre la subunidad de los ARNm de éstas en cultivos de células de pituitaria en monocapa de ratas machos adultos. Encontraron que, tanto el pSCI como la CHX inhiben la liberación tónica de FSH, disminuyen los niveles de ARNm de FSH beta y la síntesis de la subunidad beta de la FSH, ésto indica que la biosíntesis de FSH está fuertemente ligada a su liberación basal. Aunque la CHX, al igual que la inhibina, actúa como un inhibidor selectivo del ARNm de la FSH, sus efectos fueron más lentos y menos rápidamente reversibles que los de la inhibina. Un activador reversible de la transcripción de FSH beta o de la estabilidad del ARN está involucrado en la regulación de concentraciones fijas de éste ARNm. El hallazgo de que la CHX limita el efecto de la inhibina sobre el ARNm de la FSH beta después de dos horas, indica que una síntesis de proteína subsecuente es también requerida para la completa expresión de los efectos supresores de la inhibina. Los efectos fueron completamente diferentes a las 6 horas, lo cual propone que la acción de la inhibina involucra por lo menos dos factores lábiles.

2.5.8.- Relación de la inhibina con factores de crecimiento.

Factor epidérmico de crecimiento.

El factor epidérmico de crecimiento (FEC) se conoce por su acción mitogénica, aunque también puede aumentar la síntesis de ADN, ARN y proteína en varias células.

Franchimont y col.55 examinan su efecto sobre la proliferación celular, la síntesis de proteína y la producción de progesterona e inhibina por células granulosa antrales de bovino y demuestran su capacidad para aumentar la síntesis de ADN en células de granulosa bovinas; además confirman su efecto inhibitorio en la producción de progesterona por éstas células en relación dosis-respuesta. El FEC suprime la secreción de inhibina después de 48 horas de incubación, a las 72 horas no se observa ningún efecto probablemente relacionado a la disminución de la producción de progesterona; sugiriendo que podría tener dos efectos: uno directo, suprimiendo LA PRODUCCIÓN DE INHIBINA Y OTRO INDIRECTO, resultante de la disminución de la luteinización y de la producción de progesterona.

Factor de diferenciación eritroide.

Hasegawa y col.56, demuestran la capacidad del factor de diferenciación eritroide (FDE) en la inducción de receptores para FSH en células de granulosa de rata; también examinan los efectos de la inhibina, factor transformador de crecimiento (FTC-beta), factor epidérmico de crecimiento (FEC) e insulina en la inducción de receptores para FSH en presencia o ausencia del factor de diferenciación eritroide. Este estudio proporciona elementos para un posible papel del FDE como inductor de los receptores para FSH. La inhibina no produjo la inducción del receptor de FSH en presencia o ausencia del FDE, lo cual apoya la teoría de que la inhibina actúa primariamente en las células de pituitaria, suprimiendo la secreción de FSH; el TGF-beta tampoco tiene efecto sobre la inducción de receptores para FSH aunque redujo ligeramente el número de receptores inducidos por el FDE. EL FEC NO TIENE EFECTO SOBRE LOS RECEPTORES PARA FSH EN CONDICIONES BASALES pero antagoniza la acción del FDE.

Factor transformador de crecimiento beta.

Los estudios in vitro realizados en 1987 confirman que la diferenciación de células de granulosa en cultivo estimuladas por FSH puede ser regulada por factores de crecimiento. Es posible que los miembros de la familia de éstos genes jueguen un papel como moduladores autocrinos o

parácrinos en el crecimiento celular ovárico y/o en la diferenciación 57, debido a la homología entre las secuencias nucleotídicas de la inhibina y el FTCbeta. En éste estudio se evaluaron los efectos del FTCbeta con y sin FSH de acuerdo a varios parámetros de crecimiento y diferenciación en cultivos de células de granulosa de rata. Este estudio es el primero en demostrar que el FTCbeta refuerza la inducción de receptores de LH estimulada por FSH y la producción de progesterona de células de la granulosa de forma dosis dependiente, sin relación a cambios en el cAMP intra o extracelular. La producción de inhibina por células de la granulosa es estimulada por FSH, debido a las similitudes entre la inhibina y el FTCbeta y al hecho de que la mayoría de las células contienen ARNm para FTCbeta; se especula que éste podría ser producido por las células de la granulosa y regulado por gonadotropinas y esteroides. El efecto combinado de los genes miembros de la familia FTCbeta/inhibina sobre la modulación de la FSH probablemente constituya uno de los mecanismos de la selección del folículo.

Zhang y col. 58 también examinaron la influencia del FTCbeta sobre la producción de inhibina basal y estimulada por FSH y la inhibición de la producción de inhibina por el FEC, utilizaron un cultivo in vitro de células de granulosa; mediante el cual demostraron que el FTCbeta estimula directamente la producción de inhibina bajo condiciones basales y estimuladas por FSH. Del mismo modo, parece aumentar los efectos inhibidores del FEC sobre la producción de inhibina inducida por FSH, proporcionando evidencia adicional para la acción reguladora del FTCbeta en la función endócrina de las células de la granulosa y para su interacción con las gonadotropinas y otros factores de crecimiento dentro del folículo ovárico. El FTCbeta aumentó la producción de inhibina mientras que el FEC la inhibió; al agregar éstos factores al mismo tiempo, se redujo su producción, y la acción aditiva del FTCbeta y la FSH la suprimió. Zhang y col.58 hallaron que el FTCbeta propicia una acción supresiva del EGF sobre la producción de inhibina, lo anterior confirma lo reportado por Feng y col. (1986) de que el FTCbeta produce un aumento en los efectos inhibidores del EGF sobre la producción de cAMP y la expresión de los receptores de LH durante el desarrollo de las células de la granulosa. Otros autores -citados por Zhang y col.58- demostraron que el FTCbeta tiene una homología estructural con la activina (Ling y col., 1986 58) y que ambos tienen efectos estimuladores sobre la secreción de FSH de la pituitaria y sobre la actividad aromática de las células de la granulosa, pero muestran una acción diversa sobre la producción de progesterona (Ying y col., 1986; Hutchinson y col., 198758). Los experimentos realizados indican que EL FTCBETA TAMBIÉN regula la producción de inhibina aunque aún no se sabe si ésta es capaz de regular la producción del FTCbeta.

Somatomedina C.

Por otra parte, se ha examinado la posibilidad de que la Somatomedina-C (Sm-C), un factor de crecimiento parecido a la insulina, junto con la FSH controlen la secreción ovárica de inhibina 59. Demostrando que las células de la granulosa son la fuente principal de inhibina ovárica en ratas y que la producción de inhibina in vitro por éstas células está bajo el control directo de la FSH y la Sm-C. Ambos estimulan la producción de inhibina de forma dosis y tiempo-dependientes. Se observó un efecto sinérgico cuando éstas dos sustancias fueron agregadas en combinación al medio de cultivo. La actividad inhibidora de FSH medida en el medio de células de granulosa se neutralizó con el uso de un anticuerpo monoclonal cultivado para inhibina bovina purificada. Una vez más se confirman y extienden observaciones previas de que una sola dolo contenido de inhibina. Finalmente, se cree que la Sm-C tiene un papel autocrino y/o parácrino dentro de los folículos de ratas.

2.6.- ACTIVINA Y FOLISTATINA, SU RELACION CON INHIBINA.

En la revisión realizada por Rivier y col.⁷ se menciona que Vale y col (1986⁷) encontraron una proteína estimuladora de FSH, independiente de GnRH, constituida por un homodímero de la cadena beta-A de la inhibina. Por otro lado, también se cita el hallazgo de un heterodímero de la cadena beta-A beta-B de la inhibina, con la misma actividad (Ling y col., 1986⁷), a la que se llamó activina. De éste modo, las gónadas contienen dos entidades diferentes pero relacionadas estructuralmente, que inhiben y estimulan la secreción de FSH. parece ser que los dímeros beta actúan a través de receptores diferentes de aquellos moduladores de la acción de la GnRH⁷, pues la FRP no induce la liberación de LH y los antagonistas de GnRH (que bloquean completamente la secreción de gonadotropinas inducida por GnRH) no alteran su actividad.

McLachlan y col.⁶⁰ utilizaron activina A humana recombinante para examinar si ésta modula la liberación de gonadotropinas en el macaco macho adulto. Reportaron los efectos de la infusión de Activina-A, durante dos días, sobre la secreción de testosterona y gonadotropina estimuladas por GnRH. La evidencia preliminar sugiere un papel fisiológico para la activina A circulante, la infusión de ésta sustancia aumenta los niveles basales de FSH sérico y la respuesta de la FSH y la LH a la GnRH. Lo anterior apoya el papel fisiológico de la activina como señal endócrina reguladora de la secreción de gonadotropinas en el macaco macho.

En 1991 Nakatani y col.⁶¹, reportan los cambios cíclicos del ARNm de la folistatina y su proteína en el ovario de la rata durante el ciclo estral. Estos datos apoyan la hipótesis de que la producción del ARNm de folistatina y su proteína en el ovario de rata cambian de modo temporal y específico según el tejido a lo largo del ciclo estral; durante el cual el ARNm de la folistatina parece estar presente sólo en las células granulosas y tecaes en diferenciación y ausente cuando éstas células experimentan atresia y luteolisis, respectivamente. El aumento en la folistatina inmunoreactiva sólo aparece en los folículos dominantes, la expresión de ésta proteína podría intervenir en los mecanismos de selección y atresia de los folículos.

La primera muestra del mensaje de folistatina en el desarrollo folicular⁶¹ se encuentra en las células de la granulosa de folículos secundarios y terciarios, la presencia del ARNm en éstos (300-400 Micras de diámetro) apoya la idea de que la expresión del ARNm de la folistatina podría ser consecuencia de la entrada de un folículo primordial al grupo de folículos en crecimiento. El mecanismo de aumento de la folistatina se desconoce pero la FSH juega un papel importante. Se encontró que la folistatina siempre se localiza en las células de la granulosa de los folículos dominantes; y coincide con el periodo de selección de los folículos dominantes que ovularan el próximo ciclo, sugiriendo que una de las posibles funciones de la folistatina sea prevenir la atresia, uniéndose a la molécula de activina. Por otra parte se demuestra la presencia de la

folistatina y su ARNm en cuerpos lúteos durante el estro, indicando un posible papel de ésta en la luteinización y su potencial para una estimulación autócrina o paracrina de la síntesis de progesterona en células luteales de rata.

Existen también algunas diferencias importantes entre la expresión de la folistatina y de las subunidades de la inhibina Beta-A y Beta-B ⁶¹:

1) en todos los folículos en desarrollo (sanos o atrésicos) hay una expresión más generalizada de ARNm de folistatina

2) las señales para el mensaje de folistatina y su proteína continúan siendo intensos en los folículos preovulatorios y cuerpos lúteos después de la elevación de LH/FSH

3) el ARNm de folistatina y su proteína no parecen estar controlados coordinadamente, excepto en los folículos seleccionados, por lo cual se propone un mecanismo de control distinto para regular la expresión de la folistatina y la inhibina. Se pueden concluir dos puntos importantes; el ARNm de folistatina parece ser expresado en las células de la granulosa de todos los folículos en desarrollo y cuerpos lúteos y que la folistatina parece estar localizada en las células de granulosa y luteales de los folículos dominantes, volviéndose detectable al tiempo de la selección.

Se ha tenido éxito en preparar un antisuero específico para activina utilizando conejos inmunizados con una mezcla de factor eritroide de diferenciación (EDF) y "polyvinyl pyrrolidone" (PVP) y se ha establecido un RIA para la activina A/EDF. Shintani y col.⁶² describen éste procedimiento (ver apéndice) y la medición de sus concentraciones en varios fluidos biológicos y extractos de tejido; afirman que es posible que haya reactividad cruzada con otras activinas (activina AB y activina A) dada su homología estructural pero no lo examinan en éste trabajo, sin embargo el RIA parece ser útil en la diferenciación de activina nativa e inhibina.

Los experimentos realizados con extractos de placenta humana y fluido amniótico⁶² mostraron una inmunoreactividad de activina A/EDF relativamente alta (174 + 11 ng/g peso húmedo y 63.9 + 5.0 ng/ml, respectivamente), lo que implica un papel inmunoreactividad baja de activina A/EDF (8.7 - 14.2 ng/g peso húmedo), excepto por una inmunoreactividad un poco alta en la glándula pituitaria (70 ng/g peso húmedo). Las curvas de administración exógena de activina A/EDF en plasma indican una vida media relativamente corta ($t_{1/2} = 14$ min).

Para determinar si la inhibina y la activina juegan un papel en el desarrollo embrionario de mamíferos Roberts y col.⁶³, examinaron la ontogenia de la localización de las subunidades de mARNs de la inhibina en embriones de rata entre los días 12 y 20 post-coitum (p.c.). La primera localización de la expresión de ARNm Beta-A en tejidos de embriones fué en el corazón a los 12 días p.c. Conforme se desarrollaba el embrión, la señal se encontró en los cojinetes cardíacos y en vasos más grandes. El mensaje

inhibina/activina beta-A es expresado en la dermis durante las etapas tempranas del desarrollo de la piel y en el cabello y los folículos pilosos de la cara durante las etapas tempranas y tardías de la maduración folicular. El producto del gene de la subunidad beta-A inhibina/activina, que muy probablemente sea activina A; podría influenciar el desarrollo coordinado del cartilago y el hueso, así como el de los dientes, tendones, folículos pilosos, cojinetes cardiacos, y grandes vasos; en cooperación con otros miembros de la familia de los TGF-beta.

Las subunidades de ARNms inhibina/activina beta-A y beta-B se localizaron en diferentes áreas del cerebro embrionario⁶³; el mensaje beta-A se observó primero en el cuerpo estriado. La activina es el único miembro de la superfamilia de TGF-beta que influye en la viabilidad de las células nerviosas y en el que se han encontrado ARNms en tejidos embrionarios de cerebro. Los ARNms de inhibina/activina alfa y beta-B fueron detectados en las gónadas a los 14 días p.c., que es el tiempo de la diferenciación sexual de las gónadas. El mensaje de la subunidad alfa se expresa en la teca interna y en las células intersticiales glandulares (análogas a las dichas células en el testículo), en las células de la granulosa; los mensajes de las subunidades beta-B y beta-A solo se observan sobre las células de la granulosa.

La presencia de las subunidades del ARNm de inhibina y activina en las gónadas embrionarias en patrones similares a los observados en ovarios juveniles y maduros y en testículos⁶³, sugiere que los productos genéticos podrían jugar un papel hormonal en embriones de etapas tardías. Sin embargo, como los mensajes estuvieron presentes cerca del tiempo de diferenciación gonadal y como la activina-A afecta el crecimiento de las células gonadales en cultivo, las proteínas inhibina/activina regularían tales procesos.

Para caracterizar la naturaleza del complejo de unión activina A/folistatina se utilizó una técnica "double ligand-blotting"⁶⁴, con ésta se demostró que la activina-A tiene al menos dos sitios de unión para la folistatina; an tanto la inhibina-A tiene sólo uno. Por ésto, la activina-A y la folistatina pueden considerarse reguladores potenciales positivos y negativos en los principales sistemas biológicos. De la misma manera, la inhibina-A y la folistatina podrían interactuar una con otra a través de su unión con la subunidad beta. Sin embargo, a pesar del complejo activina-A/folistatina, la asociación de la inhibina-A y la folistatina no neutralizaría su actividad mutua.

Experimentos realizados por DePaolo y col.⁶⁵ comparan los efectos de la folistatina purificada de porcino y la inhibina-A recombinante humana sobre la secreción de FSH y LH de la pituitaria de ratas después de una semana de ovariectomizadas; también determinan si la folistatina y la inhibina actúan en la glándula pituitaria anterior *in vivo* para alterar la liberación de gonadotropinas. Los resultados muestran claramente la supresión de los niveles de FSH sérico

en animales vivos mediante la administración de folistatina purificada o inhibina. Después de su inyección a ratas OVX, ambos polipéptidos gonadales suprimieron la hipersecreción de FSH de forma dosis-dependiente con la supresión máxima de cada sustancia entre las 4 y 6 horas después de su administración, la potencia biológica de la folistatina fué de aproximadamente 1/5 de la potencia de la inhibina.

Se podría postular que la supresión de los niveles de FSH circulante por el pFF, durante las 9-10 horas después de la inyección, se debe principalmente a la inhibina, mientras que la disminución de la supresión de los niveles de FSH después de las 10 horas podría atribuirse a la folistatina. Esta acción supresora de la folistatina es mediada por la unión de la activina producida localmente en la glándula pituitaria, neutralizando las acciones estimuladoras de FSH de la activina. En contraste a su influencia sobre los niveles de FSH sérico, ni la folistatina ni la inhibina ejercieron un efecto estadísticamente significativo en las concentraciones séricas de LH en las ratas OVX⁶⁵.

Nakamura y col.⁶⁶ investigaron el efecto de la folistatina sobre la diferenciación de las células de la granulosa inducida por activina. Estas células se obtuvieron de ratas hembras inmaduras de 21-23 días de edad, pretratadas subcutáneamente con DES (dietilstilbestrol) durante 4 días. Después de 72 horas en cultivo la concentración de progesterona e inhibina se determinaron por RIA usando antisuero de conejo cultivado contra inhibina bovina de 32kDa. Las cg se cultivaron en medio con activina, folistatina o una combinación de ambas, durante 60 horas y luego se fotografiaron. Los sitios de unión de LH/hCG y FSH se midieron cuantificando la unión células [¹²⁵I]hCG y [¹²⁵I]eFSH, respectivamente. Los resultados indican que la activina puede actuar sobre las células de la granulosa directamente y cambiar su morfología celular; mientras que la folistatina inhibe el cambio morfológico inducido por la activina y no tiene efecto directo sobre la morfología celular. Al examinar el efecto de la folistatina en la inducción de los sitios de unión a FSH por activina se encontró, después de un período de cultivo de 36 horas, una unión específica de FSH en las cg. Cuando se agregó activina al cultivo la unión aumentó de forma dosis-respuesta; en cambio, cuando se le agregó folistatina se produjo una disminución dosis-respuesta en los sitios de unión estimulados por activina.

En presencia de FSH la activina estimuló la expresión de los sitios de unión para hCG/LH⁶⁶. Cuando los cultivos se trataron con diferentes concentraciones de folistatina el nivel de unión de hCG/LH estimulado no se afectó, sino hasta que la concentración de folistatina alcanzó un nivel superior al del efecto estimulatorio de la activina, en cual éste fué suprimido abruptamente. El refuerzo de la producción de la inhibina por activina se bloqueó por la adición de folistatina. En presencia de FSH la activina aumentó la producción de inhibina por las cg; y el aumento fué inhibido

por la folistatina de forma dosis-respuesta. Los resultados sugieren que la proteína de unión activina/folistatina se une a la activina estequiométricamente para suprimir la diferenciación de las células de la granulosa inducida por activina *in vitro* y que la folistatina no tiene un efecto directo sobre las reacciones independientes de activina.

Xiao y col.⁶⁷, utilizando un método similar al de Nakamura y col.⁶⁶, confirmaron que la activina aumenta dramáticamente los niveles de receptores a FSH y que el efecto estimulador de la activina sobre éstos receptores se suprime por la folistatina. En presencia de FSH la activina ejerció una acción bifásica con una ligera caída en los sitios de unión disponibles para FSH en dosis bajas y un incremento con dosis altas (> 30 ng/ml). En contraste, la folistatina previno la disminución de los sitios de unión a FSH inducida por éste. El significado funcional de éstos resultados se explicó posteriormente por que el tratamiento previo con activina, no con folistatina, aumentó la respuesta de las células de la granulosa tanto a FSH como a LH, demostrado por un aumento en la actividad aromática, en la producción de progesterona y en la de inhibina.

La observación de que la folistatina no ejerce efecto sobre la unión de FSH basal pero invierte la acción estimuladora de la activina sobre la unión a FSH en ausencia de éste⁶⁷, concuerda con la hipótesis de que la folistatina podría actuar como un antagonista de la activina uniendo activina endógena e inhibiendo su acción. El hecho de que el tratamiento previo con folistatina no cambiara la respuesta de las células a FSH y LH confirma que la folistatina no tiene efecto sobre la unión a FSH y no cambia el número de receptores a LH. Se desconoce la razón de una reducción posterior de la unión a FSH por dosis bajas de activina en presencia de FSH, pero podría deberse a que ésta aumentara el recambio de los sitios de unión a FSH en las cg originando la reducción de éstos. El ligero aumento de los sitios de unión a FSH causado por dosis crecientes de folistatina podría resultar del antagonismo sobre los efectos de dosis bajas de activina endógena en los sitios de unión en presencia de FSH.

La activina actuaría uniéndose a su propio receptor, por fosforilación del sustrato e inducción de la diferenciación de las cg mediante un aumento en el número de receptores a gonadotropinas y, subsecuente en la respuesta de las células a las gonadotropinas⁶⁷. Se propone que la folistatina está actuando como una proteína de unión a activina para regular la acción foliculogénica de ésta. Xiao y col. (datos no publicados) demostraron que la activina refuerza la expresión de ARNm de folistatina inducida por FSH en cg de rata *in vitro*, lo cual proporciona la base para un sistema de retroalimentación de ciclo corto, mientras que la FSH podría estimular la producción tanto de activina como de folistatina y ésta última regular las acciones locales de la activina, interviniendo en la selección de folículos y en el establecimiento de la dominancia.

3.- ACTIVIDAD DE LA INHIBINA EN CICLOS ESPONTANEOS E INDUCIDOS Y SU RELACION CON LA MADURACION DEL OVOCITO.

3.1.- PRODUCCION EN RELACION A CELULAS DE LA GRANULOSA IN VIVO.

La presencia de éste compuesto en fluido folicular humano fué determinada por Chappel y col.⁶⁸ utilizando dos modelos; uno *in vivo*, con monas rhesus ovariectomizadas y otro *in vitro*, basado en un sistema de cultivo de células de pituitaria. Este estudio es el primero en demostrar la presencia de la inhibina en el fluido folicular humano en ciertas etapas del ciclo menstrual; sugiriendo que ésta podría estar actuando en etapas específicas del ciclo reproductivo de mamíferos.

Al respecto, Navot y col.⁶⁹ utilizaron una prueba de citrato de clomifeno para determinar la fertilidad de 51 mujeres de 35 años o mayores. Encontraron que la fecundidad se puede predecir en base a la respuesta de las gonadotropinas a la estimulación con éste compuesto. Los resultados favorables del aumento de hMG/hCG en la ovulación, sugieren que un ciclo hiperestimulado podría salvar las anomalías no definidas en éstas mujeres, permitiendo el embarazo cuando el ciclo natural ha declinado. Durante las etapas tempranas de la perimenopausia hay un aumento gradual en el nivel de las gonadotropinas séricas por la disminución del número de ovocitos y folículos; la elevación de la FSH sucede tempranamente y es mayor que la de LH. En contraste a lo anterior, cuando se administra citrato de clomifeno durante el período reproductivo, el aumento es más alto y más sostenido para LH que para FSH. Este patrón de respuesta de las gonadotropinas se asemeja al rango de FSH/LH perimenopáusico y podría ser atribuido a la disminución de la producción de inhibina ovárica. Esta última reduce las concentraciones de FSH plasmático, probablemente suprimiendo la liberación de FSH por la adenohipófisis. Al igual que las hormonas esteroides, la inhibina es secretada por las células de la granulosa, cuya capacidad secretora está fuertemente relacionada con la calidad del ovocito y la capacidad de fertilización, de manera que una disminución de ésta explicaría el disparo de FSH después del tratamiento con citrato de clomifeno. Si la capacidad para secretar inhibina esta relacionada con la calidad del ovocito, esto explicaría las reducidas oportunidades para concebir. Entonces, un tratamiento con citrato de clomifeno desenmascararía la falla inicial en un aparato folicular aparentemente normal, asesorando las decisiones clínicas.

Para caracterizar los niveles de inhibina en el ciclo menstrual normal Bremner y col.⁷⁰ estudiaron 40 mujeres de 21-33 años de edad. Se tomaron muestras de sangre diarias a todas las pacientes durante un ciclo menstrual completo,

éstas muestras se probaron para LH, FSH, estradiol, progesterona e inhibina. De éstos estudios se concluye que el folículo maduro secreta tanto estradiol como inhibina, mientras que el cuerpo lúteo secreta progesterona, inhibina y estradiol y que los niveles de inhibina en la sangre periférica de mujeres normales representa una agregación a la cantidad producida por el folículo maduro y a la cantidad producida por el cuerpo lúteo. Además, para determinar el papel del cuerpo lúteo y el control hormonal de su función, se administró un antagonista de GnRH durante 3 días a mujeres normales, comenzando en el día 6 de la fase luteal. La dosis más alta del antagonista de GnRH permitió una inhibición confiable de la secreción de LH, FSH, progesterona e inhibina. El reemplazo de la LH en ésta situación, en forma de hCG, permitió el rescate del cuerpo lúteo; incluyendo la secreción de inhibina. Se concluye con ello, que la inhibina producida por el cuerpo lúteo esta, predominantemente, bajo el control de LH. Por otro lado, también han iniciado estudios sobre la inhibina como un marcador para defectos de la función ovárica; los resultados encontrados en mujeres con defectos en la fase luteal, indican que los niveles de inhibina en sangre periférica durante la fase luteal tardía son más bajos que los encontrados en mujeres normales.

Por otro lado, Khan y col.⁷¹ describen el aislamiento de una "proteína inductora de la esteroidogénesis" (PIE) hasta su aparente homogeneidad y miden sus efectos en la producción de esteroides *in vitro* en células ováricas. Señalan que ésta proteína es diferente a otros factores parácrinos o de crecimiento que se sabe estimulan la esteroidogénesis en las células de Leydig, es distinta de la albúmina y que las células lúteas de la granulosa son la fuente de ésta proteína, capaz de estimular la producción de esteroides sin involucrar al cAMP. El experimento se realizó utilizando mujeres que habían sido tratadas con hMG y hCG para inducir el crecimiento folicular y la ovulación (ver apéndice). Se encontró una actividad parecida a LH, quizá debida a la PIE; que probablemente, sea requerida para amplificar los efectos de la LH sobre el folículo preovulatorio para reforzar la producción de esteroides o para la subsecuente luteinización de las células de la granulosa. También podría regular el cambio en las células de la granulosa de células secretoras de estradiol a secretoras de progesterona, ya que; estimulando la producción de pregnenolona, sin tener ningún efecto sobre la actividad aromática causaría una acumulación selectiva de progesterona que cambiaría la proporción progesterona/estradiol. Se concluye que los ovarios humanos secretan una proteína durante la maduración folicular preovulatoria que actúa como estimulador de la esteroidogénesis.

Al respecto, Baird y col.⁷² encontraron que la inhibina se origina principalmente en el ovario, siendo probable que muchos folículos antrales contribuyan a su secreción durante la fase folicular. Los factores que intervienen en la producción de inhibina por las células de la

granulosa son poco claros, mientras la FSH induce la expresión del ARNm para las subunidades alfa y beta de la inhibina, tanto *in vivo* como *in vitro*, no se sabe que determina su liberación de la célula o del folículo intacto (Rivier y col., 1989⁷²).

3.1.1.- Características moleculares de la inhibina humana.

En un intento para identificar las formas nativas de inhibina, presentes en el fluido folicular y en plasma venoso humano no afectado por manipulaciones químicas anteriores, Baird y col.⁷² separaron inhibina por filtración en gel usando una matriz gel de Sefacril de alta resolución, seguida de la identificación de las formas inactivoas y bioactivas de la inhibina de diferentes tamaños moleculares. La bioactividad se midió usando células de pituitaria dispersas de borrego y los resultados se expresaron en términos de U/L de un estándar de fluido de red de testis de ovino (FRT_O) con una potencia asignada de 1 U/mg. Se usaron 2 antisueros para monitorear la inactivoactividad; un antisuero cultivado en conejos contra la inhibina de bovino de 32 kD, que ha sido usado como base de estudios heterólogos en el hombre y otras especies; éste antisuero reconoce la inhibina intacta y moléculas precursoras más grandes pero no reconoce la subunidad alfa libre. El segundo antisuero (Y29) cultivado contra la secuencia peptídica 1-23 N-terminal de la subunidad alfa de la inhibina humana, reconoce la subunidad alfa libre así como la inhibina intacta. En el fluido folicular humano se identificaron 2 picos inactivoactivos, correspondientes a un peso molecular aparente de 32 kD y 110 kD, que son biológicamente activos. En fluido folicular y en plasma no se encontró inactivoactividad de pesos moleculares menores de 30 kD, sugiriendo que en el humano, al igual que en el borrego, no se producen ni secretan cantidades significativas de la subunidad alfa libre en el folículo.

3.1.2.- Niveles de inhibina en relación a FSH y LH.

McLachlan y col.⁷³ reportan la PRIMERA demostración de que la inhibina circula en el plasma humano, estableciendo su naturaleza hormonal. La estimulación de inhibina por gonadotropinas exógenas durante la hiperestimulación ovárica sugiere que la FSH promueve la producción de inhibina ovárica, lo cual confirma su regulación por FSH, y su producción por las células de la granulosa. La cercana correspondencia entre las concentraciones de inhibina plasmática y estradiol junto con la correlación entre el pico de inhibina plasmática y el número de folículos detectados por ultrasonografía y el de ovocitos recuperados por laparoscopia, apoya el amplio concepto de que ambos son monitores del crecimiento

folicular. La inhibina representa una proteína indicadora de la función de las células de la granulosa, sus niveles caen después del medio ciclo y de la elevación de LH y estradiol, al momento de la luteinización del folículo.

Se sabe que la inhibina induce la retroalimentación negativa de la secreción de FSH, y que la FSH juega un papel en el reclutamiento y selección de los folículos⁷⁴. Sin embargo la función de la inhibina en el momento de la ovulación no ha sido aclarada. En mujeres, la actividad de la inhibina en fluido folicular disminuye al medio ciclo con el pico de FSH y LH durante el ciclo normal. En la vaca los niveles intrafoliculares disminuyen con el tamaño de los folículos (Franchimont y col., 1981⁷⁴). Estos resultados podrían explicar los bajos niveles de inhibición de la liberación de FSH observados en los fluidos preovulatorios humanos. La aparición de una elevación espontánea de LH no parece estar relacionada con niveles específicos de inhibina en el folículo estudiado. Es posible que la actividad total de inhibina producida por la secreción combinada de todos los folículos preovulatorios desarrollados en una mujer en particular pudieran actuar a nivel de pituitaria. Estos estudios demuestran que durante la ovulación; la actividad de la inhibina y los niveles foliculares de esteroides o gonadotropinas no son criterios adecuados para predecir el estado de los folículos para realizar una IVF. Aunque la inhibina no tiene un papel relevante en el período preovulatorio podría tener efecto en el crecimiento y atresia de los folículos de los ciclos siguientes.

Hillier y col.⁷⁵ realizaron estudios para obtener evidencia experimental de la producción de inhibina dependiente de hormonas, y para establecer la relación entre su producción por células de granulosa y la esteroidogénesis durante el desarrollo folicular preovulatorio en primates. Los resultados obtenidos proporcionan evidencia de que las células de la granulosa de éstos son sitios de producción de inhibina dependiente de hormonas. Encontraron que la hFSH induce la producción de la cadena alfa de inhibina en las células de la granulosa del Tití, proponiendo que los mecanismos de la biosíntesis de ésta en primates y no primates son similares.

La testosterona y el estradiol en concentraciones similares a las presentes en el fluido folicular de primates (0.1-1.0 M mol/l) aumentan la producción de inhibina de las células de la granulosa, inducida por FSH aumentando la sensibilidad celular a las gonadotropinas⁷⁵. No es claro si la testosterona afecta la producción de inhibina directamente como andrógeno o indirectamente, a través de la aromatización a estrógeno, ya que no se probó el efecto de un andrógeno no aromatizable. La testosterona aumentó la producción tanto de inhibina como de progesterona en respuesta a la estimulación por hFSH, mientras que el estradiol sólo aumentó la producción de inhibina.

El hallazgo de que el cuerpo lúteo del Tití expresa un abundante mRNA de inhibina señala al cuerpo lúteo no

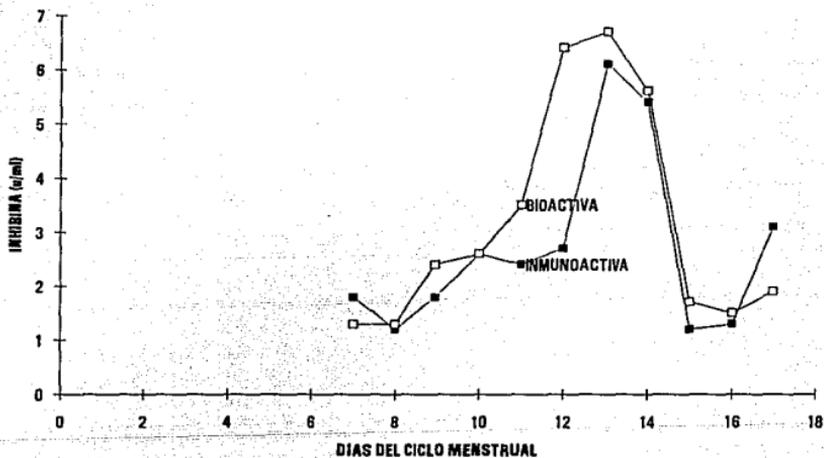
humano como el sitio de expresión genética de la subunidad alfa de inhibina⁷⁵. La carencia de subunidades alfa de mRNA de inhibina detectables en el total de mRNA de folículos pequeños de Titi concuerda con el nivel de inhibina bajo o no medible producido por células de la granulosa inmaduras cultivadas en ausencia de hFSH. Se piensa que hay diferencias de expresión de los genes según la especie.

Este estudio muestra las siguientes similitudes entre las células de granulosa de primates y no primates con respecto a su producción de inhibina dependiente de hormonas:

- 1) La producción de inhibina aumenta coordinadamente con la esteroidogénesis durante el desarrollo folicular preovulatorio *in vivo*.
- 2) El tratamiento de las células de la granulosa inmaduras con FSH induce aumentos equivalentes en la producción de inhibina.
- 3) La inducción de inhibina por FSH está modulada por esteroides foliculares.
- 4) La producción de inhibina responde directamente a la LH durante el desarrollo preovulatorio avazado.
- 5) El cuerpo lúteo es un sitio activo de expresión genética de inhibina después de la ovulación.

En la fig 21 Baird y col.⁷² muestran los niveles de inhibina en el plasma periférico de una paciente a la que se le estimuló el desarrollo folicular con tratamiento de clomifeno seguido de FSH purificado (Metrodin). La concentración de inhibina, medida tanto por inmunoensayo (McLachlan y col., 1987 ⁷²) como por bioensayo (Tsonis y col., 1986 ⁷²) se eleva hasta alcanzar un pico que termina después del LH en el día 14 del ciclo menstrual. Estos estudios sugieren que la inhibina inmunoactiva en plasma periférico está muy relacionada con la inhibina bioactiva, sin embargo, Baird y col. ⁷² mencionan que aún quedan muchas interrogantes; por ejemplo, no se sabe nada a cerca de las especies moleculares que se secretan a la vena ovárica y su metabolismo subsecuente. Tanto la inhibina inmunoactiva y biológicamente activa tienen una vida larga *in vivo* pero, ¿cuál es la ruta que las haga comprensibles?. Estudios farmacocinéticos no serán posibles hasta que haya una inhibina pura disponible para pruebas clínicas.

FIGURA 21.- CONCENTRACION DE INHIBINA EN PLASMA PERIFERICO



3.2.- PRODUCCION EN RELACION A CELULAS DE LA TECA.

Hillier y col.⁷⁶ probaron los efectos de la inhibina (inhibina-A recombinante humana) sobre la síntesis de andrógenos de cultivos en monocapa de células tecales humanas. El tratamiento de éstas con inhibina durante cuatro días (en dosis entre 10 y 100 ng/ml) causó aumentos (aproximadamente del doble) en la producción de andrógenos (androstenediona y dehidroepiandrostenediona).

El efecto de la inhibina se comparó al de otros factores que previamente mostraron estimular la síntesis de andrógenos en el mismo sistema de cultivo de células tecales: el nivel máximo de estimulación causado por LH (10 ng/ml) fue similar al de andrógenos⁷⁶. En cambio, al probar FCI-I, el nivel máximo se obtuvo con 30 ng/ml. Mientras que los efectos de la inhibina y la LH fueron aditivos, el FCI-I y la LH presentaron una acción sinérgica sobre la producción de andrógenos. La presencia adicional de inhibina en el medio aumentó la síntesis de éstos en respuesta a LH más FCI-I, de forma dependiente de la concentración y máxima en una dosis de aproximadamente 100 ng/ml de inhibina. La estimulación de ésta última sobre la síntesis de andrógenos no se asoció a un aumento ni en la producción de progesterona ni en el número de células tecales. La estimulación preferencial de la producción de esteroides C₁₉ relativa a la producción de progesterona, señala una acción de la inhibina sobre la 17 hidroxilasa / C₁₇₋₂₀ liasa, la enzima limitadora de la síntesis de andrógenos tecales⁷⁶.

Los datos presentados⁷⁶ aumentan la posibilidad de que la inhibina juegue una función parácrina fisiológicamente importante en el ovario humano adulto, interactuando con el FCI-I y quizá con otros factores producidos localmente para modular la síntesis de andrógenos (precursores de estrógenos) en la teca.

De igual forma se probaron los efectos de la activina (activina A recombinante humana) sobre la producción de andrógenos (androstenediona y dehidroepiandrostenediona), utilizando el mismo cultivo de células tecales anteriormente mencionado⁷⁷. La producción de éstos se indujo mediante el tratamiento de las células con LH en presencia de FCI-I, con lo cual obtuvieron una máxima producción de andrógenos. El nivel de androstenediona disminuía (día 2-4 del cultivo) cuando no se encontraba ninguno de éstos compuestos en el medio. La presencia de LH no afectó ésta disminución y el FCI-I la hizo completamente reversible, sensibilizando la respuesta de las células tecales a LH.

La activina-A no modificó la producción basal de andrógenos pero inhibió la producción de androstenediona en respuesta al tratamiento con LH y/o con FCI-I, que a su vez igualó la producción de dehidroepiandrostenediona y progesterona⁷⁷. El tratamiento con FCI-I provocó un aumento en la asimilación de inhibina tritiada, sin importar la

presencia de LH o activina-A. Los resultados señalan el efecto inhibitor de ésta sobre la producción de andrógenos en cultivos *in vitro* de células tecales humanas, persistiendo hasta la etapa adulta en la mujer. También indica que el FCI-I juega un papel en el control parácrino positivo del crecimiento de la teca interna y como modulador de su función esteroideogénica⁷⁷.

3.3.- ESTUDIOS *IN VITRO* DE LA PRODUCCION DE INHIBINA.

McLachlan y col.⁷⁸ desarrollaron un RIA para medir la inhibina sérica durante el ciclo menstrual normal. Consiste en la incubación del suero, los estándares y el antisuero (de conejo) durante dos días a 4° C antes de la adición de ¹²⁵I marcado para la inhibina de FFb de 31 K, continuando la incubación por dos días más. Después se agrega un segundo anticuerpo (suero anticonejo de cabra) y se incuba durante la noche, luego se agrega NaCl, se centrifuga, decanta y cuantifica. El RIA resultó ser específico para inhibina, ya que las subunidades de inhibina y proteínas relacionadas mostraron reacciones cruzadas mínimas con éste.

Por otro lado, Robertson y col.⁷⁹ reportan otro RIA y comparan los resultados obtenidos mediante éste con los de inhibina bioactiva en suero obtenido de mujeres de 28-39 años preparadas para FIV, y colectado en varias etapas de inducción de la ovulación. Para inmunizar se inyectaron conejos machos castrados en intervalos de 3-4 semanas con las siguientes preparaciones: a) FFb, b) fracción con inhibina obtenida por cromatografía de FFb en Sefacril S-200 en 50 mmol/L de acetato de amonio y Sefadex G-100 en 4 mol/L de ácido acético, c) una fracción con inhibina obtenida por HPLC de fase invertida de b y d) varias inyecciones de inhibina purificada de bovino de 31 K.

Se utilizó un segundo marcador de anticuerpos, al que se agregó el antisuero de inhibina. Los tubos se incubaron durante la noche a temperatura ambiente, después de lo cual se agregó inhibina yodada y se incubó por un período posterior de 24 horas a la misma temperatura. Al cabo de éste se agregó suero inmunoglobulina G anticonejo de cabra, incubando a 4° C por la noche, centrifugando, decantando y cuntificando⁷⁹.

Las muestras de suero se cromatografiaron en Sep-Pak C₁₈ para remover los esteroides. Durante éste procedimiento de extracción no hubo pérdida significativa de la actividad de inhibina. Las muestras eluidas se subdividieron, liofilizaron y probaron en un RIA y un ensayo *in vitro* con células de pituitaria de borrego⁷⁹.

Este RIA fué específico para la inhibina heterodimérica intacta, ya que varias proteínas estructuralmente similares, como la activina-A, (dímero de la subunidad beta-A de la inhibina), el factor transformador de crecimiento-beta y la substancia inhibidora de los conductos Mulerianos no reaccionaron cruzadamente en el ensayo⁷⁹.

Por otra parte, Ackland y col.⁸⁰ usaron un RIA para la subunidad alfa de inhibina porcina con el fin de medir la inhibina sérica por cambios en los niveles de FSH séricos, principalmente después de la gonadectomía bilateral en ratas machos, y después de la ULO en ratas hembras, durante la elevación secundaria de FSH en la mañana del estro en ratas hembras.

Los niveles de inhibina-ir (inmunoreactiva) disminuyeron a niveles casi indetectables después de la gonadectomía en ratas de ambos sexos; ésto indica que se mide una sustancia de origen gonadal. La disminución temporal de inhibina-ir sérica en ratas hembras después de la ULO concuerda con el removimiento de un ovario. La disminución de los niveles de inhibina sérica a las 0200 horas del estro es secundaria a la disminución de la expresión del ARNm de inhibina; sugiriendo que la disminución en la retroalimentación negativa de la pituitaria podría permitir que ocurriera la elevación secundaria de FSH ⁸⁰.

También se ha desarrollado un RIA para la cuantificación de inhibina en FFb; con el cual se detectan concentraciones de inhibina sérica tres veces más bajas después de la OVX que antes de ésta. Las concentraciones de ésta sustancia en el fluido fueron más altas que las séricas, lo cual indica que el ovario es la fuente primaria de inhibina en las terneras ³⁸.

Más recientemente se reportó el desarrollo de una prueba inmunoradiométrica (IRMA) para la cuantificación específica de la inhibina dimérica⁸¹. La prueba parece ser mejor que los RIAs y bioensayos usados hasta el momento para la inhibina, en términos de su sensibilidad, especificidad y precisión. IRMA no muestra reacción cruzada detectable con la subunidad alfa de la inhibina monomérica aislada de FFb (Knight y col., 1988 ⁸¹), lo cual sucede con otros RIAs.

Otra ventaja que presenta ésta prueba es que el tiempo total requerido para completarla es menor de 24 horas, comparado con otros RIAs que tardan de 2-3 o de 5-7 días. Además, IRMA puede detectar inhibina-ir hasta en 20 nL de FFb pero no le es posible detectar inhibina en plasma periférico o útero-ovárico de ganado. Mediante el uso de SDS PAGE para separar las diferentes formas Mr de la inhibina, se observó que IRMA reconoce los Mr 56,000 y 32,000 aunque indica poca reacción con formas más altas. Una desventaja más de IRMA es que los contenidos de inhibina medidos por bioensayo fueron similares a los obtenidos por RIA, pero mostraron una diferencia de 8-23 veces mayor a los valores obtenidos por IRMA, lo cual implica una diferencia cuantitativa. Sin embargo, se considera una buena prueba para medir la inhibina dimérica de extractos gonadales, muestras de fluido folicular, medio de cultivo condicionado por células de granulosa y para un análisis rápido de fracciones cromatográficas de inhibina⁸¹.

4.- CORRELACION ENTRE LOS NIVELES DE INHIBINA CON LOS NIVELES FOLICULARES DE FSH, LH, E₂, P₄ Y PROLACTINA.

4.1.- NIVELES DE INHIBINA DURANTE EL CICLO MENSTRUAL.

Channing y col. desde 1976 ⁸², han mostrado interés por el estudio de la inhibina y su relación con el contenido de esteroides, ya que al parecer, eran las mismas células las que llevaban a cabo la biosíntesis de ambos compuestos. Durante 1981 éste grupo de investigadores⁸³ examinó fluido folicular de folículos humanos en varias etapas de desarrollo (20 muestras de folículos ovaricos quísticos y 50 de folículos normales) midiendo los niveles de estrógenos, Δ^4 -androstenediona, testosterona y progesterona. Cada muestra fué tratada con carbón para eliminar los esteroides, y probada en cultivos de pituitaria anterior de rata. Estos hallazgos están de acuerdo con estudios citados por McNatty y col. en 1978 y 1979 ⁸³, en los que se sugiere que la actividad de la inhibina del fluido folicular humano es un reflejo de la viabilidad general del folículo, y que las células de la granulosa son la principal fuente de inhibina, medida por su capacidad de convertir andrógenos a estrógenos (lo cual podría reflejar la actividad de la inhibina); apoyado por la observación de que los folículos quísticos, que generalmente tienen pocas células de la granulosa, también tienen una actividad baja de inhibina.

Detectaron⁸³ una tendencia de los folículos preovulatorios con altos niveles de progesterona y estrógenos a contener menos inhibina, comparados con folículos viables; ésto podría interpretarse de dos formas:

a) Una vez que las células de la granulosa empiezan a luteinizar, detienen su secreción de inhibina

b) La progesterona secretada por las células foliculares causa una disminución de la secreción de inhibina conforme el folículo se aproxima a la ovulación.

Los niveles generalmente altos de inhibina en la fase folicular, podrían reflejar diferencias en la viabilidad del folículo sin relación con la fase del ciclo. Los folículos colectados durante la fase luteal tuvieron menos niveles de estrógenos y altos rangos de androstenediona-estrógenos comparados con los folículos colectados en la fase folicular; lo cual indica un mayor grado de atresia en la fase luteal comparándola con la fase folicular. La disminución general de inhibina en folículos atrésicos podría servir como función protectora para asegurar un aumento en FSH y rescatar algunos folículos viables adicionales, especialmente durante la fase luteal tardía.

Después de la ovulación y con la pérdida del folículo viable dominante, una fuente potencial de inhibina, es posible que la disminución de inhibina permita el aumento de FSH observado al final de la fase luteal, pero aún se deben examinar muestras sanguíneas para probarlo. También es

posible que los cambios en estrógenos y progesterona sean los responsables de las alteraciones en el FSH sérico a través del ciclo⁶³.

Más tarde, Channing y col.⁶⁴ también observaron que la actividad de inhibina sólo puede detectarse en sangre venosa ovárica humana durante la fase folicular tardía, ya que no se detectaron niveles de ésta en la fase folicular temprana y la luteal en un cultivo de células de pituitaria anterior de rata. Los mayores niveles de estrógenos encontrados en la fase folicular tardía podrían aumentar la permeabilidad vascular, que a su vez aumentaría el eflujo de inhibina del folículo.

Posteriormente Tsonis y col.⁶⁵ demuestran por primera vez que las células lúteas de la granulosa de humanos producen cantidades significativas de bioactividad de inhibina en condiciones *in vitro*. Esta producción está reforzada por la adición de LH o testosterona.

En el mismo año McLachlan y col.⁷⁸ demuestran que la inhibina ir es detectable en la circulación durante todo el ciclo menstrual de mujeres normales. Además, presentan evidencia que apoya el papel fisiológico de la inhibina en la modulación de la liberación de FSH por la pituitaria, tanto en la fase folicular como en la luteal. Sus observaciones, basadas en un RIA desarrollado por ellos, indican que durante la fase folicular temprana los niveles de inhibina y estradiol fueron bajos; éste es en el período en el cual la elevación perimenstrual de FSH provoca el reclutamiento de un grupo de folículos de los que surgirá el dominante. Los niveles de inhibina y estradiol relativamente constantes, coinciden con la poca capacidad biosintética de la primera en éstos folículos pequeños. Se hallaron aumentos similares en los niveles de ambas hormonas durante la fase folicular tardía, apoyando el aspecto de que la inhibina es un indicador de la función de las células de la granulosa.

Los niveles de inhibina durante los dos primeros días de la fase luteal disminuyeron paralelamente al estradiol, quizá debido a la ruptura del folículo. Las concentraciones más altas de inhibina sérica ocurrieron en la fase luteal media. Los patrones de secreción ésta hormona fueron muy similares a los de progesterona en la fase luteal media y tardía.

Debido a que la inhibina suprime la secreción de FSH selectivamente sin afectar la de LH, podría esperarse que su concentración aumentara en la fase folicular del ciclo conforme disminuye la secreción de FSH⁷². Sin embargo, en mujeres con ciclos menstruales normales, se vió que no hay cambios en la concentración de inhibina bioactiva o inactivo durante la fase folicular del ciclo hasta los dos días de la ovulación al momento de la elevación de LH y FSH a mitad del ciclo (Fig 22). Cerca del momento de la ovulación hay una caída repentina seguida de un aumento, que coincide con la elevación de la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo. De éste patrón se concluye que es poco probable que el aumento de la secreción de inhibina del

FIGURA 22A.- CONCENTRACION DE INHIBINA Y FSH EN PLASMA PERIFERICO DE 5 MUJERES.

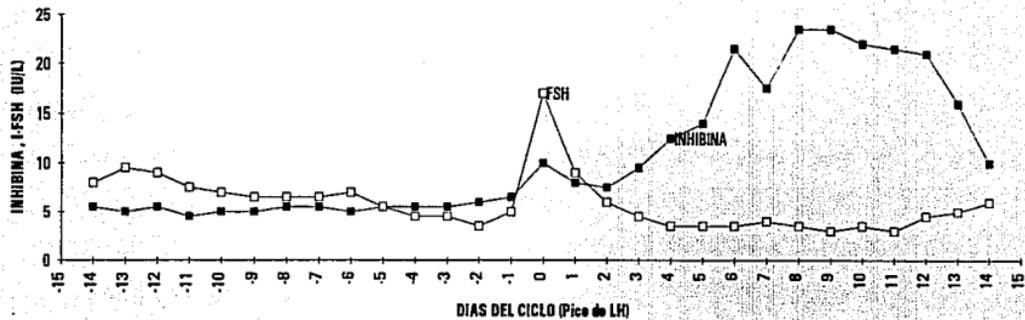
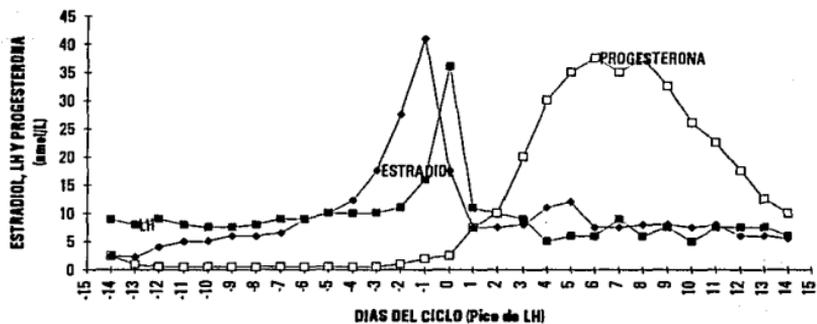


FIGURA 22B.- CONCENTRACION DE ESTRADIOL, LH Y PROGESTERONA EN PLASMA PERIFERICO DE 5 MUJERES.



folículo dominante sea responsable de la caída de la concentración de FSH durante la fase folicular. En cambio, la correlación negativa entre la concentración de estrógenos y la de FSH, tiene un papel principal en ésta etapa del ciclo. Esto no excluye la posibilidad de que la inhibina pueda contribuir a la supresión de FSH en combinación con estrógenos y que los muy bajos niveles de FSH encontrados durante la fase luteal del ciclo sean debidos a su acción conjunta. La elevación de la concentración de inhibina en la fase luteal del ciclo sugiere que el cuerpo lúteo es fuente de ésta.

Por su parte, Lenton y col.⁸⁶, confirman la presencia de la inhibina sérica a lo largo del ciclo menstrual normal con dos picos: uno a medio ciclo y otro en la fase luteal media. Los niveles de inhibina en ésta última resultaron por lo menos dos veces mayores que los de la folicular. Estos datos confirman que en el humano el cuerpo lúteo es una fuente de inhibina, hecho considerado como único de primates. Las concentraciones de inhibina encontradas durante la fase folicular, a mitad del ciclo y en la fase luteal son las siguientes:

Concentraciones de inhibina en la fase folicular:

Las concentraciones de inhibina durante la fase folicular y el período periovulatorio, fueron más bajas en mujeres de mayor edad, en las cuales la disfunción de las células de la granulosa podría ser anticipada. Es notable, sin embargo, que el índice convencional de la función folicular, principalmente estradiol, no refleje tal disfunción, pues los picos de éste fueron significativamente más altos en éstas mujeres que en las control. Durante la fase folicular temprana la concentración de estradiol e inhibina son bajas en mujeres de mayor edad. Las diferencias en los niveles de éstas a lo largo de la fase folicular podrían explicarse en términos de las contribuciones relativas de los compartimentos de las células tecales y granulosas a las concentraciones totales en la circulación, ya que la inhibina es producto de las células de la granulosa pero el estradiol se origina de ambos tipos celulares.

Concentraciones de inhibina a mitad del ciclo:

Las concentraciones de inhibina aumentan a lo largo de la fase folicular y alcanzan un pico cuando la LH es máxima. Mientras el folículo está intacto, los niveles de inhibina permanecen altos. En contraste, las concentraciones periféricas de estradiol que se elevan relativamente rápido de la fase folicular media a la tardía comparadas con las de inhibina, disminuyen en relación al comienzo de la elevación de LH, antes de la ruptura folicular. Dentro del folículo las concentraciones de inhibina, a diferencia de las de estradiol, no disminuyen después de la elevación de LH. En la ovulación, cada folículo contiene aproximadamente 3,000 a 5,000 unidades de inhibina, presumiblemente liberada a la cavidad abdominal.

Concentraciones de inhibina en la fase luteal:

Las concentraciones periféricas de inhibina aumentan y disminuyen paralelamente a los esteroides que se sabe son secretados por el cuerpo lúteo. Después de la estimulación con hCG, las concentraciones de estradiol e inhibina se elevan. Lo anterior implica que: si la inhibina es producto de las células de la granulosa es probable que la fuente de inhibina luteal sean las células lúteas de la granulosa. La progesterona se secreta por ambos tipos de células luteales, pero es posible que sólo las de la teca tengan receptores a LH. Entonces, aunque las concentraciones de progesterona reflejaran la función luteal, las concentraciones de inhibina sólo indicarían la contribución del compartimento de las células lúteas de la granulosa. Esta hipótesis puede explicar el hecho de que algunas mujeres presenten concentraciones anormales bajas de progesterona a cambio de niveles normales de inhibina.

El aumento relativamente grande de los niveles de inhibina durante ésta fase podría ser debido al incremento de: su síntesis por una población constante de células lúteas de la granulosa (en respuesta a señales tróficas directas), su número o, simplemente de su secreción, a consecuencia del abastecimiento sanguíneo.

4.2.- NIVELES DE INHIBINA SEGUN LA MADUREZ DEL OVOCITO.

En otros estudios se investigaron los niveles de la inhibina y actividad inhibidora de aromatasa (AIA), en el fluido folicular humano; correlacionándolo con el contenido de fluido folicular en función de la madurez del ovocito y su posible uso como índice predictivo de fertilizaciones *in vitro* (FIV) y transferencia exitosa de embriones (TE). Además se estudiaron los cambios en las concentraciones de éstos parámetros en términos de madurez folicular y función luteal⁹⁰. El experimento demostró que el uso del análogo de larga duración de la LHRH no provocó ningún cambio en las concentraciones de estrógenos, progesterona, inhibina y AIA, comparado con valores obtenidos cuando no se utilizó p -Trp⁶, lo cual indicó la ausencia de cualquier acción inherente en las células de la granulosa así como en la AIA y bioensayos de inhibina. El uso de FSH seguido o no por desensibilización de la pituitaria con p -Trp⁶ resultó en concentraciones de estrógenos, progesterona, inhibina y AIA en fluido folicular similares a aquellas de los folículos dominantes de mujeres no tratadas que fueron considerados como folículos preovulatorios, la adición de hCG permitió la reducción de los niveles de E_2 y el aumento de progesterona.

La inhibina del fluido folicular no es un factor determinante en la predicción de la evolución del ovocito después de la FIV⁸⁷. Sin embargo, cuando se mide por bioensayo o por RIA, la inhibina parece ser un índice de la maduración folicular, ya que el contenido de inhibina de los

folículos caracterizados como inmaduros (por su tasa E_2/P y niveles de E_2), es más bajo que en folículos maduros; para los cuales se obtuvo un embarazo para cada transferencia embrionaria después de la FIV. La AIA probó ser característica para la predicción del éxito de la TE por FIV, también fué un índice de maduración folicular ya que los niveles más bajos se encontraron en folículos maduros ⁸⁷.

4.3.- NIVELES DE INHIBINA EN CICLOS INDUCIDOS.

diZerega y col.⁸⁸, han probado folículos humanos femeninos tratados con clomifeno y con hMG para valorar su respuesta a la inhibina y correlacionarla con las concentraciones de esteroides en el fluido antral. Los niveles de estradiol en fluidos foliculares fueron más altos en pacientes no tratadas (comparadas con las que recibieron Citrato de Clomifeno o hMG). Sugieren que la secreción de fluido folicular en respuesta a elevaciones farmacológicas de gonadotropinas es diferente a la que ocurre espontáneamente, en ciclos no tratados. La correlación positiva entre los niveles de Estrógeno intrafolicular y la actividad de la proteína folicular en pacientes no tratadas indica que estos folículos fueron ya sea menos sensitivos a su propio inhibidor de aromatasa o que previamente habían acumulado grandes cantidades de estrógenos y subsecuentemente redujeron la aromatización.

El análisis del fluido folicular de las pacientes que recibieron terapia de hMG no presentó correlación entre los niveles intrafoliculares de estrógenos y la actividad de la proteína folicular, mostrando que la estimulación farmacológica de gonadotropinas altera los eventos intrafoliculares por los cuales se regulan la esteroidogénesis y la secreción de proteínas⁸⁸. Además se encontró una correlación positiva entre la actividad de la inhibina intrafolicular y los niveles de estrógenos en el fluido folicular en pacientes con ciclos espontáneos, pero se perdió cuando recibieron terapia exógena de hMG. Los niveles de testosterona y androstenediona en el fluido folicular fueron similares en los 3 grupos de pacientes, sin correlación con la actividad de la proteína folicular; por lo tanto las alteraciones en la actividad de la proteína folicular podrían ser dependientes de la secreción de Androstenediona y Testosterona por las células de la granulosa.

En 1985 Chari y col.⁸⁹ examinaron los efectos de la inhibina de ffh sobre la secreción de estrógenos bajo condiciones *in vivo* e *in vitro*, utilizaron cuatro tipos de muestras de fluido folicular humano: 1) fluido folicular obtenido de mujeres tratadas con hMG y hCG de 32 años, 2) fluido ovárico de mujeres de 34 años, 3) fluido de ascitis (ver apéndice), obtenido de mujeres de 28 años con oligomenorrea y 4) Ffh de una mezcla de muestras de fluido de

mujeres de 40 a 42 años a diferentes etapas del ciclo. Las muestras fueron centrifugadas y la concentración de hormonas se midió por RIA, la actividad de la inhibina se purificó por cromatografías sucesivas en sephadex G-50, DEAE Biogel-A y matriz de naranja-A. La actividad de la inhibina se evaluó por la capacidad de las muestras para inhibir la elevación de FSH post-castración de ratas hembras adultas ovariectomizadas.

El efecto de las muestras testigo sobre la secreción de estradiol por células de granulosa, se midió *in vivo* mediante muestras de suero analizadas por RIA e *in vitro*, utilizando c.g. de ovarios porcinos incubados en presencia o ausencia de las sustancias de prueba⁸⁹. En las muestras 1, 2 y 3 no hubo correlación entre el contenido de esteroides y la actividad específica de la inhibina, la muestra 4 mostró muy bajas cantidades de estrógenos. Después de una cromatografía de intercambio iónico, la actividad de la inhibina en las cuatro muestras estuvo asociada con un pico de proteínas eluido con 0.2 M de solución amortiguadora de acetato de amonio (DE-0.2) que revela el efecto supresor de la FSH. En las muestras 1 y 3 la actividad de la inhibina también fue observada en el pico de proteínas eluidas con solución amortiguadora 0.1 M.

La cromatografía con naranja-A se seleccionó para la purificación del inhibidor, la actividad de la inhibina estuvo asociada a las proteínas que se unían a la naranja-A; casi el 78 % de la inhibición de FSH fue efectuada por las fracciones derivadas de ésta cromatografía de las muestras 1 y 3. La secreción *in vivo* de estradiol disminuyó en las ratas estimuladas con hMG, la secreción de estradiol *in vitro* en las células granulosa porcinas fue inhibida significativamente en forma dosis dependiente por las proteínas purificadas del DE-0.2; bajo las mismas condiciones, el suero humano no mostró ninguna inhibición de estrógenos secretados por células de granulosa porcinas. En la fracción obtenida con naranja-A también se muestra una actividad supresora de estrógenos. Los niveles de testosterona, aunque fueron secretados en bajas cantidades, mostraron un aumento paralelo, que podría ser explicado por la inhibición de la aromatización de andrógenos a estrógenos, producida por la muestra obtenida con naranja-A. La actividad biológica de ésta fracción, fue estable al calentarla a 56°C por 1 hora, pero no al tratarse por digestión triptica.

La introducción de la cromatografía naranja-A⁸⁹ probó ser un paso efectivo para obtener una actividad de inhibina altamente purificada, que suprime la secreción de estrógenos estimulada por hMG en ratas de 10 días de edad, indicando una posible acción directa de la inhibina a nivel del ovario. Chari y col.⁸⁹ sugieren que la inhibina de ffh además de su acción a nivel de pituitaria, actúa a nivel ovárico para regular los eventos involucrados en la biosíntesis de estrógenos.

En el estudio realizado por Marrs y col.⁹⁰, se analiza la relación de la actividad de la inhibina de fluido

folicular de tres grupos de mujeres, el primero formado por ciclos ováricos normales, el segundo grupo formado por mujeres estimuladas con citrato de clomifeno y, el tercero, estimulado con hMG. Correlacionándolo con las concentraciones de esteroides en el fluido folicular. La concentración de la actividad de inhibina fué, en parte, función de la exposición previa de los folículos a gonadotropinas y a su etapa de maduración folicular. Una correlación positiva entre las concentraciones de estradiol en el FF y la actividad de inhibina confirma que la actividad de ésta es un reflejo de la viabilidad del folículo.

Con respecto a la progesterona se encuentra una correlación negativa en pacientes no tratados, sugiriendo que los folículos preovulatorios contienen concentraciones de inhibina intrafolicular que se elevan conforme el folículo madura, pero cuando empieza la luteinización (aumentan niveles de progesterona), los niveles de inhibina disminuyen⁹⁰. Como se ve, la secreción proteica de las células de la granulosa así como la de esteroides son alterados por la luteinización. Se detectó una correlación positiva entre los niveles de testosterona y androstenediona intrafoliculares y la actividad de la inhibina en pacientes no tratadas, ésta correlación desapareció con tratamiento de hMG. La relativa carencia de niveles elevados de andrógenos en el fluido folicular en ciclos estimulados con hMG y con clomifeno podría sugerir que en el folículo humano, la estimulación farmacológica de las células de la granulosa conduce a la elevación de los niveles intrafoliculares de inhibina y esteroides, que alteran el proceso normal de un folículo que esta adquiriendo el estado preovulatorio.

Finalmente, la correlación de la actividad de la inhibina en el fluido folicular con los niveles de esteroides en pacientes de ciclos normales, en oposición a las estimuladas con clomifeno o hMG, sugiere que la inhibina junto con las gonadotropinas juega un papel en la regulación de la foliculogénesis⁹⁰.

4.4.- NIVELES DE INHIBINA EN MUJERES CON OVARIO POLIQUÍSTICO.

Tanabe y col.⁹¹ compararon los niveles de inhibina-F (sustancia supresora de FSH o foliculostatina) y el contenido de esteroides en el fluido folicular de pacientes con ovario poliquístico (PCO); observaron, en el rango anormal FSH-LH característico de éstos pacientes, que sus folículos contienen una actividad normal de inhibina-F a cambio de un número reducido de células de granulosa para ese diámetro de folículo. Posiblemente la inhibina-F ejerza su acción sobre la pituitaria y/o el hipotálamo, lo cual podría resultar en niveles basales de FSH normales o subnormales en éstas mujeres; debido a su supresión selectiva de la secreción de FSH a cambio de niveles relativamente altos de LH sérico. Asumiendo que las células de la granulosa sean la fuente de

inhibina-F, es posible que su secreción por célula de granulosa sea mayor en ovarios con PCO que en ovarios normales; aunque también los niveles normales de inhibina-F en los primeros podrían tener una vida media alterada o una molécula alterada con actividad biológica distinta.

Los esteroides también podrían ser responsables de la secreción inapropiada de gonadotropinas en éstas pacientes pero los niveles de estrógenos y progesterona fueron comparables a los de folículos viables de mujeres normales sugiriendo que también éstos eran viables y poseían alguna actividad enzimática aromatizante⁹¹. Otra posibilidad se atribuye a las células tecales como fuente de los altos niveles de estrógenos intrafoliculares en pacientes PCO. Es por ello que la relación andrógenos-estógenos probablemente no sea apropiada para usarse en la estimación de la viabilidad folicular de folículos PCO.

4.5.- NIVELES DE INHIBINA DURANTE EL EMBARAZO.

Por su parte, Abe y col.⁹² muestran las siguientes características en los cambios de las concentraciones de inhibina ir a lo largo del embarazo normal:

1) Las concentraciones promedio de la inhibina durante el embarazo (2.25 ± 0.48 a 24.15 ± 6.99 IU/ml) fueron más altas que en el ciclo menstrual normal (0.46 ± 0.04 IU/ml en la fase folicular media y 2.02 ± 0.47 IU/ml en la fase luteal media).

2) Las concentraciones de inhibina fueron altas aún a las 5 semanas de gestación (7.54 ± 1.10 IU/ml) con el primer pico a las 8-10 semanas de ésta (11.63 ± 1.88 IU/ml a las 10 semanas).

3) Después de 10 semanas de gestación las concentraciones disminuyeron, permaneciendo relativamente bajas durante el segundo trimestre (2.25 ± 0.48 a 5.06 ± 1.00 IU/ml) y elevándose nuevamente durante el tercer trimestre (4.66 ± 1.33 a 24.15 ± 6.99 IU/ml).

4) La inhibina disminuye a niveles no detectables después del nacimiento.

Debido a la presencia de niveles de inhibina ir en extractos de cuerpo lúteo y placenta se les propone como fuentes de inhibina durante la gestación temprana⁹². Otros estudios⁹³, también demuestran el aumento progresivo de los niveles de dicha hormona (en suero) junto con el embarazo, con un pico a las 38 semanas (5.33 U/ml), lo cual señala su posible uso como marcador de las distintas etapas de la preñez.

Lenton y col.⁸⁶ observan que en los ciclos de concepción, después de la implantación, las concentraciones de inhibina se elevan a niveles mucho mayores a los registrados en ciclos sin embarazo. Por ello proponen que el papel más importante de la inhibina se exprese al comienzo de éste. Existen dos posibles explicaciones a éste fenómeno:

1a. La concentración de inhibina, al igual que la de progesterona en la fase luteal, no está completamente expresada y puede aumentar significativamente después de la estimulación por una señal trófica del embrión que se implanta.

2a. El tiempo entre el aumento de inhibina y el de progesterona no es cercano, por lo cual se sugiere que la inhibina no aumenta al comienzo del embarazo hasta que el embrión está bien implantado y hay una comunicación fetomaternal eficiente y, consecuentemente, un equilibrio entre la síntesis y la secreción de hCG. De éste modo, surge la posibilidad de que el aumento de inhibina postimplantación sea de origen trofoblástico en lugar de luteal.

Norman y col.⁹⁴ estudiaron la relación temporal que existe entre la inhibina, las gonadotropinas y los productos del cuerpo lúteo (estrógenos, progesterona y relaxina) al comienzo del embarazo. Además, observaron el cambio en los niveles de estas hormonas en abortos y en embarazos que presentaron implantación múltiple de embriones, para determinar si éstos jugaban un papel importante en la predicción del éxito del embarazo. Se estudiaron 2 grupos de mujeres: el primero con pacientes (n= 105) tratadas para FIV (Fertilización *in vitro*) o GIFT (transferencia de gametos a las trompas de Falopio) y el segundo formado por mujeres con infertilidad inexplicable, cuyo perfil endocrinológico se siguió durante un ciclo menstrual espontáneo completo (n=15 consistió de 7 mujeres que se embarazaron espontáneamente en un ciclo natural y 8 con la misma edad y estado de infertilidad que no resultaron embarazadas).

Los resultados⁹⁴ muestran que la progesterona, relaxina, hCG y E₂ aumentan alrededor del día 11 después de la recuperación del ovocito para FIV o GIFT o, después de la elevación de LH sérica en ciclos espontáneos. La LH y FSH se encuentran suprimidas en éstos momentos. Las concentraciones de inhibina, E₂ y progesterona fueron bajas en mujeres destinadas a abortar pero aumentaron en embarazos gemelos. Diferencias estadísticamente significativas entre embarazos y no embarazos se detectaron por el día 11 para progesterona (relaxina en gemelos) y el día 16 (E₂, hCG, inhibina). Los estudios demuestran que las concentraciones de inhibina aumentan significativamente en los días 14-17 después de la FIV y que éste aumento se detecta 9 días después de la TE (día 11) para FIV, o en embarazos con ciclos naturales. Los niveles elevados de inhibina se observaron después del aumento de hCG y de progesterona en todos los embarazos, señalando el inicio de la implantación y el "rescate" del cuerpo lúteo⁹⁴.

A pesar de propuestas anteriores del origen trofoblástico de la inhibina, en éste estudio⁹⁴ se observaron diferentes valores de inhibina en concepciones de un individuo, indicando que el ovario en embarazos de FIV contribuye de manera importante a las altas cantidades de inhibina encontradas en el embarazo temprano. Las concentraciones de inhibina fueron más altas en la fase

luteal del grupo de pacientes no embarazadas comparado con el grupo que sí se embarazó. Por ello, el concepto del cuerpo lúteo como productor de inhibina al principio del embarazo coincide con éstos hallazgos.

Las pacientes que abortaron, presentaron menores concentraciones de inhibina y progesterona por el día 11, comparadas con embarazos exitosos⁹⁴. Sin embargo, hubo una proporción de mujeres con concentraciones relativamente altas de inhibina y progesterona. Norman y col.⁹⁴ no encontraron una buena explicación a éste fenómeno, pero observaron que usando una concentración de inhibina $< 3U/L$ o de progesterona $< 200 \text{ nmol/L}$ en el día 16, la inhibina presentó la misma sensibilidad y especificidad en la predicción del fracaso del embarazo (aproximadamente 70-90 %, respectivamente). Mediciones subsiguientes podrían ser útiles para detectar embarazos con riesgo y alternativamente, la combinación de hormonas como progesterona, hCG, inhibina y relaxina podrían tener valor en la predicción de la pérdida fetal.

Las concentraciones de relaxina aumentaron estadísticamente alrededor de los 14 días en mujeres no embarazadas con ciclos normales y por el día 11 en gestaciones múltiples después de FIV o GIFT. La evidencia señala la dependencia de la relaxina con la hCG al comienzo del embarazo, apoyado por las altas concentraciones de ésta en embarazos gemelos. Las mujeres hiperestimuladas que recibieron inyecciones de hCG mostraron concentraciones aumentadas de relaxina comparadas con las de ciclos naturales. Finalmente, los aumentos en hCG aparentemente coinciden con la elevación de inhibina, progesterona y relaxina en la mayoría de los grupos embarazados⁹⁴.

4.6.- CONTROL DE LA PRODUCCION DE INHIBINA.

En relación al control de la producción de inhibina, Baird y col.⁷² mencionan que las gonadotropinas estimulan la producción de ésta en las células ováricas vía la activación de adenilato ciclasa y producción de AMPc (Bicsak y col., 1988⁷²). De ésta forma, el que las células de la granulosa respondan a LH y FSH dependerá de que en la célula estén presentes los receptores apropiados.

4.7.- INHIBINA Y ACTIVINA.

Rabinovici y col.⁹⁵ determinaron los efectos esteroideogénicos y mitogénéticos de la activina-A recombinante humana y de la inhibina-A en células foliculares ováricas humanas en cultivo y examinaron la localización celular de la activina-A dimerica inmunoreactiva en células ováricas humanas por inmunocitoquímica usando anticuerpos monoclonales contra el dímero intacto de la activina-A humana

y, usando la misma técnica, examinaron cuales agentes tróficos regulaban la acumulación celular de la activina dimérica inmunoreactiva en células foliculares ováricas humanas luteinizantes en cultivo. Demuestran que la activina-A humana recombinante, a diferencia de la inhibina-A humana recombinante, pueden modular la esteroidogénesis y la mitogénesis en células foliculares luteinizantes. La activina-A disminuyó la secreción de progesterona basal y estimulada por gonadotropinas y la actividad aromática en forma dosis y tiempo-respuesta. En contraste a éstos efectos el TGF-beta aumentó la actividad aromática. No se observó ningún efecto de la inhibina-A sobre la actividad aromática y la secreción basal de progesterona estimulada por gonadotropinas o en la producción de células foliculares humanas luteinizantes. También se demuestra que el dímero de la activina-A inmunoreactiva se encuentra en células foliculares y en el cuerpo lúteo. La acumulación del dímero de activina en células foliculares luteinizadas está modulada por gonadotropinas y cAMP, ya que al agregárselo al medio aumentó el grado de tinción de la activina-A inmunopositiva.

En presencia de FSH la activina, producto de las cg de ratas tratadas con DES (diethylstilbestrol), refuerza: la actividad aromática, la producción de estradiol, los sitios de unión a LH y la producción de progesterona⁹⁶, sin efectos sobre los niveles de éstos parámetros en ausencia de FSH. La activina también estimula la producción de inhibina basal e inducida por FSH⁹⁶.

El tratamiento de cg de ratas con activina refuerza el número de receptores a FSH, aunque se sabe poco al respecto éste hecho parece ser de articular importancia. Los receptores de FSH surgen primero cuando las cg de folículos primarios de rata cambian de forma, de escamosas a cuboidales, al momento en que el folículo ha alcanzado la etapa secundaria. Se conocen relativamente pocos agentes que influencien el número de receptores de FSH; además de la activina el FSH, estimuladores de cAMP o análogos y el FCE⁹⁶.

La capacidad de la activina para aumentar los receptores a FSH, particularmente en ausencia de FSH, la distingue del FCI-I y sugiere un papel único para ésta sustancia en la adquisición y propagación de éstos, evento clave en la foliculogénesis preantral⁹⁶. esta propuesta, asume que las cg expresen consecutivamente o adquieran receptores para activina antes de éste paso en su diferenciación⁹⁶.

De estudios *in vitro* se concluye que la activina también afecta diferenciación de las cg de forma autócrina y que su acción depende de ésta etapa. Promueve la diferenciación de las células durante la etapa preantral y antral temprana de la foliculogénesis y previene la luteinización prematura de las células de etapas tardías de desarrollo antral, lo cual lleva a una completa promoción y mantenimiento del estado foliculogénico⁹⁶.

La folistatina (FSP) suprime la actividad de la FSH, es codificada por un sólo gen En éstas, obtenidas de ratas

tratadas con DES, la FSP causa una inhibición dosis dependiente de la actividad aromática y de la producción de inhibina y refuerza la producción de progesterona inducida por FSH ⁹⁶. En ausencia de FSH, la FSP no tiene efectos en la producción de CAMP basal o estimulado con FSH. Se conocen tres formas de FSP de bovino, 31, 35 y 39 KDa, que refuerzan y prolongan la producción de progesterona en cg de bovino prcialmente diferenciadas⁹⁶. La FSP antagoniza la acción de la activina sobre las cg en cultivo, revierte los efectos reforzantes de la activina sobre la esteroidogénesis estimulada por FSH y la producción de inhibina, también inhibe el número de receptores a FSH inducidos por activina y la producción e inhibina basal inducida por activina en cg de rata no diferenciadas. Estos datos han propuesto que la FSP modula la función de las cg de manera autócrina, que su acción favorece el proceso de luteinización o atresia y que su mecanismo de acción involucra efectos neutralizadores de la activina. En resúmen, la producción de FSP por las cg está regulada por FSH y activina; sus niveles de ARNm cambian con la foliculogénesis y la atresia, parece ser una proteína de unión a activina, aunque no se pueden descartar efectos directos de la FSP sobre las cg ⁹⁶.

I.- La evidencia hasta ahora encontrada indica que la inhibina es específica en suprimir los niveles de FSH, sin alterar los de LH, efecto relacionado a la dosis administrada. El mecanismo de acción aún se desconoce pero al parecer involucra al CAMP.

La cuantificación de los efectos de la inhibina se ha llevado a cabo mediante el uso de métodos *in vivo* e *in vitro*.

Muchas sustancias distintas a la inhibina podrían afectar la secreción de FSH, entre ellas se incluyen: varios compuestos químicos, hormonas esteroides y extractos de tejidos. Como resultado se tendría la supresión de la secreción de FSH no paralela al efecto de la inhibina, con posibles evidencias de toxicidad celular.

II.- Para la purificación de la inhibina se han utilizado diversas técnicas de cromatografía. Mediante estas técnicas se sabe que la sustancia es un heterodímero que consiste de 2 subunidades (alfa y beta) unidas por puentes disulfuro.

En lo referente a la inhibina de fluido seminal, se han aislado dos polipéptidos, uno llamado inhibina alfa, con 92 aminoácidos y otro, inhibina beta, con 94 aminoácidos. De fluido folicular se ha determinado que la subunidad alfa consiste de una secuencia de 134 aminoácidos y la beta de 116 aminoácidos.

III.- En cuanto al peso molecular se han reportado diversas cifras que varían según la(s) técnica(s), las condiciones de purificación (básicas, ácidas o neutras) y la fuente de material utilizado.

La inhibina más utilizada es la aislada de fluido folicular porcino de Mr 32,000.

IV.- La inhibina no es un esteroide, es de naturaleza protéica y su actividad puede ser destruida por calentamiento, digestión enzimática y exposición a solventes orgánicos, carbón, oxidantes o reductores.

V.- La producción de inhibina puede ser regulada por:

- Mecanismos endócrinos (LH, FSH)
- Mecanismos parácrinos (FEC. FTC-alfa, interferón gamma y androstenediona)
- Mecanismos autócrinos (FCI-I, FTC-beta, activina, FSP).

VI.- *In vitro*, la inhibina ejerce un efecto estimulador sobre la producción de andrógenos de las células tecales y humanas, que es atenuado por activina ^{76,77}. De confirmarse *in vivo*, esto permitiría que:

- La inhibina reforzara el abastecimiento de substratos de andrógenos
- Los folículos estrogénicos adquirieran dominancia por medio de la producción folicular de estrógenos.
- La producción aumentada de inhibina y estradiol disminuirían la secreción de FSH y suspenderían el crecimiento de folículos antrales no dominantes.
- El folículo dominante sobreviviera a ésta disminución del suplemento de FSH, por la acción local de factores como el FCI-I.
- La activina y la inhibina sensibilizaran las células foliculares a la estimulación de gonadotropinas, compensando la mencionada disminución de FSH⁹⁶.

VII.- La activina y la folistatina son péptidos relacionados estructuralmente a la inhibina, su estructura primaria se conserva entre las especies en un porcentaje mayor de 97. Además, aunque se expresa en diferentes tejidos, su principal sitio de producción son las cg⁹⁶.

VIII.- La presencia de la inhibina a lo largo del ciclo menstrual normal se ha confirmado por varios autores ^{72, 78,84,86}; observándose dos picos ⁸⁶; uno a medio ciclo y otro en la fase luteal media; con niveles más altos en ésta última. Lo anterior confirma que en el humano el cuerpo lúteo es una fuente de inhibina, hecho considerado como único en primates.

- Las concentraciones de inhibina durante la fase folicular y el período periovulatorio son más bajas en mujeres de edad avanzada.

- A mitad del ciclo, los niveles aumentan y alcanzan un pico máximo cuando la LH es máxima.

- Durante la fase luteal las concentraciones periféricas de inhibina aumentan y disminuyen paralelamente a los esteroides.

- Las concentraciones de inhibina durante el embarazo mostraron ser más altas que en el ciclo menstrual normal ⁹², con variaciones durante el período gestacional.

En base a éstos datos, es importante conocer los niveles foliculares y séricos de la inhibina en pacientes sometidas a inducción ovular múltiple en la etapa de recuperación de los ovocitos, para correlacionarlas con el estado de madurez de éstos y tener un pronóstico más certero de su evolución en los procedimientos de GIFT y FIV.

APENDICE DE METODOLOGIAS Y CONCEPTOS EMPLEADOS EN EL TEXTO.

Azul de Affi-gel.- Método convencional para la purificación de foliculostatina que se utiliza para remover del 60 al 80% de las proteínas séricas en el FFP. Seguido de una filtración por gel e incubación con antisuero polimerizado contra suero barrow, que reduce la concentración de la proteína a muy bajos niveles mientras que sigue manteniendo la actividad biológica (Williams y col., 1979⁵).

Fluido de ascitis.- Líquido seroso que se produce en algunos tumores y llena cavidades.

Método de inactivación radioactiva.- Método utilizado para calcular el peso molecular de la foliculostatina. Basado en que cualquier radiación ionizante que choque con una molécula biológicamente activa causará su inactivación (teoría de un sólo choque); la probabilidad del golpe es función del volúmen blanco que a su vez es función del peso molecular de la proteína involucrada. Requiere que el material proteico a probar se encuentre en forma seca⁵.

Ultracentrifugación en gradiente de sucrosa.- Método utilizado para determinar el peso molecular de la foliculostatina en el que el precipitado de etanol se coloca en un gradiente de sucrosa de 5-25% (pH 7.4). De manera similar se trata una mezcla de marcadores de peso molecular conocido. Después de la ultracentrifugación (200,000 g por 8 horas), las fracciones se prueban en el ensayo *in vivo* contra un precipitado de etanol como estándar⁵.

Matrices de afinidad.- Método convencional utilizado para la purificación de la foliculostatina basado en que el FFB se une a una columna de Matriz de Gel rojo A a pH 7.0, que se puede eluir con 1.2M KCl. Obteniendo 95 % de recuperación de la actividad de con un factor de purificación de 20 a 25 veces. La fracción activa se transfiere a fenil sefarosa. La actividad se eluye con 8M de urea, la fracción activa así recuperada se une a una agarosa w-aminohexil y puede ser diluida con 0.25M de NaCl. Se obtiene así una recuperación total de 39.5%. El paso final incluye cromatografía en una columna de concavalina A (Jansen y col., 1981⁵).

Metodo para cultivar anticuerpos monoclonales¹⁷.- Fuente y preparación de la inhibina ovárica para la inmunización: Se emplearon ratas hembras Sprague-Dawley (22-28 días de edad), inyectadas con PMSG. Los ovarios fueron colectados 3 días más tarde y lavados con solución salina. Los folículos se rompieron por presión. la preparación de tejido ovárico se centrifugó y se colectó el sobrenadante, que contenía fluido folicular. El FF fué extraído con carbón y polietilen-glicol, centrifugado y probado para bioactividad de inhibina usando un sistema de cultivo de células de pituitaria. Inmunización y producción de anticuerpos monoclonales: Ratonas hembras adultos se inyectaron subcutáneamente con preparación de inhibina emulsificada en adyuvante de Freund's después se les inyectó i.p. 2 veces en intervalos de 2 semanas con la misma preparación. Tres semanas después de la última inyección se sacrificó un ratón inmunizado, sus células del bazo se colectaron y se mezclaron con células de mieloma de ratón. Esta mezcla se cultivó en medio RPM1 1604. Los hibridomas fueron clonados por cultivo de células aisladas. Las células se seleccionaron para el clonado en base a reacciones de tinción con secciones ováricas de rata y por reacción negativa con secciones de bazo y riñón. Análisis de anticuerpos monoclonales a inhibina ovárica de rata: El medio de cultivo de los hibridomas se analizó para anticuerpos monoclonales de inhibina ovárica de rata usando 2 procedimientos diferentes. Anticuerpos para células de granulosa fueron inicialmente detectados por una técnica indirecta de tinción sobre secciones ováricas de rata ligeramente fijadas y congeladas. Los ovarios fueron colectados de ratas tratadas con PMSG, loavados y fijados en un fijador suave. Las secciones fueron teñidas con el medio de cultivo de los clones de hibridomas, usando peroxidasa conjugadas de rábano como marcadores de inmunoglobulinas de conejo anti-ratón.

Factor Transformador de crecimiento.- Polipéptido homodimérico con peso molecular de 25,000 encontrado en altas concentraciones en plaquetas⁵⁷.

Proteína inductora de la esteroideogénesis (PIE): Método utilizado por Khan y col. para aislarla a partir de fluido folicular ovárico humano ⁷¹. - Las proteínas de fluido folicular humano se calientan a 60° C, se precipitan con 80% de sulfato de amonio y se dialisan; después se fraccionan con cromatografía de gel en Sephacryl S-200. La bioactividad se eluyó en la región con peso molecular entre 40 y 60 K. Posteriormente, la SIP se purificó mediante cromatografía de afinidad en Sepharosa (CL-6B), electroforesis de microzona con gradientes de sucrosa, cromatografía de intercambio aniónico en Mono-Q usando un sistema rápido de cromatografía líquida de proteínas y cromatografía de gel en Superose 12.

Técnica de hibridación histoquímica.- Técnica para investigar la distribución celular del ARNm en las subunidades de la inhibina⁵². Muestras de prueba de ³²P ADnc en solución amortiguadora de hibridación se aplican a cada sección de ovario (previamente cortada, lavada y fijada) y se cubre con un cubre objetos. Los portaobjetos son suspendidos en solución amortiguadora de hibridación en una charola de plástico sellada a 37° C por 3 días. Los cubreobjetos se remueven enjuagando en 2 X SSC (Citrate Salino Estándar; 1 X SSC; 0.1 M-NaCl, 0.015 M-citrato trisódico) y las secciones se lavan en 2 X SSC durante 30 min, 1 X SSC durante 15 min a 37° C y 0.5 X SSC durante 30 min a 37° C. Los portaobjetos se lavan en etanol dos veces, se secan y colocan bajo "Iiford XAR X-ray film" toda la noche antes de meterlos en "Iiford G-5 nuclear emulsion" (1:1 v/v con agua destilada) y expuestos de 2-4 semanas a 4° C. Los portaobjetos se ven en microscópio bajo condensadores de campo claro y obscuro.

INDICE DE ABREVIATURAS

ABP	Proteína de unión a andrógenos
AIA	Actividad Inhibidora de Aromatasa
BLO	Ovariectomía bilateral
CG	Células de la granulosa
CGL	Células de la granulosa luteinizadas
CGN	Células de la granulosa no luteinizadas
CHX	Cicloheximida
DES	Diethylstilbestrol
EGP DSS	= SDS PAGE
FCI-I	Factor de Crecimiento parecido a insulina
FDE	Factor de Diferenciación Eritroide
FEC	Factor Epidérmico de crecimiento
FF	Fluido folicular
FFb	Fluido folicular bovino
FFh	Fluido folicular humano
FFo	Fluido folicular de ovino
FFp	Fluido folicular porcino
FIV	Fertilización in vitro
FIVTE	Fertilización in vitro y transferencia intrauterina de embriones
FPLC	Cromatografía Rápida de Fase Líquida
FRP	Proteína Liberadora de FSH = activina
FRR	Foliculo reclutado recientemente
FRT	Fluido de rete testis
FSP	Folistatina
FSH	Hormona foliculo estimulante
FTCB	Factor Transformador de crecimiento beta
GIFT	Transferencia de gametos a las Trompas de Falopio
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
hMG	Gonadotropina Menopáusica humana
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
hr	humana recombinante

ip	intraperitonealmente
ir	inmunoreactiva
IRMA	Prueba Inmunoradiométrica
IUU	Inseminación intrauterina
LH	Hormona luteinizante
Mr	Resonancia magnética
OTLP	Proteína de Linfa Testicular de Ovino
OTLS	Substancia de Linfa Testicular de Ovino
OVX	Ovariectomizada
p.c.	post coitum
PCO	Ovario Poliquístico
PG	Prostaglandina
PIE	Proteína Inductora de la Esteroidogenesis
PM	Peso molecular
PMSF	Fluoruro de Fenilmetilsulfoni
PMSG	Gonadotropina de Siero de yegua embarazada
PRF	Proteína Reguladora del Foliculo
PRL	Prolactina
PVI	Peptido Vasoactivo Intestinal
PVP	Polyvinyl pyrrolidona
RIA	Radioinmunoensayo
SDS-PAGE	Electrophoresis en Gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
sc	Subcutánea
TE	Transferencia de Embriones
ULO	Ovariectomia Unilateral

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Tozzini I. R.; R. L. Pineda. (1988). Fisiología del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal en la edad reproductiva de la mujer. En: Avances en Reproducción Humana. Edit. Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pp 333.
- 2.- Junqueira L. C.; J. Carneiro; A. Contopoulos. (1977). Basic Histology. Lange Medical Publications. California, U.S.A. pp 467.
- 3.- Meisami E.; P. S. Timiras. (1989). Handbook of human growth and developmental biology. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. Vol 2:part A pp 350.
- 4.- Franchimont, P., A. Demoulin, J. Verstraelen-Proyard, M. T. Hazee-Hagelstein, J. P. Bourguignon. (1980) Inhibine: Nouvelle hormone gonadique. Mise au Point 41:3-19.
- 5.- Rosemary, R. Grady, M. C. Chalesworth and N. B. Schwartz. (1982). Characterization of the FSH-suppressing activity in follicular fluid. Recent Progress in Hormone Research 38:409-447.
- 6.- De Jong & Robertson. (1985). Inhibin: 1985 update on action and purification. Molecular and Cellular Endocrinology 42:95-103.
- 7.- Rivier C., W. Vale, J. Rivier. (1987). Studies of the inhibin family of hormones: a review. Hormone Research 28:104-118.
- 8.- Baker, H. W. G., W. Eddie, R. E. Higginson, B. Hudson and H. D. Niall. (1982). Studies on the purification of ovine inhibin. Annals New York Academy of Sciences 3(83):329-344.
- 9.- Baker H. W. G., H. G. Burger, D. M. de Kretser, J. K. Findlay, B. Hudson, V. W. K. Lee and C. G. Tsonis. (1983). Present status of research on inhibin: an appraisal. Clinical Reproduction and Fertility 2: 161-174.
- 10.- Vijayalakshmi, S., A. H. Bandivdekar, Lata R. Joshi, S. B. Moodbidri & A.R. Sheth. (1980). Isolation and characterization of ovine testicular and ovarian inhibin. Archives of Andrology 5:179-188.
- 11.- Robertson D. M.; L. M. Foulds; L. Leversha; F. J. Morgan; M. T. W. Hearn; H. G. Burger; R. E. H. Wettenhall; D. M. de Kretser. (1985). Isolation of inhibin from bovine follicular fluid. Biochemical and Biophysical Research Communications 126(1):220-226.

- 12.- Ling N.; S. Ying; N. Ueno; F. Esch; L. Denoroy; R. Guillemin. (1985). Isolation and partial characterization of a Mr 32,000 protein with inhibin activity from porcine follicular fluid. Proc. Natl. Acad. Sci (U.S.A) 82:7217-7221.
- 13.- Moodbidri S. B., A. Y. Vaze & A. R. Sheth. (1980). Measurement of Inhibin. Archives of Andrology 5:295-303.
- 14.- Sheth, A. R., R. V. Geeta, A. Y. Vaze & A. N. Thakur. (1980). Negative feedback of secretion of follicle-stimulating hormone by the pituitary gland of developing male rats. J. Endocr. 87:401-407.
- 15.- Channing, C. P., K. Tanabe, C. K. Turner and G. D. Hodgen. (1982). Antisera to porcine follicular fluid in monkeys: Neutralization of human and pig inhibin activity *in vivo* and *in vitro*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 55(3):481-486.
- 16.- van Dijk S., J. Steenbergen, J. Th. Gielen, F. H. de Jong. (1986). Sexual dimorphism in immunoneutralization of bioactivity of rat and ovine inhibin. Journal of Endocrinology 111(2):255-261.
- 17.- Lee V. W. K., N. C. Kraft, R. C. Atkins, H. G. Burger. (1986). Monoclonal antibody to rat ovarian inhibin. Journal of Endocrinology 109(5):379-383.
- 18.- Li Ch. H.; R. Gleen Hammonds; Jr. K. Ramasharma; D. Chung. (1985). Human seminal alfa inhibins: isolation, characterization and structure. Proc. Natl. Acad. Sci (U.S.A) 82:4041-4044.
- 19.- Forage R. G., J. M. Ring, R. W. Brown, B. V. McInerney, G. S. Cobon, R. P. Gregson, D. M. Robertson, F. J. Morgan, M. T. Hearn, J. K. Findlay, R. E. H. Wettenhall, H. G. Burger, D. M. de Kretser. (1986). Cloning and sequence analysis of cDNA species coding for the two subunits of inhibin from bovine follicular fluid. Proc. Natl. Acad. Sci. U-S-A 83(10):3091-3095.
- 20.- Murray-McIntosh R. P., M. Vos, M. P. Lacy. (1991). Bovine inhibin immediately inhibits the electrophysiological response to chorionic gonadotropin in ovarian follicles of *Xenopus laevis*. Endocrinology 128(6):3310-3312.
- 21.- Tsonis C. G.; P.J. Sharp; A. S. McNeilly. (1988). Inhibin bioactivity and pituitary cell mitogenic activity from cultured chicken ovarian granulosa and

- thecal/stromal cells. Journal of Endocrinology 116:293-299.
- 22.- Demoulin A., J. Verstraelen-Proyard, J.P. Bourguignon, J. Hustin, L. Koulischer, R. Bologne, P. Franchimont. (1980). Origine et sites d'action de l'inhibine. Annales d'Endocrinologie (Paris) 41:291-302.
- 23.- Lee V. W. K., J. McMaster, H. Quigg and L. Leversha. (1982). Ovarian and circulating inhibin levels in immature female rats treated with gonadotropin and after castration. Endocrinology 111(6):1849-1854.
- 24.- Cummins L. J., T. O'Shea, B. M. Bindon, V. W. K. Lee, and J. K. Findlay. (1983). Ovarian inhibin content and sensitivity to inhibin in Booroola and control strain Merino ewes. Journal of Reproduction and Fertility 67: 1-7.
- 25.- Sander H. J.; H. M. A. Meijls-Roelofs; P. Kramer; E. C. M. van Leeuwen. (1985). Inhibin-like activity in ovarian homogenates of prepubertal female rats and its physiological significance. Journal of Endocrinology 107:251-257.
- 26.- Ishida H., H. Tashiro, M. Watanabe, N. Fujii, H. Yoshida, K. Imamura, S. Minowada, M. Shinohara, K. Fukutani, Y. Aso, D. M. de Kretser. (1990). Measurement of inhibin concentrations in men: Study of changes after castration and comparison with androgen levels in testicular tissue, spermatic venous blood, and peripheral venous blood. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 70(4):1019-1022.
- 27.- Scott, R. S., H. G. Burger & H. Quigg. (1980). A simple and rapid *in vitro* bioassay for inhibin. Endocrinology 107(5):1536-1542.
- 28.- Hermans, W. P., E. C. M. van Leeuwen, M. H. M. Debetes, H. J. Sander and F. H. de Jong. (1982). Estimation of inhibin like activity in spent medium from rat ovarian granulosa cells during long-term culture. Molecular and Cellular Endocrinology 27:277-290.
- 29.- Scott R. S.; H. G. Burger. (1981). Mechanism of action of inhibin. Biology of Reproduction 24:541-550.
- 30.- Goodman, Arnold L. (1984). *In vitro* evidence of a role for inhibin in female rabbits. American Journal of Physiology 246(3 pt 1): E243-8.
- 31.- Lumpkin M.; A. Negro-Vilar; P. Franchimont; S. McCann. (1981). Evidence for a hypothalamic site of action of

- inhibin to suppress FSH release. Endocrinology 108(3):1101-1104.
- 32.- Au, C. L.; D. M. Robertson; D. M. de Kretser. (1985). Effects of hypophysectomy and subsequent FSH and testosterone treatment on inhibin production by adult rat testes. Journal of Endocrinology 105:1-6.
- 33.- Tsutsumi I., J. Toppari, J. D. Campeau, G. S. diZerega. (1987). Reduction of fertility in the male rat by systemic treatment with follicle regulatory protein. Fertility and Sterility 47(4):689-695.
- 34.- Henderson K. M. and P. Franchimont. (1983). Inhibin production by bovine ovarian tissues *in vitro* and its regulation by androgens. Journal of Reproduction and Fertility 67:291-298.
- 35.- Massicotte J., L. Legacé, M. Godbout and F. Labrie. (1984) Modulation of rat pituitary gonadotropin secretion by porcine granulosa cell "inhibin", LH releasing hormone and sex steroids in rat anterior pituitary cells in culture. Journal of Endocrinology 100(2): 133-140.
- 36.- Bicsak T. A., E. M. Tucker, S. Cappel, J. Vaughan, J. Rivier, W. Vale, A. J. W. Hsueh. (1986). Hormonal regulation of granulosa cell inhibin biosynthesis. Endocrinology 119(6):2711-2719.
- 37.- Baird D. T., B. K. Campbell, A. S. McNeilly. (1990). Ovine follicular fluid suppresses the ovarian secretion of androgens, oestradiol and inhibin. Journal of Endocrinology 127:23-32.
- 38.- Martin T. L., R. L. Fogwell, J. J. Ireland. (1990). Concentrations of inhibins and steroids in follicular fluid during development of dominant follicles in heifers. Biology of Reproduction 44:693-700.
- 39.- Kimura Junpei, Masao Katoh, Kazuyoshi Taya and Shuji Sasamoto. (1983). An inverse relationship between inhibin and follicle-stimulating hormone during the period of ovulation induced by human chorionic gonadotrophin in dioestrus rats. Journal of Endocrinology Ltd 97: 313-318.
- 40.- Billiar R. B., D. W. Richardson, B. Little. (1991). Reduced serum inhibin concentrations during ovulatory cycles of estrogen-treated rhesus monkeys: an indicator of FSH bioactivity. Endocrinology 128(5):2280-2284.

- 41.- Zhang Z.; V. W. K. Lee; R. S. Carson; H. G. Burger. (1988b). Selective control of rat granulosa cell inhibin production by FSH and LH *in vitro*. Molecular and Cellular Endocrinology 56:35-40.
- 42.- Mittukrishna S., P. G. Knight. (1990). Effects of crude and highly purified bovine inhibin (M_r 32,000 form) on gonadotropin production by ovine pituitary cells *in vitro*: inhibin enhances gonadotropin-releasing hormone-induced release of LH. Journal of Endocrinology 127:149-159.
- 43.- Rivier C., R. Schwall, A. Mason, L. Burton, J. Vaughan, W. Vale. (1991). Effect of recombinant inhibin on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion in the rat. Endocrinology 128(3):1548-1554.
- 44.- Brannian J. D.; R. L. Stouffer; T. A. Molskness; Y. A. Chandrasekhar; A. Sarkissian; K. D. Dahl. (1992). Inhibin production by macaque granulosa cells from pre- and periovulatory follicles: regulation by gonadotropins and prostaglandin E_2 . Biology of Reproduction 46:451-457.
- 45.- Kaneko H.; G. Watanabe; K. Taya; S. Sasamoto. (1992). Changes in peripheral levels of bioactive and immunoreactive inhibin, estradiol 17-beta, progesterone, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone associated with follicular development in cows induced to superovulate with equine chorionic gonadotropin. Biology of Reproduction 47:76-82.
- 46.- Sander H. J., E. C. M. van Leeuwen and F. H. de Jong. (1984). Inhibin-like activity in media from cultured rat granulosa cells collected throughout the oestrous cycle. Journal of Endocrinology 103:77-84.
- 47.- Tsonis C. G., Helen Quigg, V. W. K. Lee, Lorraine Leversha, A. O. Trounson and J. K. Findlay. (1983). Inhibin in individual ovine follicles in relation to diameter and atresia. Journal of Reproduction and Fertility Ltd 67:83-90.
- 48.- Henderson K. M., P. Franchimont, Ch. Charlet-renard and K. P. McNatty. (1984). Effect of follicular atresia on inhibin production by bovine granulosa cells *in vitro* and inhibin concentrations in the follicular fluid. Journal of Reproduction and Fertility. 72(1):1-8.
- 49.- Ultee-van Gessel A. M.; F. G. Leemborg; F. H. de Jong; H. J. van der Molen. (1985). Influence of neonatal hemicastration on *in vitro* secretion of inhibin,

gonadotrophins and testicular steroids in male rats. Journal of Endocrinology 106:259-265.

- 50.- Einspanier R., L. Pitzel, W. Wuttke, G. Hagendorff, K. Preub, E. Kardalidou, K. H. Scheit. (1986). Demonstration of mRNAs for oxytocin and prolactin in porcine granulosa and luteal cells. FEBS 204(1):37-40.
- 51.- Torney A. H., Y. M. Hodgson, R. Forege, D. M. Kretser. (1989). Follicular localization of inhibin mRNA in the bovine ovary by in-situ hybridization. Journal of Reproduction and Fertility 86:391-399.
- 52.- Turner I. M., P. T. K. Saunders, S. Shimasaki, S. G. Hillier. (1989). Regulation of inhibin subunit gene expression by FSH and estradiol in cultured rat granulosa cells. Endocrinology 125(5):2790-2792.
- 53.- D'Angostino J., T. K. Woodruff, K. E. Mayo, N. B. Schwartz. (1989) Unilateral ovariectomy increases inhibin messenger ribonucleic acid levels in newly recruited follicles. Endocrinology 124(1):310-317.
- 54.- Attardi B., H. S. Keeping, S. J. Winters, F. Kotsuji, P. Troen. (1991). Comparison of the effects of cycloheximide and inhibin on the gonadotropin subunit messenger ribonucleic acids. Endocrinology 128(1):119-125.
- 55.- Franchimont P., M. T. Hazez-Hagelstein, Ch. Charlet-Renard, J. M. Jaspar. (1986). Effect of mouse epidermal growth factor on DNA and protein synthesis, progesterone and inhibin production by bovine granulosa cells in culture. Acta Endocrinologica 111(1):122-127.
- 56.- Hasegawa Y.; K. Miyamoto; Y. Abe; T. Nakamura; H. Sugino, Y. Eto; H. Shibai; M. Igarashi. (1988). Induction of follicle stimulating hormone receptor by erythroid differentiation factor on rat granulosa cell. Biochemical and Biophysical Research Communications 156(2):668-674.
- 57.- Dodson W. C. & D. W. Schomberg. (1987). The effect of transforming growth factor-beta on follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. Endocrinology 120(2):512-516.
- 58.- Zhang Z.; J. K. Findlay; R. S. Carson; A. C. Herington; H. G. Burger. (1988a). Transforming growth factor Beta enhances basal and FSH-stimulated inhibin

production by rat granulosa cells *in vitro*. Molecular and Cellular Endocrinology 58:161-166.

- 59.- Zhiwen Z., R. S. Carson, A. C. Herington, V. W. K. Lee, H. G. Burger. (1987). Follicle-stimulating hormone and Somatomedin-C stimulate inhibin production by rat granulosa cells *in vitro*. Endocrinology 120(4):1633-1638.
- 60.- McLachlan R., K. D. Dahl, W. J. Bremner, R. Schwall, Ch. H. Schmelzer, A. J. Mason, R. A. Steiner. (1989). Recombinant human activin-A stimulates basal FSH and GnRH-stimulated FSH and LH release in the adult male macaque, *Macaca fascicularis*. Endocrinology 125(5):2787-2789.
- 61.- Nakatani A., S. Shimasaki, L. V. dePaolo, G. F. Erickson, N. Ling. (1991). Cyclic changes in follistatin messenger ribonucleic acid and its protein in the rat ovary during the estrous cycle. Endocrinology 129(2):603-611.
- 62.- Shintani Y., Y. Takada, R. Yamasaki, S. Sairo. (1991). Radioimmunoassay for activin A/EDF. Method and measurement of immunoreactive activin A/EDF levels in various biological materials. Journal of Immunological Methods 137:267-274.
- 63.- Roberts V. J., P. E. Sawchenko, W. Vale. (1991). Expression of inhibin/activin subunit messenger ribonucleic acids during rat embryogenesis. Endocrinology 128(6):3122-3129.
- 64.- Shimonaka M., S. Inouye, S. Shimasaki, N. Ling. (1991). Follistatin binds to both activin and inhibin through the common beta-subunit. Endocrinology 128(6):3313-3315.
- 65.- dePaolo L., M. Shimonaka, R. H. Schwall, N. Ling. (1991). *In vivo* comparison of the follicle-stimulating hormone-suppressing activity of follistatin and inhibin in ovariectomized rats. Endocrinology 128(2):668-674.
- 66.- Nakamura T.; Y. Hasegawa; K. Sugino; K. Kogawa; K. Titani; H. Sugino. (1992). Follistatin inhibits activin-induced differentiation of rat follicular granulosa cells *in vitro*. Biochemica et Biophysica Acta 1135:103-109.
- 67.- Xiao S.; D. M. Robertson; J. K. Findlay. (1992). Effects of activin and follicle-stimulating hormone (FSH)-suppressing activity protein/follistatin on FSH

- receptors and differentiation of cultured rat granulosa cells. Endocrinology 1313:1009-1016.
- 68.- Chappel, S. C., J. A. John & H. G. Spies. (1980). Inhibin: Differences in bioactivity within human follicular fluid in the follicular and luteal stages of the menstrual cycle. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 163:310-314.
- 69.- Navot, D., E. J. Margalioth, Z. Rosenwaks. (1987). Prognostic assessment of female fecundity. The Lancet September 19:645-647.
- 70.- Bremner W. J.; C. J. Bagatell, R. T. McLachlan, A. M. Matsumoto; J. S. Tenover; M. R. Soules. (1990). Central control of inhibin secretion in human beings. In: Symposium on neuroendocrine regulation of reproduction. Edited by: Samuel S.C. Yen and Wylie W. Vale. Sero Symposia U.S.A., Norwell, Massachusetts pp189-193.
- 71.- Khan S. A., C. Keck, T. Gudermann, E. Nieschlag. (1990). Isolation of a protein from human ovarian follicular fluid which exerts major stimulatory effects on *in vitro* steroid production of testicular, ovarian, and adrenal cells. Endocrinology 126(6):3043-3052.
- 72.- Baird D. T.; H. M. Fraser; S. G. Hillier; P. J. Illingworth; A. S. McNeilly; K. Reddi; K. Smith. (1990). Production and secretion of ovarian inhibin in women. In: Symposium on neuroendocrine regulation of reproduction. Edited by: Samuel S.C. Yen and Wylie W. Vale. Sero Symposia U.S.A., Norwell, Massachusetts pp195-205.
- 73.- McLachlan R. I., D. L. Healy, D. M. Robertson, D. M. de Kretser, H. G. Burger. (1986). Plasma inhibin levels during gonadotropin-induced ovarian hyperstimulation for IVF: a new index of follicular function?. The Lancet May 31:1233-1234.
- 74.- Lefèvre B., A. Demoulin, J. Testart, R. Frydman, M. López, R. Lambotte, P. Franchimont. (1986). Absence of predictive value of follicular inhibin on the results of human *in vitro* fertilization. Fertility and Sterility 46(2):325-327.
- 75.- Hillier G., E. J. Wickings, P. T. K. Saunders, A. F. Dixon, S. Shimasaki, A. Swanston, L. E. Reicher Jr, A. S. McNeilly. (1989). Control of inhibin production by primate granulosa cells. Journal of Endocrinology 123:65-73.

- 76.- Hillier S. G.; E. L. Yong; P. J. Illington, D. T. Baird, R. H. Schwall. (1991a). Effect of recombinant inhibin on androgen synthesis in cultured human thecal cells. Molecular and Cellular Endocrinology 75:R1-R6.
- 77.- Hillier S. G.; E.L. Yong; P. J. Illington, D. T. Baird, R. H. Schwall; A. J. Mason. (1991). Effect of recombinant activin androgen synthesis in cultured human thecal cells. Journal of Clinical Endocrinology 72(6):1206-1211.
- 78.- McLachlan R. I.; D. M. Robertson; D. L. Healy; H. G. Burger; D. M. De Kretser. (1987). Circulating immunoreactive inhibin levels during the normal human menstrual cycle. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 65(5):954-961.
- 79.- Robertson D. M.; C. G. Tsonis; R. I. McLachlan; D. J. Handelsman; R. Leask; D. T. Baird; A. S. McNeilly; S. Hayward; D. L. Healy; J. K. Findlay, H. G. Burger; D. M. De Kretser. (1988). Comparison of inhibin immunological and *in vitro* biological activities in human serum. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 67(3):438-443.
- 80.- Ackland J., J. D'Angostino, S. J. Ringstrom, J. P. Hostetler, B. G. Mann, N. B. Schwartz. (1990). Circulating radioimmunoassayable inhibin during periods of transient follicle-stimulating hormone rise: secondary surge and unilateral ovariectomy. Biology of Reproduction 43:347-352.
- 81.- Knight P. G., N. Groome, A. J. Beard. (1991). Development of a two-site immunoradiometric assay for dimeric inhibin using antibodies against chemically synthesised fragments of the alpha and beta subunit. Journal of Endocrinology 129:R9-R12.
- 82.- Schwartz N. B. (1991). Why I was told not to study inhibin and what I did about it?. Endocrinology 129 (4):1690-1691.
- 83.- Channing C. P.; P. Gagliano; D. J. Hoover; K. Tanabe; S. K. Batta; J. Sulewski; P. Lebech. (1981). Relationship between human follicular fluid inhibin F activity and steroid content. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 52(6):1193-1198.
- 84.- Channing C. P.; P. Gagliano; K. Tanabe; A. Fortuny, J. Cortés-Prieto. (1985). Demonstration of a gradient in inhibin activity, estrogen, progesterone, and delta⁴ androstenedione in follicular fluid, ovarian vein blood of normal women. Fertility and Sterility 43(1):142-145.

- 85.- Tsonis C. G.; S. G. Hillier; D. T. Baird. (1987). Production of inhibin bioactivity by human granulosa-lutein cells: stimulation by LH and testosterone in vitro. Journal of Endocrinology 112:R11-R14.
- 86.- Lenton E. A.; D. M. De Kretser; A. J. Woodward; D. M. Robertson. (1991). Inhibin concentrations throughout the menstrual cycles of normal, infertile, and older women compared with those during spontaneous conception cycles. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 73(6):1180-1190.
- 87.- Franchimont P., M. T. Hazeé-Hagelstein, C. Charlet-Renard, J. M. Jaspard, A. Hazout, J. Salat-Baroux, B. Shatz, F. Demerlé. (1990). Correlation between follicular fluid content and the results of in vitro fertilization and embryo transfer. II. Inhibin and aromatase inhibitor activity. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 71(3):748-754.
- 88.- diZerega Gere S, Joseph D. Campeau, Robert N. Nakamura, Eryn L. Ujita, Rogerio Lobo, and Richard P. Marrs. (1983). Activity of a human follicular fluid protein(s) in spontaneous and induced ovarian cycles. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 57(4):838-846.
- 89.- Chari S.; E. Daume; G. Sturm; H. Vaupel; I. Schüler. (1985). Regulators of steroid secretion and inhibin activity in human ovarian follicular fluid. Molecular and Cellular Endocrinology 41:137-145.
- 90.- Marrs Richard P., R. Lobo, J. D. Campeau, R. M. Nakamura, J. Brown, E. L. Ujita and G. S. diZerega. (1984). Correlation of human follicular fluid inhibin activity with spontaneous and induced follicle maturation. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 58(4):704-709.
- 91.- Tanabe Kiyoo, Pat Gagliano, Cornelia P. Channing, Yukio Nakamura, Yasunori Yoshimura, Rihachi Iizuka, Albert Fortuny, Joan Sulewski, and Nasser Rezai. (1983). Levels of inhibin-F activity and steroids in human follicular fluid from normal women and women with polycystic ovarian disease. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 57(1):24-31.
- 92.- Abe Y.; Y. Hasegawa; K. Miyamoto; M. Yamaguchi; A. Andoh; Y. Ibuki; M. Igarashi. (1990). High concentrations of plasma immunoreactive inhibin during normal pregnancy in women. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 71(1):133-137.

- 93.- Qu J; L. Vankrieken; C. Brulet; K. Thomas. (1991). Circulating bioactive inhibin levels during human pregnancy. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 72(4):862-866.
- 94.- Norman R. J.; J. W. McLoughlin; G. M. Borthwick; T. Yohkaichiya; C. D. Matthews; A. H. MacLennan; D. M. de Kretser. (1993). Inhibin and relaxin concentrations in early singleton, multiple, and failing pregnancy: relationship to gonadotropin and steroid profiles. Fertility and Sterility 59(1):130-137.
- 95.- Rabinovici J.; S. J. Spencer; N. Doldi; P. C. Goldsmith; R. Schwall; R. B. Jaffe. (1992). Activin-A as an intraovarian modulator: actions, localization, and regulation of the intact dimer in human ovarian cells. Journal of Clinical Investigation 5:1528-1536.
- 96.- Findlay J. K. (1993). An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. Biology of Reproduction 48:15-23.