

01674  
35



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**EFFECTO DE LA LEPTINA EN LA ESTEROIDOGÉNESIS Y  
MULTIPLICACIÓN DE CÉLULAS DE LA *TECA IN VITRO***

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**ANA DELIA RODRÍGUEZ CORTEZ**

**TUTOR**

**DR. CARLOS G. GUTIÉRREZ AGUILAR**

**COMITÉ TUTORAL:**

**DRA. ROSA MARÍA PÁRAMO RAMÍREZ**

**DR. FERNANDO LARREA GALLO**

**MÉXICO D.F.**

**2003**

**1**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

# **PAGINACIÓN DISCONTINUA**

De pronto tuve conciencia de que ese momento, de que esa rebanada de cotidianidad, era el grado máximo de bienestar, era la Dicha. Nunca había sido tan plenamente feliz como en ese momento, pero tenía la hiriente sensación de que nunca más volvería a serlo, por lo menos en ese grado, con esa intensidad. La cumbre es así, claro que es así. Además estoy seguro de que la cumbre es sólo un segundo, un breve segundo, un destello instantáneo, y no hay derecho a prórroga

**Mario Benedetti**

2

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONTENIDO

	PÁG.
DECLARACION	II
DEDICATORIAS	III
AGRADECIMIENTOS	IV
RESUMEN	V
SUMMARY	VI
INDICE DE FIGURAS	VII
<i>I</i> INTRODUCCIÓN	1
<i>II</i> ANTECEDENTES	7
Leptina	7
Receptores y vías de señalización	8
MAPK, ERK, PI3K	11
Autorregulación	12
Efectos locales de leptina en el ovario	13
Factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF)	15
Insulina	17
<i>III</i> HIPÓTESIS Y OBJETIVO	19
<i>IV</i> MATERIAL Y MÉTODOS	20
Materiales	20
Cultivo celular	21
Diseños experimentales	22
Efecto de la LH en la producción de esteroides	22
Determinación del efecto de la leptina y su interacción con LH, LH/IGF-I, o IGF-I	23
Conteo de células	23
Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas para testosterona y progesterona	24
Análisis Estadístico	25
<i>V</i> RESULTADOS	26
Efectos de la LH en la producción de testosterona	26
Efectos de la LH en la producción de progesterona	26

Efectos de la LH en la relación testosterona: progesterona	27
Efectos de la LH en el número de células	28
Efecto de leptina y su interacción con IGF, LH y LH/IGF en la producción de testosterona	28
Efecto de leptina y su interacción con IGF I, LH y LH/IGF I en la producción de progesterona	29
Efecto de leptina y su interacción con IGF I, LH y LH/IGF I en la relación testosterona: progesterona (T:P)	29
Efecto de leptina y su interacción con IGF I, LH y LH/IGF I en el número de células	30
<b>VI DISCUSIÓN</b>	40
Conclusiones	48
<b>VII REFERENCIAS</b>	50

4

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## DECLARACIÓN

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.



---

*Ana Delia Rodríguez Cortez*

## DEDICATORIAS

A ti Mamita, fuente infinita de amor que siempre estás a mi lado para darme el cariñoso aliento para seguir, a ti que me has formado, a ti, que soy el vivo reflejo de tus actos, de tus aciertos y desaciertos, gracias a ti estoy aquí.

A ti Papá que con tu esfuerzo diario y tu cariño haces posible que yo esté aquí y quien con esta enseñanza me muestra que el único camino a la meta es el trabajo arduo y constante.

A mi Padrino Carlos que a veces ha tenido que echarse a cuestras la responsabilidad de una hija más y quien me ha enseñado las bendiciones de saber dar.

A ti Lalo, por ser el mejor hermano, que además de cariño y apoyo me has enseñado a construir sueños con cimientos firmes. Y por supuesto, a tu familia, quien es la extensión de tu amor, la que ha venido a complementar tu vida y quienes me demuestran cariño y su apoyo incondicional.

Y a ti Coquis, por estar aquí y ser mi ahora, a ti que me alientas a llegar a la cima, a no darme por vencida, a no caer... y si caigo, quien me motiva y es el motivo para seguir.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca crédito que me fue otorgada en el período comprendido de agosto 2000 a julio del 2002. Apoyo importante y trascendental para la obtención del grado de Maestría.

A los H. miembros del Jurado: Dr. Javier Valencia Méndez, Dra. Rosa María Páramo Ramírez, Dr. Fernando Larrea Gallo, Dr. Héctor Vera Ávila y Dr. Carlos Gutiérrez Aguilar por el tiempo invertido y los valiosos comentarios que permitieron el enriquecimiento de este documento.

Al Dr. Carlos Gutiérrez Aguilar por enseñarme a cada paso a emprender la marcha; a Lucy y Arantza quienes con cariño y apoyo me enseñaron a vencer obstáculos, quienes están al lado, guiando mis pasos y evitando que me paralicen las caídas.

A mi amiga Cipatli, quien me demostró con creces que la amistad también está hecha de esas horas en silencio y de trabajo, sin tu ayuda no lo hubiera logrado.

A mis amigos: Arturo, Isauro, Raúl, Claudia Romero, Claudia Villanueva, Sinuhé, Beatriz, Javier, Dulce, Nico, Agustín, Margarita, Silvia, Toñito, Noé, Laura, Esperanza, César, Cristián, y Luz María, quienes con su apoyo, cariño y estímulo hacen más ligera la carga que se trae a cuestas.

A Susy, Clara y Gerardo, por su empuje, sus consejos, su enseñanza y sobretodo, por su amistad.

A Bonji, quien con su compañía en las noches de desvelo me demuestra día a día, con paciencia, que el cariño y la amistad no sólo es cuestión humana.

## RESUMEN

**Efecto de la leptina en la esteroidogénesis y multiplicación de células de la teca *in vitro*.** Rodríguez-Cortez AD, Gutiérrez CG, Larrea GF, Páramo RRM. El propósito del presente trabajo fue investigar los efectos de la leptina sobre la producción de testosterona y la multiplicación de células de la teca *in vitro*. Se realizaron 3 cultivos subsecuentes e independientes de células de la teca para probar diferentes dosis de leptina (0, 0.1, 1, 10 y 100ng/ml) y sus interacciones con 1ng/ml de IGF-I, 0.1 ng/ml de LH o 1ng/ml de IGF-I y 0.1ng/ml de LH. A los grupos control no se les agregó LH, ni IGF-I. Las concentraciones de testosterona y progesterona se determinaron por el método de ELISA, a las 72 y 120 horas de cultivo. El número de células se evaluó por medio de tinción con MTT a las 168 horas. La leptina a dosis fisiológicas (0.1 a 1 ng/ml) estimuló la producción de progesterona, mientras que a dosis superiores ejerció un efecto inhibitorio, este efecto sólo fue observado en presencia de IGF-I ( $P < 0.01$ ). No hubo efecto de leptina en la producción de testosterona ( $P > 0.05$ ) por células de la teca en los dos periodos de tiempo estudiados. La leptina estimuló el número celular en forma dosis dependiente hasta los 10 ng/ml ( $P < 0.01$ ). Cuando al cultivo se le adicionó IGF-I, el número de células aumentó con respecto al control en ausencia de leptina. Sin embargo, la acción conjunta de leptina e IGF-I provocó una disminución de las células de la teca al final del cultivo ( $P < 0.01$ ) a las 168 horas. Este es el primer trabajo que muestra evidencia *in vitro* del efecto de la leptina en la producción de esteroides y en el número de células de la teca de bovino en cultivo no luteinizado. Se pudo determinar que existe una respuesta bifásica a la acción de la leptina en la producción de progesterona. Adicionalmente, se demostró que el efecto inhibitorio de la leptina a dosis suprafisiológicas, en la producción de progesterona, no es directo, ya que inhibe la acción estimulante del factor de crecimiento IGF-I.

**Palabras clave:** Leptina, esteroidogénesis, IGF-I, células de la teca.

## SUMMARY

The purpose of the present work was to investigate the effect of leptin on steroid production and multiplication of bovine theca cells *in vitro*. Three subsequent and independent theca cell cultures were used to test different doses of leptin (0, 0.1, 1, 10 and 100ng/ml) and its interactions with 1ng/ml of IGF-I, 0.1 ng/ml of LH or 1ng/ml of IGF-I and 0.1ng/ml of LH. Control groups only contained the different doses of leptin. Testosterone and progesterone levels were measured by ELISA at 72 and 120 hrs of culture. Cell number was determined by MTT stain at 168 hours. Physiological doses of leptin (0.1 to 1 ng/ml) stimulated the production of progesterone. In contrast, higher doses exercised an inhibitory effect on progesterone production when in conjunction with IGF-I ( $P < 0.01$ ). There was no effect of leptin on testosterone production ( $P > 0.05$ ). Leptin increased the number of cells in culture up to the 10 ng/ml dose ( $P < 0.01$ ). When IGF-I was added in absence of leptin, the cell number also increased. However, the combined action of leptin and IGF-I caused a decrease of theca cell number at the end of the culture ( $P < 0.01$ ) at 168 hrs. This is the first work that demonstrates an *in vitro* effect of leptin on steroid production and theca cell multiplication on a non luteinized bovine culture. It was possible to determine a biphasic response to leptin on progesterone production. Additionally, it was determined that the inhibitory effect of leptin at supraphysiological doses on progesterone production is through the blockage of the stimulatory action of IGF-I.

**Key words:** Leptin, steroidogenesis, IGF-I, theca cells.

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	31
Efecto de LH a concentraciones de 0, 0.1, 1 y 10 ng/ml en la producción de testosterona en células de la teca de bovino	
<b>Figura 2</b>	32
Efecto de la LH a concentraciones de 0, 0.1, 1 y 10 ng/ml en la producción de progesterona en células de la teca de bovino	
<b>Figura 3</b>	33
Efecto de LH a concentraciones de 0, 0.1, 1 y 10 ng/ml y la relación testosterona: progesterona en células de la teca de bovino	
<b>Figura 4</b>	34
Efecto de LH a concentraciones de 0, 0.1, 1 y 10 ng/ml en el número de células de teca de bovino	
<b>Figura 5</b>	35
Efecto de leptina en concentraciones de 0, 0.1, 1, 10 y 100 ng/ml y su interacción con 0.1 ng/ml de LH ó 1ng/ml de IGF ó 0.1ng/ml de LH y 1 ng/ml de IGF y en el grupo control en la producción de testosterona	
<b>Figura 6</b>	36
Efecto de leptina en concentraciones de 0, 0.1, 1, 10 y 100 ng/ml y su interacción con 0.1 ng/ml de LH ó 1ng/ml de IGF ó 0.1ng/ml de LH y 1 ng/ml de IGF y en el grupo control en la producción de progesterona	
<b>Figura 7</b>	37
Efecto de Leptina en concentraciones de 0, 0.1, 1, 10 y 100 ng/ml y su interacción con 0.1 ng/ml de LH ó 1ng/ml de IGF ó 0.1ng/ml de LH y 1 ng/ml de IGF y en el grupo control en la relación testosterona:progesterona	
<b>Figura 8</b>	38
Efecto de Leptina en concentraciones de 0, 0.1, 1, 10 y 100 ng/ml y su interacción con 0.1 ng/ml de LH ó 1ng/ml de IGF ó 0.1ng/ml de LH y 1 ng/ml de IGF-I y en el grupo control en el numero de células	
<b>Figura 9</b>	39
Cultivo de células de la teca de bovino con 0.1 y 10 ng/ml de LH	

# EFFECTO DE LA LEPTINA EN LA ESTEROIDOGÉNESIS Y MULTIPLICACIÓN DE CÉLULAS DE LA TECA *IN VITRO*

## I. INTRODUCCIÓN

Algunos estudios previos han centrado su atención en la asociación entre el balance energético negativo (BEN), la baja fertilidad y la pérdida de la ciclicidad, ya que los procesos reproductivos son de baja prioridad comparados con funciones que ocupan un lugar preponderante para el animal como son el metabolismo basal, la actividad, y el crecimiento (Reist *et al.*, 2003, Grimard *et al.*, 1997).

El BEN disminuye la secreción de la hormona luteinizante (LH) y reduce el crecimiento folicular. En contraste, se ha observado que un periodo de sobrealimentación estimula el crecimiento folicular, incrementa la tasa de fertilización y reduce la muerte embrionaria (Khireddine *et al.*, 1998).

La relación entre homeostasis energética y reproducción, tuvo sus inicios con la "hipótesis metabólica", la cual involucraba el concepto de que la capacidad reproductiva está modulada por señales provenientes de la disponibilidad del combustible metabólico. Es decir, que el contenido de grasa corporal, la ingestión de alimentos, la temperatura ambiente y el ejercicio, no actúan de manera independiente sino que interactúan controlando la función reproductiva. Lo anterior explica porqué en casos de privación crónica de alimento o en situaciones en las que el gasto energético supera al consumo y las reservas de glucógeno y grasa corporal han sido abatidas, se inhibe la ciclicidad reproductiva. Esta condición puede observarse en algunos trastornos como la anorexia nerviosa en humanos, el ejercicio prolongado o la exposición a temperaturas extremas (De Mora *et al.*, 2001 y Burks *et al.*, 2000).

Sin embargo, a partir de las investigaciones de Kennedy en 1953, donde postuló que había señales proporcionales a la grasa corporal que regulaban el apetito a través del cerebro, se permitió conceptualizar la denominada “teoría lipostática”, la cual propone que la reproducción y la ingestión de comida están coordinadas por un monitor hipotético del contenido de grasa corporal (Henson, 2000).

Con el objeto de demostrar esta teoría, Hervey *et al.* (1959) utilizaron un modelo parabiótico, en el que unieron crónicamente un par de ratas. Suturando los músculos y peritoneos de ambos animales, para permitir que los capilares se interconectaran, sin que los grandes vasos sanguíneos se unieran. Con dicha unión se logra el intercambio continuo de fluidos vasculares de una animal al otro, el cambio es lento y sólo las moléculas con una vida promedio larga pueden pasar de un lado a otro (Casanueva *et al.*, 1999).

Para el modelo parabiótico Hervey *et al.*, (1959) utilizaron un ratón delgado normal y un ratón obeso, que crearon gracias a una lesión causada en hipotálamo ventromedial, la cual ocasionaba hiperfagia. Con este modelo observaron que los ratones delgados se tornaban afáticos. Estos resultados indicaron que los depósitos de grasa producían un factor que inducía saciedad y que era transferido por medio de la sangre hacia su pareja. Sin embargo, este efecto no se observaba en el animal lesionado, sugiriendo entonces que el receptor para dicho factor de saciedad se encontraba a nivel hipotalámico (Casanueva *et al.*, 1999).

Estudios posteriores, con ratones parabióticos de Lane *et al.* (1959), demostraron que la esterilidad presente en los ratones con mutación recesiva en el gen 6 de la obesidad (ratones *ob/ob*) (Casanueva *et al.*, 1999 y Tartaglia *et al.*, 1995) no era causada por un defecto en los órganos reproductivos periféricos, si no por una anomalía en la región hipotálamo-pituitaria (Chehab *et al.*, 2000). Para ello Lane *et al.* (1959) unieron ratones normales ovariectomizados con ratones *ob/ob*, y estudiaron sus respuestas hipotálamo-pituitarias, evaluando si la depleción de estrógenos ováricos causaba hipersecreción de las hormonas gonadotrópicas. Y demostraron que los animales *ob/ob* tenían la función ovárica intacta y

que ovularon en respuesta a la sobredosis de gonadotropinas de la pareja castrada (Chehab *et al.*, 2000).

Estas investigaciones permitieron suponer que la disminución en la eficiencia reproductiva y en el desarrollo folicular, se correlacionaba con cambios en los niveles séricos de varias hormonas y metabolitos. Así, durante la última década surgieron estudios acerca de las hormonas lipostáticas, es decir, hormonas secretadas desde la periferia, cuya producción se relaciona directamente con el contenido de grasa corporal. Este contenido de grasa proporciona la información al Sistema Nervioso Central (SNC) para regular el apetito y la reproducción. El factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-I), la insulina y la leptina son considerados como hormonas lipostáticas (De Mora *et al.*, 2001 y Burks *et al.*, 2000; Reist *et al.*, 2003).

La insulina es una hormona secretada por las células  $\beta$  del páncreas, que ha sido considerada como una señal metabólica, ya que regula la homeostasis de la glucosa mediante la estimulación de su incorporación por los tejidos periféricos, la inhibición de su producción por el hígado, y la supresión de ácidos grasos por el tejido adiposo. Aunque el músculo, el hígado y el tejido graso son los tejidos más sensibles a la insulina, ésta también ejerce una influencia directa en la fisiología del ovario. La insulina tiene un efecto estimulante en la síntesis de esteroides por las células de la granulosa y de la teca, e interactúa con las gonadotropinas de una forma sinérgica (De Mora *et al.*, 2001 y Luna-Pinto and Cronjé, 2000).

El IGF-I al igual que la insulina, regula una amplia variedad de efectos metabólicos y efectos relacionados con el crecimiento de tejidos, incluyendo: la estimulación del transporte de glucosa, la síntesis de glucógeno, la inhibición de la gluconeogénesis hepática, la estimulación de la lipogénesis y antilipólisis en los adipocitos, la transcripción y traducción de genes, el efecto antiapoptótico, la promoción de la diferenciación y la replicación celular. Adicionalmente el IGF-I ha sido implicado como un importante

regulador del desarrollo embrionario y posnatal, posiblemente desempeñando un papel mitogénico. A nivel ovárico, se le ha imputado un efecto en el desarrollo del folículo, en donde estimula la esteroidogénesis de las células de la granulosa y de la teca (De Mora *et al.*, 2001 y Luna-Pinto and Cronjé, 2000).

En el año 1994, cuando Zhang, *et al.*, clonaron el gene *Ob* (de la obesidad) del ratón y su homólogo en el humano, identificaron como su producto proteínico a la leptina.

La leptina es una hormona de 167 aminoácidos, que lleva señales acerca de los almacenes de energía hacia el hipotálamo. Es secretada por los adipocitos, por el epitelio gástrico y por la placenta (Chehab *et al.*, 2000, Botella *et al.*, 2001, Ahima *et al.*, 2000). Su concentración presenta dimorfismo sexual, con mayores niveles en mujeres que en hombres. Esto puede deberse a su alta expresión en el tejido adiposo subcutáneo, el cual existe en mayor cantidad en mujeres y a su regulación por los esteroides sexuales, donde los estrógenos estimulan su secreción y los andrógenos la inhiben (Ahima *et al.*, 2000). Su concentración en plasma oscila entre los 2 y 100 ng/ml siendo menor en los individuos delgados que en los que tienen sobrepeso (Spicer and Francisco, 1997).

La leptina señala a través del acoplamiento de receptores de secuencia homóloga a la familia de receptores citocinas clase I, existen 6 isoformas del receptor: Ob-Rb (forma larga), OB-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Rf y Ob-Re (formas cortas, siendo este último el que carece de dominio transmembranal y que se ha especulado que sea la forma soluble que funcione como proteína transportadora) (Tartaglia., 1997; Prolo *et al.*, 1999, López *et al.*, 2000 y Heshka and Jones, 2001).

Consistentemente con el rol de leptina para controlar el consumo de alimento y el metabolismo energético, los receptores de leptina se encuentran en los centros del hipotálamo responsables de la saciedad (Botella *et al.*, 2001). Además, los receptores de leptina exhiben una amplia distribución en diversos tejidos de los mamíferos, incluyendo

hígado, corazón, riñón, pulmón, intestino delgado, bazo, páncreas, tejido adiposo, testículo y ovario. Así, la leptina puede tener efectos periféricos fundamentales para el metabolismo y la reproducción y no únicamente un papel central (Ruíz-Cortés *et al.*, 2000).

Posiblemente, exista un efecto directo de la leptina en la reproducción, pues se tiene evidencia que indica la relación entre leptina y LH. La administración de leptina exógena durante la desnutrición mejora la función reproductiva, al evitar la supresión de los pulsos de LH, incluso en ausencia de estrógenos, lo que implica una actividad directa y central de leptina sobre gonadotropinas o GnRH (Botella *et al.*, 2001). Los ratones obesos *ob/ob* son infértiles y también incapaces de sintetizar leptina, en tanto que las ratas *fa/fa* Zucker, que también son obesas y estériles, son incapaces de responder al efecto de esta hormona, por carecer de receptores funcionales. En los ratones *ob/ob* al suministrar sobredosis de leptina provoca una disminución dosis-dependiente del peso corporal debido a la hipofagia y se restablece la actividad gonadal (Casanueva *et al.*, 1999; Ahima *et al.*, 2000 y Khireddine *et al.*, 1998).

Sin embargo, la presencia de la hormona y de sus receptores (formas cortas) en el ovario han llevado a sugerir que la leptina tiene un potencial para ser un factor con efecto directo a nivel gonadal (Ruíz-Cortés *et al.*, 2000). Estudios *in vitro* han sugerido efectos estimulatorios (Ruíz-Cortés *et al.*, 2000 y 2003, Kitawaki *et al.*, 1999) e inhibitorios del proceso de crecimiento y desarrollo folicular por leptina (Agarwal *et al.*, 1999; Zachow and Magoffin, 1997, Zachow *et al.*, 1999 y Spicer and Francisco, 1997).

Los estudios que mencionan efectos inhibitorios, indican que la leptina afecta negativamente la función ovárica, al inhibir la esteroidogénesis en cultivos de células de la teca y de la granulosa bovina (Spicer and Francisco 1997, Spicer and Francisco 1998, Spicer *et al.*, 2000, Agarwal *et al.*, 1999 y Duggal *et al.*, 2000), granulosa de rata (Zachow and Magoffin, 1997, Zachow *et al.*, 1999) y granulosa humana (Clarke and Henry, 1999).

Esto sugiere que las formas cortas del receptor de leptina (las más abundantes en ovario) actúan de forma predominantemente negativa (Clarke and Henry, 1999).

Otros trabajos indican efectos estimulatorios de la leptina directamente en el ovario. El grupo de Kitawaki *et al.* (1999) demostró que dosis bajas de leptina (0.5 a 10 ng/ml) estimulan la actividad aromataasa en cultivos de células de la granulosa en humanos. Así mismo, Ruíz-Cortés *et al.* muestran que en cultivos de células de la granulosa porcina el efecto de la leptina a dosis de hasta 10 ng/ml es estimulatorio, pero a dosis de 1000 ng/ml es inhibitorio. Por ello, el propósito del presente trabajo es investigar los efectos directos de la leptina sobre la producción de testosterona y la multiplicación de células de la teca *in vitro*.

## II. ANTECEDENTES

### LEPTINA

Del griego leptos = delgado, se expresa y se secreta por los adipocitos, reflejando la cantidad de reservas grasas del organismo. De hecho, se ha observado que las concentraciones de leptina son mayores en los individuos con sobrepeso (10-100 ng/ml), que en los delgados (2-10 ng/ml) (Botella *et al.*, 2001; Spicer and Francisco, 1997). Existe también un dimorfismo sexual, presentándose niveles mayores en mujeres que en hombres, esto puede deberse a que se ha observado una mayor expresión de leptina en el tejido adiposo subcutáneo que en el visceral, el cual existe en mayor cantidad en mujeres. Así mismo, existe una posible regulación por esteroides sexuales, donde los estrógenos estimulan su secreción y los andrógenos la inhiben (Vicennati *et al.*, 1998, Ahima *et al.*, 2000 y Moschos *et al.*, 2002; Prolo *et al.*, 1999).

La leptina humana tiene un ritmo circadiano de secreción, con un pico nocturno y una pulsatilidad de alrededor de 32 pulsos por día, existiendo una reserva rápida con una vida media de 3.4 minutos y otra larga con una vida media de 71 minutos (Botella *et al.*, 2001; Prolo *et al.*, 1999, Casanueva and Diéguez, 1999).

El gen de la leptina se encuentra en el cromosoma 7q31.3 en humanos y tiene más de 15000 pb, con 3 exones y 2 intrones. Estos últimos codifican para una proteína inmadura de 167 aminoácidos que se encuentra unida a una secuencia señal hidrofóbica compuesta por 21 aminoácidos. La translocación de la leptina a los microsomas es seguida de la remoción de la secuencia señal, secretándose al torrente sanguíneo como una forma libre de 146 aminoácidos (Botella *et al.*, 2001; Moschos *et al.*, 2002; Prolo *et al.*, 1999). Esta proteína madura puede viajar como tal o unirse a una forma soluble del receptor Ob- Re o a una  $\alpha$  2 macroglobulina (Botella *et al.*, 2001; Casanueva and Diéguez, 1999).

La leptina es una proteína no glicosilada con un peso molecular de 14 a 16KDa, altamente conservada, ya que la homología entre la leptina humana y ratón es del 84%, mientras que con la rata es de 83%. Su estructura terciaria revela un bucle de 4 hélices, similar a la cadena helicoidal de la familia de las citocinas que incluye a las Interleucinas 2, IL6, IL11, IL12 LIF, G-CSF y la oncostatina M, lo que les permite actuar a través de receptores que pertenecen a esta superfamilia (Karlsson *et al.*, 1997; Prolo *et al.*, 1999; Martín-Romero y Sánchez-Margalet, 2001).

### RECEPTORES Y RUTAS DE SEÑALIZACIÓN

El receptor de la leptina fue identificado en 1995 por Tartaglia *et al.* utilizando leptina marcada con  $^{125}$ I y evidenciando su presencia en los plexos coroideos del ratón. Los receptores se encuentran concentrados en el Sistema Nervioso Central (hipotálamo, plexos coroideos y leptomeninges) y en los tejidos periféricos (células de la granulosa y de la teca, placenta, hepatocitos, adipocitos, fibroblastos, pulmón, riñón, células musculares estriadas y células sanguíneas). El gen que codifica para el receptor de la leptina en el ser humano se ha identificado en el cromosoma 4, región 4p32, en el sitio donde se encuentra la mutación en los ratones con característica diabética (db/db) (Ghilardi and Skoda, 1997; Tartaglia, 1997, Ruiz Cortés *et al.*, 2000 y Duggal *et al.*, 2002).

El receptor para la leptina se denomina OB-R, y es un miembro de la superfamilia de las citocinas clase I. Existen 6 isoformas conocidas (OB-Ra, OB-Rb, OB-Rc, OB-Rd, Ob-Re y Ob-Rf), estas proteínas son idénticas en su secuencia extracelular (816 aminoácidos), en el dominio transmembranal (34 aminoácidos) y en los primeros 29 aminoácidos intracitoplasmáticos, pero la secuencia que sigue difiere después del aminoácido K889, resultando en 5 secuencias C terminales de aminoácidos que tienen diferente longitud (Ghilardi and Skoda, 1997, Tartaglia *et al.*, 1995). Una isoforma que carece de dominio transmembranal se ha propuesto como la forma soluble (Ob-Re) (Tartaglia, 1997).

La homología en la secuencia extra y transmembranal entre los receptores para leptina en especies como humanos, ratón, rata, oveja y vaca, varían entre el 45 y 90%. Sin embargo, únicamente la forma larga del dominio citoplasmático con 302 aminoácidos, denominada OB-Rb conserva los motifs box 1 y 2, los cuales son esenciales para la señalización inducida por leptina. Las partes citoplasmáticas de este receptor carecen de dominios enzimáticos, en su lugar, para señalizar se asocian con tirosinas cinasas citoplasmáticas, de la familia Janus cinasas 2 (JAK 2) (Ghilardi and Skoda, 1997).

La unión del ligando a su receptor permite la homodimerización del propio receptor, esta unión de leptina OB-R permite la transfosforilación y activación de JAK (Janus Cinasas), lo que da inicio a la cascada de señalización. Una vez activada esta proteína, será la encargada de activar las rutas STAT (señal transducida por activadores de transcripción) (Ghilardi *et al.*, 1995, Bjorbaek *et al.*, 1997 y Bjorbaek *et al.*, 2001), ras/MAP cinasas (proteín cinasas con actividad mitogénica), ERK (cinasas reguladas por señales extracelulares) o PI3K (fosfoinositol 3 cinasa) (Ghilardi and Skoda, 1997; Prolo *et al.*, 1999, Bjorbaek *et al.*, 1997 y 2001, Brann *et al.*, 2002 y Duggal *et al.*, 2002).

La oligomerización del complejo OB-Rb y JAK 2 a través del estímulo unión ligando-receptor, puede ser un paso crucial en la iniciación de la cascada de señalización (Ghilardi and Skoda, 1997). Esta activación ocurre cuando JAK se une a los motifs box 1 y box 2 del dominio intracitoplasmático. La activación de JAK, induce a su vez la fosforilación de las tirosinas 985 y 1138 del dominio intracitoplasmático del OB-Rb. La fosforilación de ambas tirosinas, estimula la unión de SH2 (proteínas src homólogas 2) al aminoácido Tyr 985 activado y de STAT 3 a la Tyr 1138 activadas (Bjorbaek *et al.*, 2001 y Brann *et al.*, 2002). Las tirosinas activadas son sitios de unión para las SH2, este dominio contiene actividad fosfatasa (SHP2). Es así que, la fosforilación de SHP2, provoca la unión de una proteína GRB 2, resultando en la activación de la vía Ras/Raf, MAPK/ERK (Ghilardi and Skoda, 1997; Brann *et al.*, 2002).

La activación MAPK/ERK transloca al núcleo, donde induce la transcripción de genes de respuesta inmediata como c-jun, c-fos, B-jun y egr-1. C-fos y c-jun, que pertenecen a la familia de oncogenes que codifican proteínas nucleares fos y jun. Estas proteínas pueden actuar como factores de transcripción, ambas conforman un heterodímero para formar la Proteína Activadora 1 (AP1), la cual tiene efectos directos sobre la actividad mitogénica (Szanto *et al.*, 2000, Becker *et al.*, 1995). De igual forma, la ruta activada ERK se ha observado correlacionada de forma negativa con la expresión de StAR (enzima reguladora aguda de la esteroidogénesis), es probable que esta regulación negativa ocurra a nivel del gen DAX 1, o por algunos otros factores de transcripción aún no determinados (Seger *et al.*, 2001). Sin embargo, también se ha observado que ERK estimula a SF 1 (Factor esteroidogénico 1), un miembro de la familia de receptores huérfanos nucleares, los cuales juegan un papel importante en la expresión de múltiples enzimas de la cadena esteroidogénica, incluyendo la P450 esteroide hidroxilasa y StAR (Lala *et al.*, 1997, Gyles *et al.*, 2001 y Dewi *et al.*, 2002).

Siguiendo la ruta de señalización por vía JAK, se ha observado que STAT 3 activado dimeriza y transloca al núcleo, donde induce la transcripción de genes responsivos a STAT 3, incluyendo SOCS 3. Este estímulo al gen, provoca la translocación de la proteína socs3 al citoplasma (Ghilardi *et al.*, 1995; Bjorbaek *et al.*, 1997 y Brann *et al.*, 2002). El mismo STAT 3 tiene la capacidad de estimular una mayor maduración de la proteína reguladora de unión al elemento de respuesta 1 (SREBP 1) por el retículo endoplásmico rugoso (Ruiz-Cortés *et al.*, 2003). Las SREBP 1 y 2 estimulan la activación del gene promotor de StAR, sin embargo, la activación por sí sola es débil, por lo que se hace necesaria la presencia de cofactores de transcripción ubicuotos, como Sp1 y el NF-Y (factor nuclear Y). Las proteínas SREBP se unen a los elementos reguladores de esteroides (SER s), localizados en regiones promotoras de genes como StAR para sintetizar la enzima esteroidogénica o para inducir la síntesis de ácidos grasos (FAS) (Shea-Eaton *et al.*, 2001 Ruiz Cortés *et al.*, 2003).

El OB-Rb puede activar STAT<sub>3</sub>, 5 y 6 pero no a STAT<sub>1</sub>, 2 y 4, mientras que OB-Ra es inactivo en la señalización de los STAT por carecer del motif-box 2 en el dominio intracitoplasmático (Ghilardi and Skoda, 1997 y Baumann *et al.*, 1996). El receptor corto OB-Ra carece de tirosinas, ha demostrado ser capaz de señalizar por vías que no involucren la fosforilación de STAT (Bjorbaek *et al.*, 1997), sugiriéndose las rutas: MAPK, ERK y PI3K ((Bjorbaek *et al.*, 1997 e Ingvarsen and Boisclair, 2001).

### *MAPK, PI3K y ERK*

Debido a la similitud estructural de los receptores de insulina con los receptores miembros de la superfamilia de las citocinas de clase I (Martín and Sánchez-Margalet., 2001; Takahasi *et al.*, 1997), el sistema OB-R puede interactuar con otros centros reguladores de gasto y consumo de energía, para el control de la grasa corporal. Así, puede ser que como leptina actúe a través de varios componentes de la cascada de señalización de insulina, para modificar los cambios inducidos por la ésta en la expresión de genes, ya sea a nivel del sustrato para el receptor de insulina (IRS1), o de PI3K o MAPK (Szanto *et al.*, 2000).

Se requiere de la activación de JAK para activar las rutas MAPK, ERK e IRS1, se sugiere que JAK 2 es quien provoca la fosforilación de la proteína Shc que subsecuentemente activa la proteína Ras. La otra posibilidad de activación vía MAPK es por medio de IRS1, donde GRB 2 puede interactuar con IRS1 activando Ras (Bjorbaek *et al.*, 1997). La molécula SHP2 actúa como un adaptador molecular para reclutar GRB2 y SOS, miembros de la ruta de señalización Ras/MAPK/ERK. Las funciones como adaptador y fosforilador de esta proteína, pueden ser críticas para la activación de esta ruta (Martín- Romero and Sánchez-Margalet, 2001 y Brann *et al.*, 2002).

También se hace necesaria la fosforilación de tirosina y treonina de MAPK/ERK e IRS 1 para su activación, y en el caso de la unidad reguladora PI3K para que Src pueda asociarse

con p85 o para que pueda unirse con la proteína de mitosis (Sam68) (Martín- Romero and Sánchez-Margalet., 2001; Takahasi *et al.*, 1997 y Tanabe *et al.*, 1997). Sam68, es una proteína que se une al RNA y que se asocia con Src a través de los dominios SH2 y SH3. Sam68 ha mostrado actuar como coprecipitado con varias proteínas que contienen el dominio SH2 como son: Grbc, PLyl, GAP, PI3K y STAT3. (Martín- Romero and Sánchez- Margalet, 2001). Sam68 es fosforilada mediante la disociación del RNA, sin embargo, también puede estar involucrada en la modulación post transcripcional del RNA (Martín- Romero and Sánchez-Margalet, 2001; Szanto *et al.*, 2000).

### *Autorregulación*

La proteína STAT 3 induce así mismo, la transcripción de un supresor de la señalización de citocinas (SOCS 3), es decir, induce la transcripción de un mecanismo que limita la señalización de la Leptina. La familia SOCS se comprende de ocho miembros, los cuales contienen un dominio homólogo Src (SH2) y un box C-terminal. Las proteínas SOCS son inducidas por una amplia variedad de citocinas y su función es inhibir la señal de transducción mediada por ellas mismas, así que actúan como una retroalimentación negativa (Brann *et al.*, 2002).

La proteína socs 3 inhibe la fosforilación de tirosinas de JAK 2 inducida por leptina, previniendo la activación de la ruta JAK-STAT. De igual forma, socs 3 inhibe la señalización de leptina para unirse a la Tyr 985 fosforilada, bloqueando la interacción de este residuo con el SH2 contiene fosfatasa SHP2 (una tirosina fosfatasa), la cual es expresada y actúa generalmente para regular positivamente la señalización de citocinas (Brann *et al.*, 2002).

La administración de leptina periférica induce una rápida elevación de RNAm de SOCS 3 en el hipotálamo. El cual es un potente mediador de la resistencia a leptina en la obesidad

ya que en mamíferos, SOCS 3 bloquea la transducción inducida por leptina (Brann *et al.*, 2002).

### *EFECTOS LOCALES DE LEPTINA EN EL OVARIO*

A la leptina, comúnmente se le han imputado acciones a nivel central como controlador del apetito, del gasto energético y por ende, como regulador de peso corporal (Henson *et al.*, 2000, Moschos *et al.*, 2002, Brann *et al.*, 2002 y Zachow and Magoffin, 1997). Sin embargo, con la demostración de la presencia de la leptina en el ovario y de los receptores OB-Rb y OB-Ra (Cioffi *et al.*, 1997; Karlsson *et al.*, 1997) se iniciaron las hipótesis de un efecto local en la gónada (Ruiz-Cortés *et al.*, 2000).

En 1997 Cioffi *et al.* demostraron la presencia del receptor OB para leptina en el ovario y de la proteína misma en el líquido folicular, en niveles similares a los sanguíneos. Estos hallazgos permitieron hacer las primeras suposiciones de un efecto local. Posteriormente, Karlsson *et al.* (1997) dirigieron sus experimentos para tratar de demostrar la presencia de un efecto local de leptina en la producción de esteroides. Esta investigación logró demostrar que la leptina está presente en el líquido folicular, sin embargo no se detectó la expresión del gene *ob*, descartando con ello, la producción de leptina directamente en el ovario. Adicionalmente, se comprobó la presencia de receptores OB-R, encontrando mayor expresión de las formas cortas del receptor (principalmente OB-Ra), y en menor cantidad, de la forma larga (OB-Rb). De igual forma, se ha demostrado una correlación positiva entre la expresión de receptores de leptina y las cantidades de progesterona asociadas con la luteinización *in vivo* del CL. Estas concentraciones de receptores cortos disminuyen con la regresión lútea, sugiriendo todo esto, que las formas cortas del receptor de leptina actúan de forma predominantemente negativa sobre la producción de estradiol, no así en la producción de progesterona (Clarke and Henry, 1999).

Se han demostrado efectos estimulatorios e inhibitorios de la leptina en la producción de esteroides en células de la granulosa y de la teca del ovario. Para ello, se han realizado experimentos con células de diversas especies como: humano (Karlsson *et al.*, 1997, Agarwal *et al.*, 1999, Kitawaki *et al.*, 1999 y Ghizoni *et al.*, 2001), rata (Zachow and Magoffin 1997 y Zachow *et al.*, 1999), bovino (Spicer *et al.*, 1997 y 1998) y porcino (Ruiz-Cortés *et al.*, 2000 y 2003).

Los efectos inhibitorios de leptina sobre la producción de esteroides demostrados en células de la granulosa por Karlsson *et al.* (1997) y por Spicer and Francisco (1997), así como por Agarwal *et al.* (1999) y Zachow *et al.* (1999), quienes también utilizaron células de la teca, en general han sido encontrados con dosis de leptina superiores a los rangos normales para cada especie. En tanto que, los efectos estimulatorios de leptina sobre la producción de esteroides informados por Kitawaki *et al.* (1999), Ghizoni *et al.* (2001) y Ruiz-Cortés *et al.* (2003) coinciden con los rangos fisiológicos para la especie en estudio.

Esta relación inhibitoria entre dosis de leptina y producción de esteroides coincidía con lo observado en las mujeres con síndrome de ovario poliquístico (SOP), en las que se observaban cantidades elevadas de leptina en sangre, y anovulación (Zachow *et al.*, 1999 y Coronen *et al.*, 2001). Adicionalmente se demostró en estudios *in-vitro* con células de la granulosa provenientes de folículos poliquísticos, que la anovulación era causada por la falta de establecimiento de un ambiente estrogénico ideal, ya que las células de la granulosa de SOP expresaban P450 aromatasa y secretaban estradiol como respuesta a la administración de FSH (Zachow *et al.*, 1999).

Sin embargo, el efecto inhibitorio *per se* de la leptina sobre la producción de esteroides no ha sido demostrado fehacientemente, ya que Zachow *et al.* (1999), Spicer and Francisco (1997), Spicer *et al.* (1998) y Agarwal *et al.* (1999) demostraron que dicha inhibición era producto del bloqueo del efecto estimulante de factores de crecimiento y/o insulina. Esto condujo a suponer que insulina e IGF-I tienen un papel importante como co-gonadotropinas

a nivel ovárico, donde se manifiestan como factores mitogénicos y como estimuladores de la producción de esteroides. El posible mecanismo de la acción inhibitoria de leptina sobre la producción de progesterona y androstenediona estimulada por insulina, no es mediada por la inhibición al receptor de insulina, sino por atenuar la fosforilación del IRS1 (Spicer and Francisco, 1997).

Con respecto a los efectos estimulatorios de leptina en la actividad ovárica, Zamorano *et al.* en 1997 encontraron una regulación a la alta del RNAm de los citocromos P450 scc y P450 17  $\alpha$  hidroxilasa en el ovario. Estudios similares en células de la granulosa luteinizadas de origen humano indicaron que la leptina a dosis bajas (0.5 a 10 ng/ml) estimuló la producción de estrógenos por incrementar la expresión del RNAm y de la enzima P450 aromatasa, con el consecuente aumento de la actividad aromatasa (Kitawaki *et al.*, 1999). Recientemente Ruíz-Cortés *et al.* (2003) mostraron evidencia de que el efecto de la leptina tiene un patrón bifásico, es decir, a dosis de hasta 10 ng/ml es estimulatoria sobre la producción de estradiol, pero a dosis suprafisiológicas de 1000ng/ml es inhibitoria, cuando se utilizó en cultivos de células de la granulosa porcina. El patrón bifásico de leptina puede obedecer a los diferentes estados fisiológicos del ovario, en donde la disponibilidad de receptores promueve la capacidad de ser una vía estimulatoria o inhibitoria, así mismo, la presencia de IGF-I o insulina modifica la respuesta a leptina, mostrando importancia para los diversos procesos reproductivos como el crecimiento folicular o la ovulación.

#### *FACTOR DE CRECIMIENTO PARECIDO A LA INSULINA (IGF I)*

El desarrollo folicular es un proceso que involucra proliferación y diferenciación de los constituyentes foliculares. De manera tradicional, se han mencionado que estos componentes están regulados por gonadotropinas (FSH y LH). Sin embargo, sustancias adicionales de origen ovárico han sido propuestas como reguladores de este proceso. Entre estas sustancias ováricas se encuentran hormonas esteroides (estradiol y progesterona),

polipéptidos (activina, inhibina y follistatina) y factores de crecimiento (IGF's, el factor de crecimiento epidermal (EGF), la sustancia antimuleriana, el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) y factores angiogénicos) (Giudice *et al.*, 1992 y Spicer *et al.*, 2000).

El sistema autocrino/paracrino IGF comprende los péptidos IGF-I e IGF-II, receptores específicos y una familia de proteínas llamadas IGFBPs que regula la disponibilidad de los IGF en los tejidos blanco. Los IGFs I y II, son cadenas polipeptídicas que contienen tres puentes disulfuro, son de bajo peso molecular y estructuralmente están relacionados con la proinsulina (Giudice *et al.*, 1992; Monget y Bondy, 2000; Spicer *et al.*, 2002).

IGF-I e IGF-II como péptidos mitogénicos inducen la expresión celular de protoncogenes, los cuales están íntimamente relacionados con el proceso de proliferación y diferenciación celular. IGF-I se une a su receptor específico de membrana, para inducir la producción de RNAm de c-fos (un protoncogen) y la activación de promotores DNA ribosomales, eventos necesarios para la mitogénesis celular. Así mismo, los efectos del sistema IGF parecen regular el desarrollo folicular y esteroidogénesis solos o en sinergia con gonadotropinas. Se ha demostrado en células de la teca, que IGF-I aumenta la biosíntesis de andrógenos estimulada por LH (Stewart *et al.*, 1995; Zachow and Magoffin, 1997; Caubo *et al.*, 1989; Armstrong *et al.*, 2000).

Con base en los estudios en ratas, se ha visto que este efecto sinérgico entre IGF-I y LH puede deberse al incremento en la expresión de los genes de P450 scc en células intersticiales de la teca, así como de 17  $\alpha$ - hidroxilasa y 3  $\beta$ - hidroxil esteroido deshidrogenasa, de tal modo que al mejorar el precursor de andrógeno en la teca como sustrato, IGF estimula la actividad aromatasas para la producción de estradiol (Giudice *et al.*, 1992; Zachow *et al.*, 1997; Armstrong *et al.*, 2000). Sin embargo, no se ha observado que este sinergismo entre IGF y LH para el incremento de la esteroidogénesis, esté mediado a través del aumento de los sitios de unión para IGF en células de la teca bovina. En cambio,

se ha asociado en parte, al incremento de la expresión de RNAm para los receptores de LH en células de la teca (Stewart *et al.*, 1995; Spicer *et al.*, 2002).

La producción de moléculas sensibilizantes como los IGF1 por los folículos dominantes, aumenta la capacidad de respuesta a los efectos estimulatorios de FSH. De tal modo que dan al folículo dominante una ventaja en el desarrollo con respecto a los otros folículos del grupo, puesto que la FSH disminuye a la mitad del ciclo o en la fase folicular tardía, y el folículo dominante es capaz de continuar creciendo y desarrollándose, mientras que los otros folículos del grupo, con un inadecuado estímulo trófico, quedan bajo atresia. Altas concentraciones de leptina pueden interferir con el desarrollo del folículo dominante al disminuir la cantidad de estrógenos, este efecto puede resultar en un inadecuado estímulo para el pico de LH, impidiendo la conducción del folículo periovulatorio inmaduro a la ovulación, y en casos extremos de ningún folículo (Zachow and Magoffin, 1997).

### *INSULINA*

La insulina además de encontrarse en la circulación ha demostrado estar presente en el líquido folicular y se ha propuesto que tiene la capacidad, al igual que IGF-1, de regular la mitogénesis y de actuar de forma sinérgica con LH para mejorar la producción de androstenediona y progesterona por las células de la teca del bovino (Stewart *et al.*, 1995; Spicer *et al.*, 2002).

La actividad co-gonadotrófica de la insulina con LH, posiblemente esté mediada por la unión a su propio receptor o al receptor IGF-1 (Poretski y Kalin, 1987), ya que la acción de un tratamiento combinado de insulina e IGF-1 no potencializa mucho más, para el caso del número de células de la granulosa, sugiriendo que estas dos hormonas tienen un mecanismo de acción similar para estimular la proliferación celular (Spicer *et al.*, 2002). Sin embargo,

IGF-I parece ser un regulador fisiológico más importante en la esteroidogénesis te cal que insulina (Stewart *et al.*, 1995).

Debido a la contradicción de los estudios realizados hasta la fecha, acerca del efecto de leptina en la producción de testosterona y multiplicación de las células de la teca *in vitro*, así como las interrelaciones planteadas entre leptina e IGF quedan por ser determinadas, ya que son de suma importancia para la actividad reproductiva, puesto que se ha observado deficiencia en fertilidad en animales con sobrepeso y en animales en desnutrición, es por ello que se decidió realizar el presente experimento.

### **III. HIPÓTESIS**

- La leptina actúa inhibiendo el efecto estimulador de la IGF-I sobre la síntesis de esteroides y multiplicación en las células de la teca *in vitro*

### **OBJETIVO**

- Determinar el efecto de la leptina y su interacción con IGF-I en la producción de esteroides y multiplicación de células de la teca *in vitro*.

## IV. MATERIAL Y MÉTODOS

### *MATERIALES*

**Medio de colección:** Medio 199 (Gibco, BRL Life Technologies, Grand Island NY USA), Hepes (Sigma Chemical Co. Ltd., H3784, St Louis MO), penicilina-estreptomicina (Sigma, P 3539 cell culture), anfotericina. **Dissección folicular:** DPBS 1x (Gibco BRL, 14190-144, Life Technologies). **Medio de cultivo:** Medio D-MEM/F12 (Gibco, 12500-039 Invitrogen Corporation), penicilina-estreptomicina (Sigma, P 3539 cell culture), Albúmina Sérica Bovina (Sigma, A 7030), Hepes (Sigma, H3784), Holo-Transferrina (Sigma, T1408), Selenito de Na (Sigma, S9133), estradiol 20 ng/ml, insulina de páncreas bovino (Sigma, I6634). **Digestión enzimática:** Hialuronidasa (Sigma, H3506), Proteasa (Sigma, P2714), Colagenasa (Sigma, C6885), Desoxirribonucleasa (Sigma, D5025). **Lisis osmótica de células rojas:** DPBS sin  $\text{Ca}^{++}$  ni  $\text{Mg}^{++}$  10x (Gibco BRL, 14080-055, Life Technologies). **Viabilidad y conteo celular:** Trypan Blue (Sigma, T 0776) y hematocitómetro de New Bauer. **Cajas de cultivo:** Nunc nalgene (Nunc A/S, Roskilde, Dinamarca) de 96 pozos. **Tratamientos:** Leptina recombinante ovina, LR3-IGF-I (Groppe Pty Ltd; Adelaide, SA), LH ovina (26 NIADDK, Bethesda MD). **Cuantificación celular al final de cultivo:** 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-bromuro de difenil tetrazolium (MTT, Sigma M 5655). **Buffer de Lisis:** Dodecil sulfato de sodio (SDS, Bio Rad, 161 0301), HCl 1.0 N (Sigma, H 9892), NaOH 1.0 N (Sigma, S 2770) y N-N-Dimetil formamida (Sigma, 4254). **ELISA's:** Placas de 96 pozos de poliestireno MaxiSorp (Nunc Immuno Plate), Peroxidasa de rábano para testosterona - 3CMO - HRP y progesterona - 3CMO - HRP fueron proporcionados por Dra. Coralie Munro, Universidad de Davis, Carolina E.U., estándares para testosterona y progesterona y ABTS (Sigma, A1888).

## CULTIVO CELULAR

El cultivo de células de la teca de bovinos se realizó siguiendo el método descrito para células de la teca en el ovino por Campbell *et al.* (1998). Los ovarios de vacas Holstein se obtenían inmediatamente después del sacrificio y se colocaban en solución salina fisiológica (SSF) al 0.9% a una temperatura de 30°C, para ser transportados al laboratorio en un tiempo no mayor a 3 horas. A su llegada al laboratorio, los ovarios se lavaban primero con SSF al 0.9% a 30°C, después con etanol al 70% a 30°C por 30 segundos, y finalmente con más SSF para eliminar el exceso de etanol. Los ovarios se mantenían en medio de colección (Medio 199 con 20mM de Hepes y 100 UI/ml de penicilina, 0.1 mg/ml de estreptomycin y 1 µg/ml de anfotericina a 37°C) hasta la disección folicular.

Los folículos se disecaron y clasificaron de acuerdo a su diámetro externo en pequeños (menores a 4 mm) y medianos (de 4 a 8 mm), esta clasificación obedece a la dependencia a las gonadotropinas y los cambios en la expresión de las enzimas esteroideogénicas y receptores para LH (Xu *et al.*, 1995 y Gutiérrez *et al.*, 1997a). Se tuvo el cuidado de elegir los folículos que aparentaban estar saludables (bien vascularizados y con líquido folicular transparente sin desprendimientos visibles de la membrana granulosa (Stewart *et al.*, 1995)

Después de la disección se aspiraba el líquido folicular utilizando jeringas de 1 ml con aguja calibre 21 de 13 mm. Los folículos eran bipartidos en una caja de Petri conteniendo 5 ml de DPBS<sup>-</sup> y las células de la granulosa se aislaban raspando gentilmente el interior de la pared del folículo. Las membranas resultantes se colocaban en un tubo que contenía una mezcla enzimática de hialuronidasa 1mg/ml (Sigma, H3506), proteasa 1mg/ml (Sigma, P2714) y colagenasa 5mg/ml (Sigma, C6885), bajo movimiento constante a una temperatura de 37°C para favorecer la digestión enzimática. Transcurridos 20 minutos, se adicionaba desoxirribonucleasa 200µl a una concentración de 2mg/ml (Sigma, D5025) y la digestión enzimática continuaba hasta que las células de la teca se dispersaban. La reacción se detenía con la adición de 1ml de suero fetal bovino. El sobrenadante era centrifugado a

1000 rpm durante 10 minutos a 21°C para la obtención del pellet de células de teca. Las células se resuspendían con 9 ml de agua bidestilada estéril, se agitaban por 10 segundos para lisar los eritrocitos presentes y la isotonicidad se restablecía rápidamente por la adición de 1 ml de DPBS- 10x (Glister *et al.*, 2001). Posterior a la tercera centrifugación, las células se resuspendían en 5 ml de medio de cultivo.

La viabilidad de las células obtenidas, se estimó utilizando una tinción de azul Trypan al 0.4% para discriminar y excluir las células muertas. La concentración celular se determinó con un hemocitómetro.

Las células se cultivaron en una densidad de entre 50 y 100 x 10<sup>3</sup> células con 95% de viabilidad por pozo, en cajas de cultivo estériles Nunc nalgene (Nunc A/S, Roskilde, Dinamarca) de 96 pozos, en un volumen de 250µl de medio DMEM/F12 (Médium Eagle Modificado por Dulbecco's: con Mezcla de Nutrientes Ham F12 1:1; Gibco, invitrogen Corporation) suplementado con 15mM de hepes, bicarbonato, 100 UI/ml de penicilina, 0.1mg/ml de estreptomina, 0.1% de BSA, 20µg de estradiol, 2.5µg/ml de transferrina, 4 ng/ml de selenio, en ausencia de suero y adicionado con 10 ng/ml de insulina (Campbell *et al.*, 1998). Las células se incubaban en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 5 ó 7 días, con 70% de recambio del medio a las 72 y 120 horas. El cultivo terminaba a las 168 horas, donde se extraía la última muestra.

## *DISEÑOS EXPERIMENTALES*

### *Efecto de LH en la producción de esteroides*

El efecto de la LH sobre la producción de andrógenos, progesterona y relación testosterona:progesterona en células de la teca de bovino *in vitro*, se estudió en 3 cultivos independientes con células provenientes de folículos pequeños y folículos medianos. Se determinó la dosis óptima de LH que produjera y mantuviera niveles máximos de testosterona. Para ello, cada cultivo contó con 24 réplicas por dosis, las dosis de LH

probadas fueron 0, 0.1, 1 y 10 ng/ml, y las muestras (obtenidas a las 120 y 168 horas) se mantuvieron a  $-11^{\circ}\text{C}$  hasta realizar la determinación de testosterona y progesterona por medio de la prueba de ELISA.

#### ***Determinación del efecto de leptina y su interacción con LH, LH/IGF-I o IGF-I***

Se realizaron tres cultivos subsecuentes e independientes para probar diferentes dosis de leptina recombinante ovina (0, 0.1, 1, 10 y 100 ng/ml) y sus interacciones con 1 ng/ml de IGF-I LR3 (Groppe, Pty Ltd Adelaide, SA) (Grupo IGF-I), 0.1 ng/ml de LH ovina (Grupo LH), la combinación de 0.1 ng/ml de LH y 1 ng/ml de IGF-I (Grupo LH/IGF-I) o la ausencia de LH e IGF-I con las diferentes dosis de leptina (Grupo control). Cada cultivo contenía 4 réplicas para cada tratamiento (la dosis de 0 ng/ml del grupo control fue repetida 8 veces). Las muestras se obtuvieron a las 72 y 120 horas de tiempo de cultivo, las cuales se mantuvieron a  $-11^{\circ}\text{C}$  hasta realizar la determinación de testosterona y progesterona.

#### ***CONTEO DE CÉLULAS***

Al finalizar los cultivos celulares a las 168 horas, se estimó la densidad celular por el método de azul formazán. Este método se basa en la capacidad de las células vivas para reducir la sal de tetrazolium 3-(4-5-dimetiltrazol-2-yl)-2-5-bromuro de difenil tetrazolium (MTT Sigma, M-5655) al producto azul formazán. Esta capacidad de transformación se toma como proporcional al número de células vivas, ya que el MTT se transforma al azul formazán por medio de la enzima succinato-tetrazolium reductasa la cual inicia la cadena respiratoria en la mitocondria y únicamente es activa en células vivas, por ende, esta característica auxilia a discriminar las células viables (Berridge and Tan, 1993).

Para lo anterior, al finalizar el cultivo a las 168, horas se extrajeron 175  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo y se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de MTT (5mg/ml) a la suspensión celular restante en cada pozo. Después de 24 horas de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  las células fueron lisadas con la adición de

100 µl/pozo de buffer de lisis (10% dodecil sulfato de sodio SDS, en 0.01N HCl, 0.01N NaOH y 1:1 de N-Dimetil formamida:agua) se reincubaron 4 horas a 37°C. Los platos eran leídos en un espectrofotómetro Spectra Shell Microplate Reader MRX (Dynatech, Laboratories) a 630 nm. La absorbancia fue relacionada directamente con el número de células vivas, mediante una curva estándar realizada para cada cultivo. Se obtuvo incubando  $5 \times 10^6$  células viables en botellas de cultivo con 10 ml de medio, al que se le añadió MTT y se incubó por 24 horas. Posteriormente se despegaron las células, se lisaron y se realizaron diluciones dobles seriadas para obtener la curva estándar 0, 7800, 15 600, 31 250, 62 500, 125 000, 250 000 y 500 000 células, cada punto de la curva se hizo por sextuplicado.

#### ***ENSAYO INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMAS (ELISA) PARA TESTOSTERONA Y PROGESTERONA***

La producción de testosterona y progesterona se determinó por el método de ELISA de competencia indirecto, utilizando un segundo anticuerpo sin purificar de origen equino a una concentración de 1:300 unido a la fase sólida (placas de 96 pozos de poliestireno MaxiSorp, Nunc Immuno Plate). Después de incubar por una noche a 4°C, se lavaban las placas en cuatro ocasiones, y se incubaban durante 18 a 24 hrs con el anticuerpo específico contra testosterona (1:24000) o progesterona (1:32000) según el caso. Las muestras (1:20), el conjugado a base de peroxidasa de rábano (testosterona-3CMO-HRP 1:30000 y progesterona-3CMO- HRP1:20000) y los estándares se incubaban por 2 horas. Las placas se lavaban y se adicionaba el sustrato (ABTS, 2-2' azino-bis ácido 3-etilbenzo-thiazoline-6-sulfónico) (100 µl por pozo). Posteriormente se incubó una hora más a 30°C y las placas se leyeron en el espectrofotómetro a 405nm. Los datos obtenidos por el espectrofotómetro se analizaron con el programa Universal Assay Zap (Bedolla *et al.*, 1994).

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico para los tratamientos hormonales se realizó por medio de un análisis de varianza, se utilizó el programa estadístico computacional Genstat. Las producciones hormonales medidas fueron expresadas en picogramos (pg) de hormona producida por cada 10 000 células. Cada experimento fue repetido un mínimo de tres veces y la significancia se determinó por análisis de varianza (0.05%) en datos transformados en logaritmo natural (Log n) para las determinaciones de testosterona y progesterona. La transformación de los datos a Log n se realizó para corregir la heterocedasticidad de la varianza, y se revisaron los residuales para verificar que la transformación a Log n corregía la heterocedasticidad. La transformación a Log n no fue necesaria para el análisis del número de células.

El modelo estadístico incluyó como variables dependientes o de respuesta a la producción de testosterona o progesterona, la relación testosterona:progesterona y número de células vivas. Las variables independientes:

- A) Para analizar el efecto de LH: dosis de LH, tiempo de cultivo, tamaño folicular e interacciones dobles y triples.
- B) Para el efecto de leptina: dosis de leptina, cotratamientos (LH, IGF-I, LH/IGF-I y grupo control), tiempo de cultivo, tamaño folicular e interacciones dobles, triples y cuádruples.

Así mismo, como variables aleatorias se consideró al cultivo y los pozos. El análisis estadístico para determinar el efecto en el número de células incluyó a las células sembradas al inicio del cultivo como covariable.

## V. RESULTADOS

### *EFECTO DE LH EN LA PRODUCCIÓN DE TESTOSTERONA*

En general, la LH a concentraciones de 0.1 ng/ml estimuló la producción de testosterona, mientras que a concentraciones mayores causó una disminución altamente significativa ( $P < 0.01$ ) (*Figura 1*). Sin embargo, hubo una interacción significativa entre la concentración de LH y el tiempo de cultivo ( $P < 0.01$ ), ya que a las 120 horas de cultivo, todas las dosis de LH estimularon la producción de testosterona en ambos tamaños foliculares. En contraste, a las 168 horas de cultivo, las concentraciones mayores de LH (1 y 10 ng/ml) produjeron un descenso en la producción de testosterona comparado con la concentración de 0.1 ng/ml de LH ( $P < 0.01$ ) y con la cantidad producida con las mismas dosis a las 120 horas de cultivo ( $P < 0.01$ ) (*Figura 1*).

No hubo diferencia estadísticamente significativa en la producción de testosterona debido al tamaño folicular ( $P > 0.05$ ), ni en la respuesta a la LH debido al tamaño de foliculo ( $P > 0.05$ ).

### *EFECTO DE LH EN LA PRODUCCIÓN DE PROGESTERONA*

En forma general, se observó que la LH estimuló la producción de progesterona y que los incrementos fueron estadísticamente significativos en forma dosis dependiente a la concentración de LH ( $P < 0.01$ ). Sin embargo, a las 168 horas de cultivo, con la dosis de 0.1 ng/ml de LH la producción de progesterona disminuyó en un 18% en los folículos pequeños y un 50% en los folículos medianos, con respecto a la cantidad producida a las 120 horas.

En contraste, con dosis de 1 y 10 ng/ml de LH, la producción de progesterona en folículos pequeños a las 120 horas fue, respectivamente de 148 y 232 veces superior a la producción observada por células sin el estímulo de LH ( $P < 0.01$ ). Para las 168 horas, dentro del mismo tamaño folicular y con las mismas dosis, la producción de progesterona aumentó 133 y 164 veces más, que para las células sin LH. En el caso de los folículos medianos, a las 120 horas se observó un aumento de apenas 19.7 y 26 veces más, para las dosis de 1 y 10 ng/ml respectivamente en comparación con las células control (0 ng/ml de LH). Para el mismo tamaño folicular, a las 168 horas, dicho aumento fue 35 y 42 veces mayor, con respecto a las células con ausencia de estímulo de LH (*Figura 2*).

No hubo diferencias estadísticamente significativas en la producción de progesterona entre los diferentes tamaños foliculares utilizados ( $P > 0.05$ ).

#### *EFECTO DE LH EN LA RELACIÓN TESTOSTERONA: PROGESTERONA (T:P)*

La relación en la producción de testosterona:progesterona se muestra en la *Figura 3*. Existe un efecto estadísticamente significativo en la relación T:P de acuerdo a las concentraciones de LH, tiempo de cultivo y tamaño de folículo ( $P < 0.01$ ).

Las concentraciones de 1 y 10 ng/ml de LH causaron una disminución en la relación T:P en de 43 y 45% para las 120 horas en los folículos pequeños. Resultados similares se observaron a las 168 horas, donde la disminución fue de 49.5 y 52% en el mismo tamaño folicular. Las mismas concentraciones disminuyeron 31 y 32% la relación T:P en folículos medianos a las 120 horas y se redujeron en un 42 y 43% a las 168 horas de cultivo, en comparación con las células sin LH. En cambio, la dosis de 0.1 ng/ml produjo un aumento de un 10% para las 120 horas y 30% para las 168 horas en folículos pequeños, comparadas con las células con ausencia de LH. En el caso de los folículos medianos, se observa una

disminución del 9% a las 120 horas y un aumento del 10% de la relación T:P a las 168 horas de cultivo, en comparación con las células que no estuvieron bajo el estímulo hormonal de LH, indicando esto, que a concentraciones superiores a 0.1 ng/ml de LH se presenta luteinización de las células.

#### *EFFECTO DE LH EN EL NÚMERO DE CÉLULAS*

El número de células de la teca después de 168 horas de cultivo se presenta en la *Figura 4*. En general, puede observarse que la LH produjo un descenso en el número de células ( $P < 0.01$ ) provenientes de folículos pequeños y medianos, conforme aumentaba la concentración de LH.

Con base a los resultados anteriores, se estableció la dosis de 0.1 ng/ml de LH para los cultivos subsecuentes.

#### *EFFECTO DE LEPTINA Y SU INTERACCIÓN CON IGF, LH Y LH/IGF EN LA PRODUCCIÓN DE TESTOSTERONA*

La adición de IGF-I al cultivo, aumentó la producción de testosterona en células de la teca de bovino a las 72 horas, independientemente de la presencia o ausencia de LH ( $P < 0.01$ ). Sin embargo, hubo una interacción entre el tratamiento de IGF-I y LH/IGF-I con el tratamiento de leptina, ya que con la adición de leptina (0.1 a 100 ng/ml), este aumento en la producción de testosterona no fue observado ( $P < 0.01$ ). No hubo efecto de Leptina en la producción de testosterona ( $P > 0.05$ ) por células de la teca en los dos periodos de tiempo estudiados, independiente de las hormonas tróficas presentes (*Figura 5*).

## *EFECTO DE LEPTINA Y SU INTERACCIÓN CON IGF-I, LH Y LH/IGF-I EN LA PRODUCCIÓN DE PROGESTERONA*

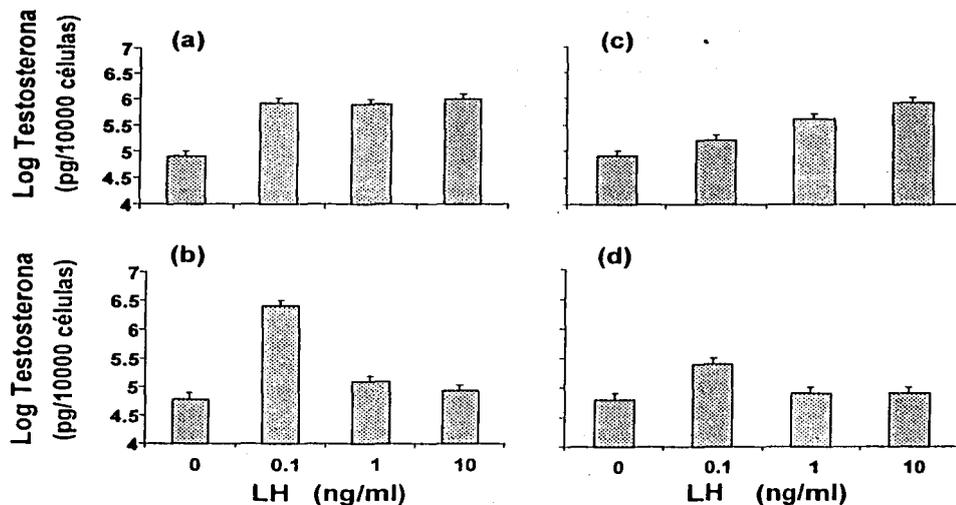
A las 72 h de cultivo, la leptina no tuvo efecto sobre la producción de progesterona por las células incubadas del grupo control o incubadas con LH. Sin embargo, en células incubadas conjuntamente con IGF-I, la leptina mostró efectos inhibitorios sobre la producción de progesterona a dosis de 10 y 100 ng/ml en las células de folículos pequeños y medianos. A las 120 horas de cultivo la leptina a dosis bajas (0.1 y 1 ng/ml) estimuló la producción de progesterona por células de la teca, mientras que dosis altas (10 y 100 ng/ml) tuvieron menor (10ng/ml) o ningún (100 ng/ml) efecto estimulador en la producción de progesterona ( $P < 0.01$ ). La adición de LH e IGF-I aumentó la producción de progesterona por ambos tipos de folículo. Bajo estas condiciones, la leptina mostró poco efecto estimulador a dosis bajas. Sin embargo, a dosis altas se observó un efecto inhibitorio sobre la producción de progesterona para células de folículos medianos y pequeños ( $P < 0.01$ ) (*Figura 6*).

## *EFECTO DE LEPTINA Y SU INTERACCIÓN CON IGF-I, LH Y LH/IGF-I EN LA RELACIÓN TESTOSTERONA:PROGESTERONA (T:P)*

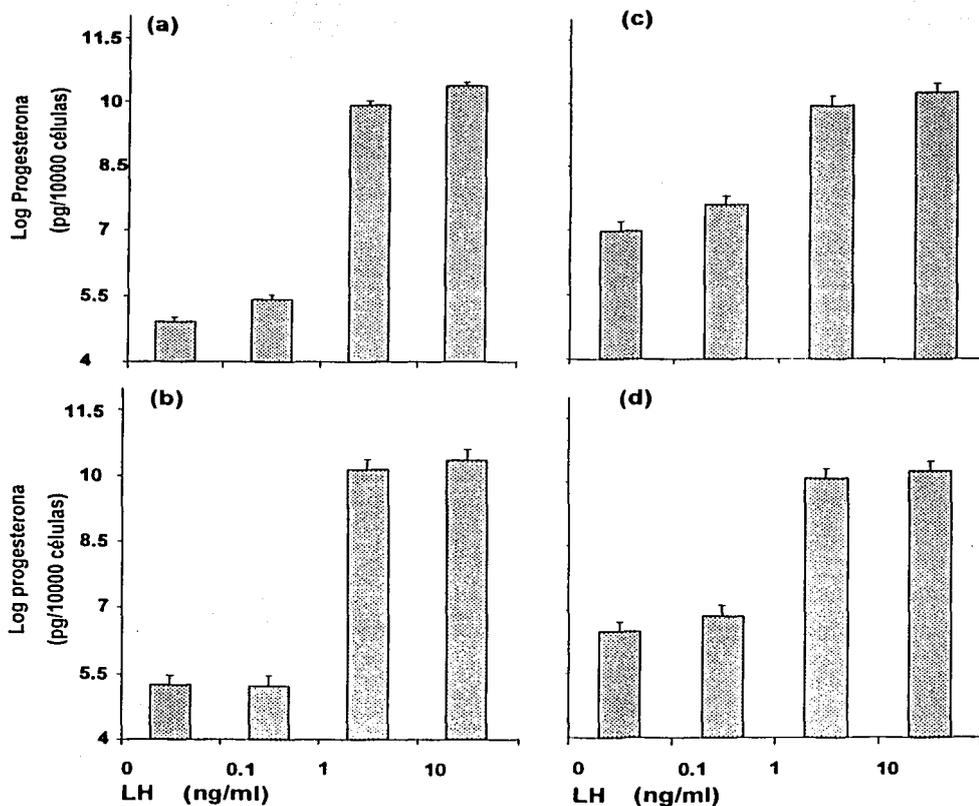
El tratamiento con leptina no causó cambios significativos ( $P > 0.05$ ) en la relación testosterona: progesterona en células de folículos medianos (*Figura 7*). En contraste, en los folículos pequeños, existió un incremento en la relación T:P a dosis altas de leptina, probablemente causadas por el decremento de progesterona a estas mismas dosis (*Ver Figura 2*).

***EFECTO DE LEPTINA Y SU INTERACCIÓN CON IGF-I, LH Y LH/IGF-I EN EL NÚMERO DE CÉLULAS***

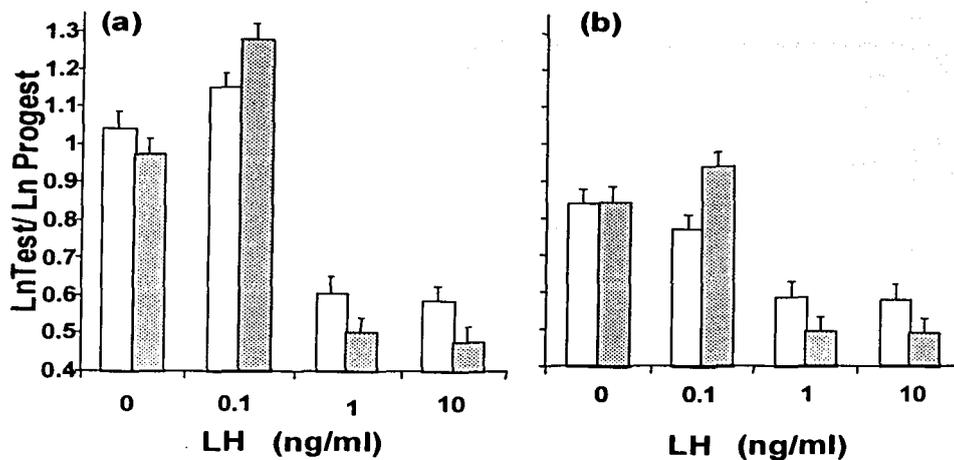
En ambos tamaños foliculares, el tratamiento con leptina estimuló el número de células conforme aumentó la dosis de leptina hasta los 10 ng/ml ( $P<0.01$ ). Cuando el tratamiento contenía IGF-I, el número de células aumentaba con respecto al control en las células que no contenían leptina, pero la conjunción de leptina e IGF-I provocaba una disminución de las células de la teca al final del cultivo ( $P<0.01$ ) (*Figura 8*).



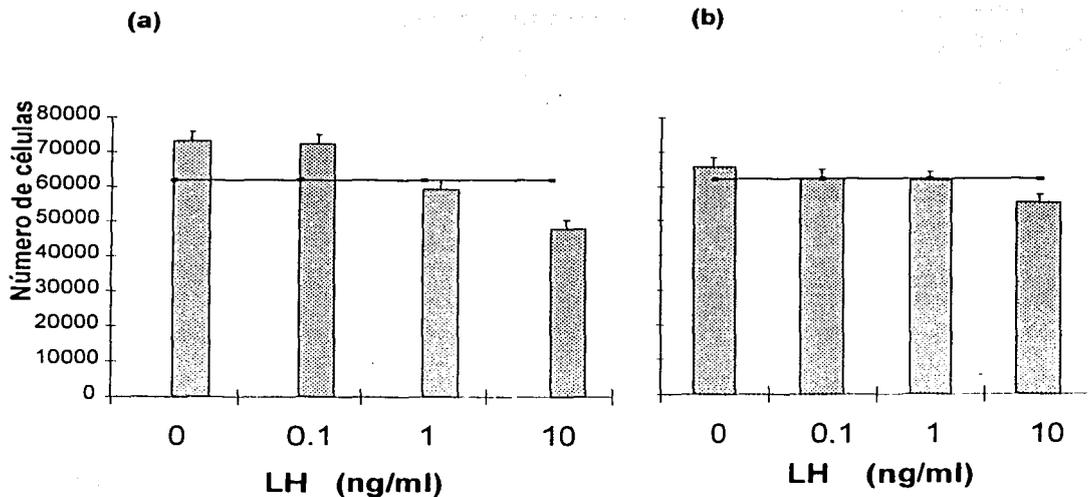
**Figura 1.** Efecto de LH a concentraciones de 0, 0.1, 1 y 10 ng/ml en la producción de testosterona de células de la teca de (a) folículos pequeños a las 120 horas, (b) folículos pequeños a las 168 horas, (c) folículos medianos 120 horas y (d) folículos medianos a las 168 horas. Los resultados muestran la media y la barra de error representa el error estándar de 3 cultivos independientes, con 24 observaciones por tratamiento, con una significancia de  $\alpha=0.05$ . El efecto de LH y tiempo de cultivo fue significativo ( $P<0.01$ ) en cambio, el efecto de LH debido a tamaño de folículo no fue significativo ( $P>0.05$ ).



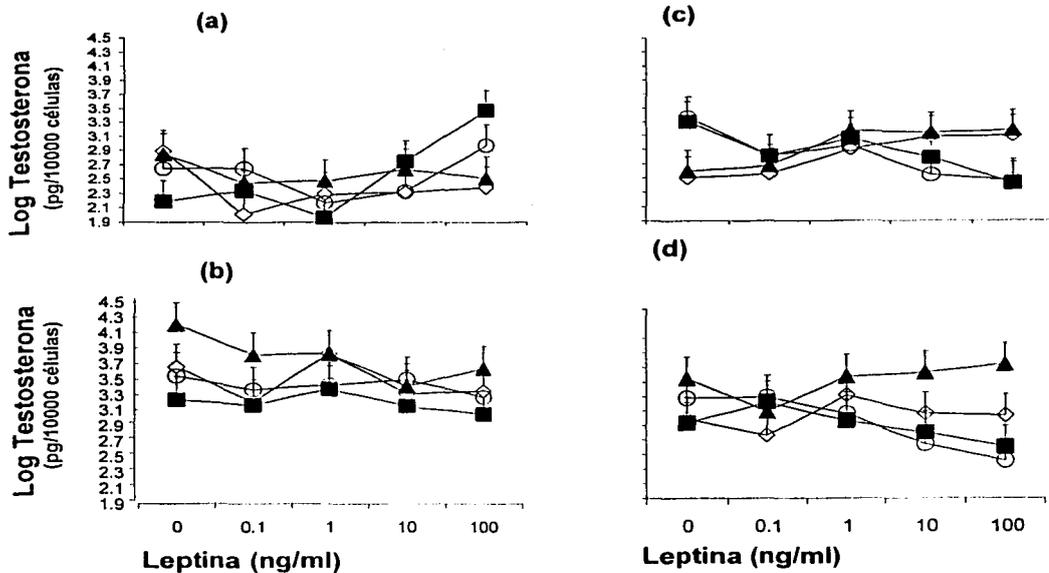
**Figura 2.** Efecto de la LH a concentraciones de 0, 0.1, 1 y 10 ng/ml en la producción de Progesterona de células de la teca de (a) folículos pequeños a las 120 horas (b) folículos pequeños a las 168 horas (c) folículos medianos a las 120 horas y (d) folículos medianos a las 168 horas. Los resultados muestran la media y la barra de error representa el error estándar de 3 cultivos independientes, con 24 observaciones por tratamiento, con una significancia de  $\alpha=0.05$ . El efecto de LH y tiempo de cultivo fue significativo ( $P<0.01$ ) en cambio, el efecto de LH debido al tamaño folicular no fue significativo ( $P>0.05$ ).



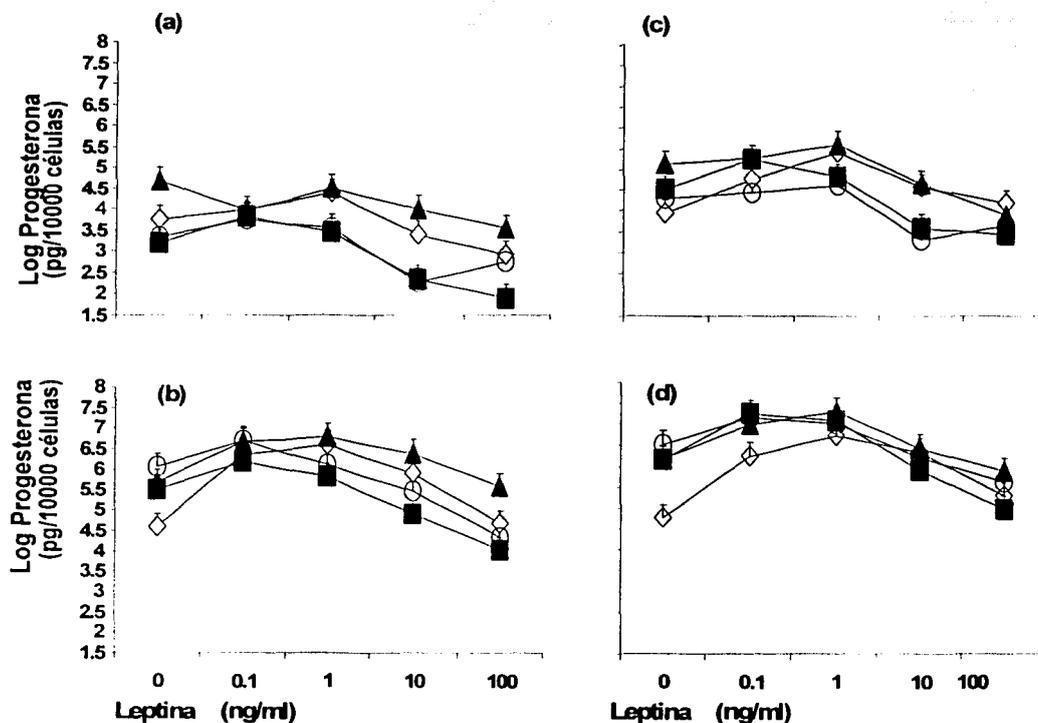
**Figura 3.** Efecto de LH a concentraciones de 0, 0.1, 1 y 10 ng/ml y la relación testosterona: progesterona en (a) folículos pequeños a las (□) 120 horas y (▨) 168 horas (b) folículos medianos (□) 120 horas y (▨) 168 horas en cultivo de células de teca de bovino. Los resultados muestran la media y la barra de error representa el error estándar de 3 cultivos independientes, con 24 observaciones por tratamiento, con una significancia de  $\alpha=0.05$ . El efecto de LH, tiempo de cultivo y tamaño de folículo fue significativo ( $P<0.01$ ).



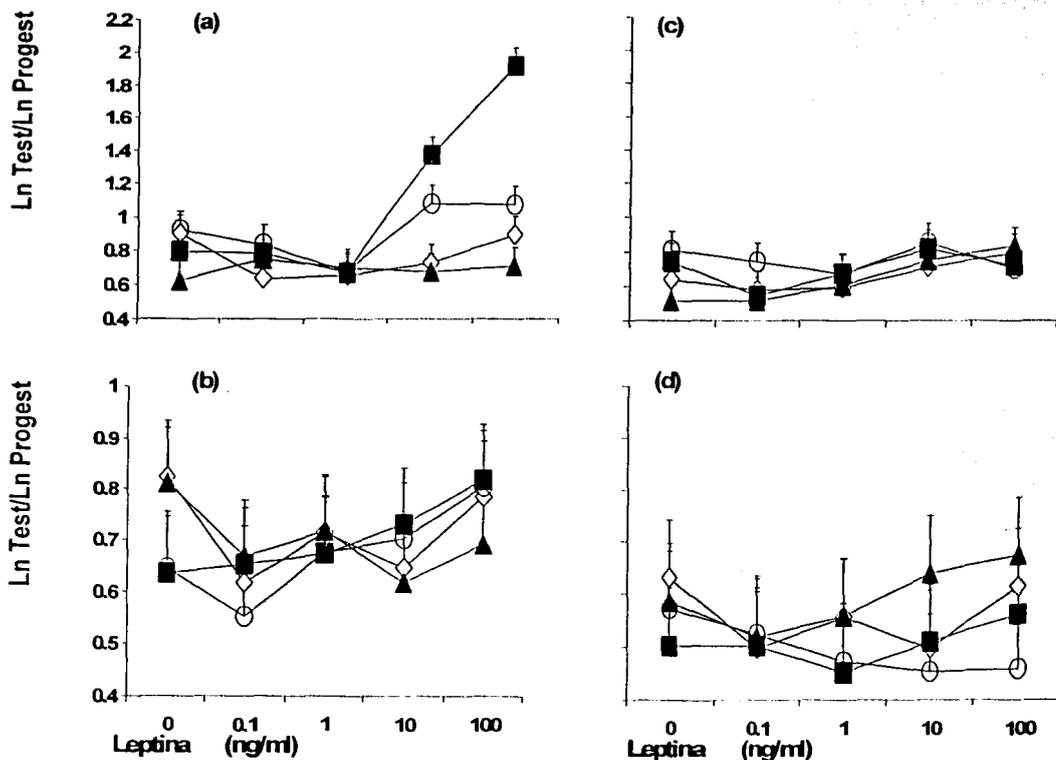
**Figura 4.** Efecto de LH a concentraciones de 0, 0.1, 1 y 10 ng/ml en el número de células provenientes de (a) folículos pequeños y (b) folículos medianos en cultivos de células de la teca de bovino a las 168 horas de cultivo. Los resultados muestran la media de cada dosis de LH, las barras de error representan el error estándar y la línea horizontal muestra el promedio general de células viables sembradas en 3 cultivos independientes, con 24 observaciones por tratamiento, con una significancia de  $\alpha=0.05$ . El efecto de LH fue significativo ( $P<0.01$ ).



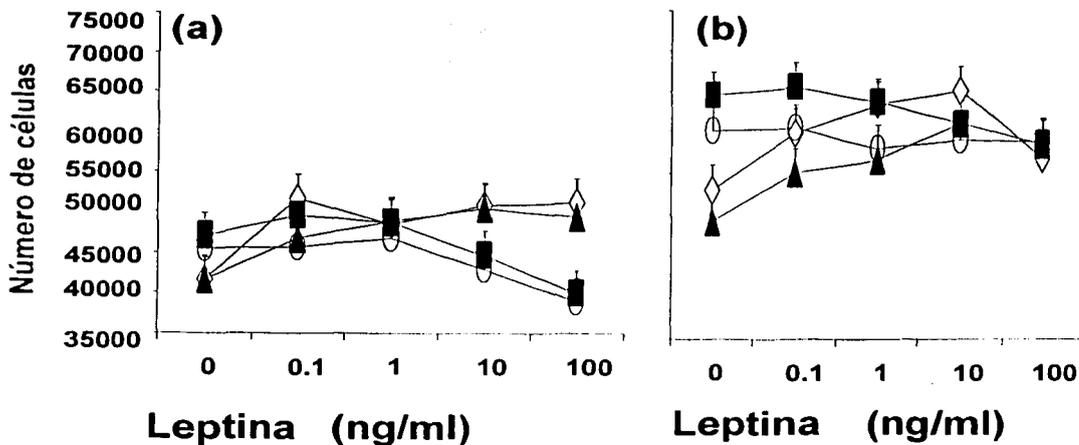
**Figura 5.** Efecto de leptina en concentraciones de 0, 0.1, 1, 10 y 100 ng/ml y su interacción con 0.1 ng/ml de LH (▲) ó 1ng/ml de IGF (■) ó 0.1ng/ml de LH y 1 ng/ml de IGF (◐) y en el grupo control (◊) en la producción de testosterona en (a) folículos pequeños a las 72 horas (b) folículos pequeños a las 120 horas, (c) folículos medianos a las 72 horas y (d) folículos medianos a las 120 horas en cultivos de células de la teca de bovino. Cada punto representa la media y las barras de error representan el error estándar de 3 cultivos independientes, con 4 observaciones por tratamiento y por dosis de leptina, con una significancia de  $\alpha=0.05$ . El efecto de IGF-1 aumento producción de testosterona ( $P<0.01$ ), sin embargo no hubo efecto de leptina en la producción de testosterona ( $P>0.05$ ).



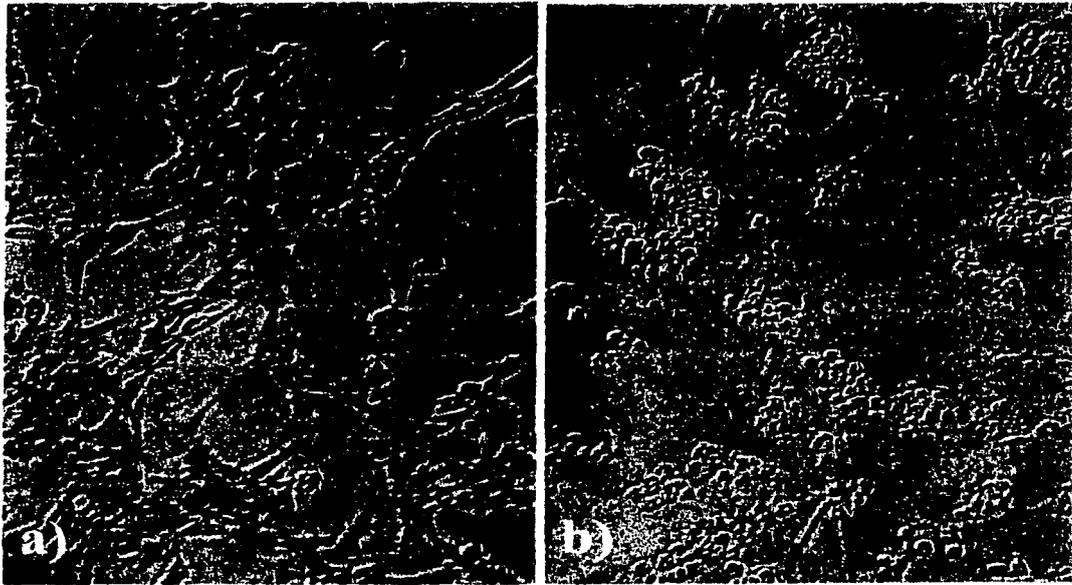
**Figura 6.** Efecto de Leptina en concentraciones de 0, 0.1, 1, 10 y 100 ng/ml y su interacción con 0.1 ng/ml de LH [▲] o 1 ng/ml de IGF I [■] o 0.1 ng/ml de LH y 1 ng/ml de IGF I [○] y en el grupo control [◇] en la producción de progesterona en (a) folículos pequeños a las 72 horas (b) folículos pequeños a las 120 horas, (c) folículos medianos a las 72 horas y (d) folículos medianos a las 120 horas en cultivos de células de la teca de bovino. Cada punto representa la media y las barras de error representan el error estándar de 3 cultivos independientes, con 4 observaciones por tratamiento y por dosis de leptina, con una significancia de  $\alpha=0.05$ . El efecto de leptina a dosis bajas aunado a IGF-I fue estimulador en la producción de progesterona ( $P<0.01$ ) y a dosis altas de leptina fue inhibitorio ( $P<0.01$ ).



**Figura 7.** Efecto de Leptina en concentraciones de 0, 0.1, 1, 10 y 100 ng/ml y su interacción con 0.1 ng/ml de LH [▲] ó 1ng/ml de IGF [■] ó 0.1ng/ml de LH y 1 ng/ml de IGF [○] y en el grupo control [◇] en la relación testosterona:progesterona en (a) folículos pequeños a las 72 horas (b) folículos pequeños a las 120 horas, (c) folículos medianos a las 72 horas y (d) folículos medianos a las 120 horas en cultivos de células de la teca de bovino. Cada punto representa la media y las barras de error representan el error estándar de 3 cultivos independientes, con 4 observaciones por tratamiento y por dosis de leptina. El efecto de leptina no causó efectos significativos ( $P>0.05$ ).



**Figura 8.** Efecto de Leptina en concentraciones de 0, 0.1, 1, 10 y 100 ng/ml y su interacción con 0.1 ng/ml de LH [ ▲ ] o 1ng/ml de IGF [ ■ ] ó 0.1ng/ml de LH y 1 ng/ml de IGF [ ○ ] y en el grupo control [ ◇ ] en el numero de células en (a) foliculos pequeños (b) foliculos medianos en cultivos de células de la teca de bovino. Cada punto representa la media y las barras de error representan el error estándar de 3 cultivos independientes, con 4 observaciones por tratamiento y por dosis de leptina. El efecto de leptina aumentó el número de células ( $P < 0.01$ ) y el cotratamiento con IGF-I disminuyó el número de células ( $P < 0.01$ ).



**Figura 10.** Cultivo de células de la teca de bovino con **a)** 0.1 ng/ml de LH las cuales no muestran morfología de luteinización, se aprecia una apariencia redonda con formación de cúmulos celulares y pedúnculos con células alargadas y **b)** células de la teca con 10 ng/ml de LH con apariencia de células alargadas que simulan fibroplastos y forman una monocapa típica de cultivos luteinizados.

## VI. DISCUSIÓN

En este estudio se encontró que la leptina a dosis fisiológicas (0.1 a 1 ng/ml) estimula la producción de progesterona en células de la teca de bovino *in vitro* no luteinizadas (Figura 6). Adicionalmente, confirma que la leptina a dosis superiores a las fisiológicas ejerce un efecto inhibitorio en la producción de progesterona, y suprime el efecto estimulante de IGF-I sobre las células de la teca.

Este constituye el primer estudio que presenta efectos estimulantes de la leptina a dosis de 0.1 a 1 ng/ml en la producción de progesterona por células de la teca (Figura 6). Similarmente, se han demostrado efectos estimulantes de la leptina en la producción de progesterona por las células de la granulosa luteinizadas del humano, cuando se administra en dosis de entre 1 y 10 ng/ml (Kitawaki *et al.*, 1999; Ghizzoni *et al.*, 2001) y recientemente, por células de la granulosa luteinizadas de porcinos con dosis de 10 a 100 ng/ml (Ruiz-Cortés *et al.*, 2003). Sin embargo, la mayoría de los autores coinciden en que la leptina posee efectos inhibitorios sobre la producción de esteroides. Spicer and Francisco (1998), encontraron que dosis de 10 a 300 ng/ml de leptina inhiben la producción de progesterona en cultivos de células de la teca de bovino. De la misma manera, Greisen *et al.* (2000) demostraron un efecto inhibitorio sobre la producción de progesterona con 2.0 y 30 ng/ml de leptina, en células de la granulosa luteinizadas de origen humano. Esta discrepancia en los efectos de la leptina sobre la producción de esteroides en las células foliculares parece estar explicada por las concentraciones de esta hormona añadidas al cultivo. Los niveles fisiológicos de leptina circulante en bovinos se encuentran entre 1 y 5 ng/ml en vacas delgadas y de 5 a 10 ng/ml en vacas con condición corporal moderada (León *et al.*, 2003 en prensa). En este estudio, las dosis de leptina superiores a los 10 ng/ml tuvieron un efecto negativo en la producción de progesterona por las células de la teca de bovino, mientras que dosis inferiores causaron efectos estimulantes. Coincidentemente, los trabajos con células de la granulosa en donde se observaron efectos estimulantes de la leptina sobre la producción de esteroides utilizaron concentraciones similares a las fisiológicas (2-10 ng/ml), mientras que los efectos negativos se presentaron cuando se emplearon concentraciones similares a

estados mórbidos como la obesidad (Botella *et al.*, 2001; Spicer and Francisco, 1997). Luego entonces, la respuesta a la leptina parece tener un comportamiento bifásico, con estimulación cuando las concentraciones son bajas y similares a las observadas *in vivo*, e inhibitorias cuando la leptina excede dichas concentraciones. Para el caso de la especie porcina, los niveles fisiológicos de leptina se encuentran entre los 1.5 y 5 ng/ml (Ruiz-Cortés *et al.*, 2003), encontrándose un efecto estimulante con dosis de 10 ng/ml de leptina. Es posible entonces que exista una diferencia específica de especie, ya que la producción de progesterona se estimula con 0.1 ng/ml de leptina (bovinos) (como se observó en el presente trabajo), 1 ng/ml (humanos) (Kitawaki *et al.*, 1999) y 10 ng/ml (porcinos) (Ruiz Cortés *et al.*, 2003), en tanto que el efecto inhibitorio ocurre con 10 ng/ml (bovinos) (Spicer and Francisco, 1997), 20 ng/ml de leptina (humanos) (Greisen *et al.*, 2000) y 1000 ng/ml (porcinos) (Ruiz Cortés *et al.*, 2003).

También se ha demostrado ausencia de efecto de la leptina sobre la producción de progesterona en cultivos de células de la granulosa no luteinizadas. De hecho, Zachow and Magoffin (1997) con células de rata y dosis de 1 ng/ml de leptina, así como Agarwal *et al.* (1999) con células de origen humano y concentraciones de 50 ng/ml de leptina no encontraron ningún efecto de ésta sobre la producción de progesterona. Esto parece indicar que es necesaria la luteinización para estimular la producción de progesterona en cultivos de células de la granulosa. De hecho, la leptina podría jugar un papel importante en el proceso de luteinización, por su acción como factor angiogénico para inducir la neoformación de vasos sanguíneos que favorezcan la irrigación del cuerpo lúteo en formación (Frühbeck *et al.*, 2000). Así mismo, se ha observado que existe una mayor expresión de receptores para leptina, una mayor unión del ligando y niveles más altos de esta hormona en etapas del ciclo estral donde hay niveles altos de progesterona *in vivo* (Ruiz-Cortés *et al.*, 2000; Duggal *et al.*, 2002 y Pirwany *et al.*, 2001).

El carácter estimulante de la leptina en la producción de progesterona que se demostró en el presente trabajo, ocurrió en presencia o ausencia de LH y/o IGF, en tanto que el resultado inhibitorio se relacionó a células estimuladas con IGF-I (*Figura 6*). Similarmente, los efectos estimulantes de la leptina en la síntesis de esteroides demostrados por Kitawaki *et al.* (1999) y Ruiz-Cortés *et al.* (2003) no se vieron afectados por la presencia o ausencia de IGF-I y/o FSH. Por otro lado, al igual que en este trabajo, otros autores han observado efectos inhibitorios de la leptina en la esteroidogénesis, bloqueando los efectos estimulatorios de factores de crecimiento como IGF-I e insulina (Spicer and Francisco, 1997; Spicer *et al.*, 1998, Zachow and Magoffin, 1997; Zachow *et al.*, 1999 y Agarwal *et al.*, 1999).

La manera en que la leptina logra efectos estimulantes en la síntesis de esteroides fue propuesta por Ruiz-Cortés *et al.* (2003), quienes demostraron un aumento en la fosforilación de STAT3 (señal transducida por activadores de transcripción) en respuesta a leptina. Este aumento en STAT3 fosforilada fue acompañado por un incremento de la maduración de SREBP1 y, consecuentemente, de la transcripción de StAR (Ruiz-Cortés *et al.*, 2003). Se ha establecido que las proteínas SREBP 1 y SREBP 2 son capaces de activar el gene promotor de StAR, pero como la activación por sí sola es débil, se requiere de la presencia de cofactores de transcripción ubicuotos, como Sp1 y el NF- $\kappa$ B (factor nuclear  $\kappa$ B). Las proteínas SREBP se unen a los elementos reguladores de esteroides (SER's), localizados en regiones promotoras de genes como StAR para sintetizar la enzima esteroidogénica o para inducir la síntesis de ácidos grasos (FAS) (Shea-Eaton *et al.*, 2001). Esto demuestra que leptina también tiene efectos estimulatorios en la biosíntesis de enzimas que involucran la cadena esteroidogénica.

Por otro lado, el efecto inhibitorio de la leptina sobre la producción de progesterona parece ser el producto de una disminución en la tasa de fosforilación de las tirosinas del sustrato 1 del receptor de insulina (IRS 1), como lo demostraron Cohen *et al.* (1996) en células hepáticas HepG2. Las tirosinas del IRS 1 actúan como sitios de unión de alta afinidad para el acoplamiento y activación de proteínas señal intracelulares SH2 (regiones

homólogas Src 2, por la similitud con la proteína Src) (Alberts *et al.*, 1993). Por tanto, la inhibición en la fosforilación evita la unión a SH2 y con ello, la cascada de señalización mediante SOS (son of the sevenless), proteínas Ras y por consecuencia MAPK/ERK (Cinasas de proteína activadas por mitógenos/ Cinasas reguladas por señales extracelulares)(Alberts *et al.*, 1993 Hausser *et al.*, 2001). La inhibición en la señalización vía MAPK/ERK evita la fosforilación de proteínas intracelulares y proteínas reguladoras, que juegan un papel importante en la activación de genes tempranos de transcripción, como el complejo proteínico que forma un factor de respuesta sérica temprana (SRF y Elk1) (Alberts *et al.*, 1993, Hausser *et al.*, 2001). Este complejo se encuentra en la región reguladora de los genes huérfanos nucleares c-jun y c-fos, B-jun y Egr 1 (Brann *et al.*, 2002). Los genes c-jun y c-fos sintetizan cadenas proteínicas denominadas Jun y Fos que forman un heterodímero llamado AP-1 con actividad mitogénica (Alberts *et al.*, 1993, Hausser *et al.*, 2001 y Brann *et al.*, 2002). Así mismo, se ha demostrado que es necesaria la actividad de ERK para fosforilar SF 1 (Factor esteroideogénico 1), un miembro de la familia de receptores nucleares huérfanos, que tiene un importante papel en la expresión de múltiples componentes de la cadena esteroideogénica, incluyendo la P450 esteroide hidroxilasa y StAR (Lala *et al.*, 1997, Sekar *et al.*, 2001, Gyles *et al.*, 2001, Seger *et al.*, 2001 y Dewi *et al.*, 2002).

En el presente trabajo no se encontró ningún efecto de la leptina a dosis de entre 0 y 100 ng/ml sobre la producción de testosterona por células de la teca bovinas (Figura 5). Del mismo modo, Zachow *et al.* (1999) no observaron efecto sobre la producción de testosterona utilizando entre 0.1 y 100 ng/ml de leptina con cultivos de células de la teca de rata. Sin embargo, Agarwal *et al.* (1999) administrando 50 ng/ml de leptina en cultivos de células de la teca de humano y Spicer and Francisco (1998) utilizando concentraciones de 10 a 300 ng/ml de leptina en células de la teca bovina, demostraron un efecto inhibitorio sobre la producción de testosterona. No obstante, estos resultados fueron observados en cultivos de células de teca luteinizadas, en tanto que en las no luteinizadas no demostraron ningún cambio. Es decir que, el efecto de la leptina sobre la producción de testosterona en células de la teca parece ser inhibitorio únicamente por el estado de luteinización de las

células. Así mismo, Ruíz-Cortés *et al.* (2000) mencionan una mayor expresión de receptores OB-Rc conforme avanza el estado de luteinización de células de la granulosa, Zachow *et al.* (1999) y Karlsson *et al.* (1997) mencionan una mayor expresión de receptores OB-Ra en las células tecaes en comparación con las células de granulosa, esto parece indicar que el receptor OB-Ra predomina durante la luteinización. Zachow *et al.* (1999) adjudican la ausencia de efecto a la incapacidad del receptor corto para señalizar vía JAK dada su configuración molecular, ya que OB-Ra carece del motif 2. Sin embargo, BJORBAEK *et al.* (1997) e INGVARSTEN and BOISCLAIR (2001) mencionan que este receptor es capaz de señalizar por las vías MAPK, ERK y PI3. De igual forma, las gonadotropinas FSH y LH pueden estimular la activación de la vía ERK para regular la producción de los esteroides, lo que les permite llevar a cabo procesos como la luteinización o la luteólisis (SEGER *et al.*, 2001 y DEWI *et al.*, 2002). Además, la ruta de señalización ERK ha demostrado inhibir la expresión de StAR (SEGER *et al.*, 2001 y DEWI *et al.*, 2002). Este punto de convergencia requiere de futuros estudios, ya que podría involucrar además la inhibición de la expresión de otras enzimas de la cadena esteroideogénica y ser el mecanismo por el cual se inhibe la síntesis de testosterona y estradiol por las células de la teca y de la granulosa.

Al contrario de lo observado en las células de la teca, en donde aparentemente la luteinización es requerida para observar efectos inhibitorios sobre la producción de testosterona (AGARWAL *et al.*, 1999 y SPICER and FRANCISCO, 1998) los estudios realizados con células de la granulosa, han demostrado que la leptina muestra un patrón bifásico en la producción de estradiol independientemente del estado de luteinización del cultivo (AGARWAL *et al.*, 1999; GREISEN *et al.*, 2000 y ZACHOW and MAGOFFIN, 1997). Es decir que los efectos inhibitorios se presentan cuando las dosis de leptina son altas para cada especie, en tanto que los efectos estimulantes ocurren con dosis bajas. Los resultados inhibitorios en la producción de estradiol han sido demostrados por Agarwal *et al.* (1999) quienes utilizaron 50 ng/ml de leptina, por Greisen *et al.* (2000) con 20 ng/ml de leptina en cultivos de células de granulosa humana y por Zachow and Magoffin (1997) *et al.*, administrando 3 ng/ml de leptina en células de rata. Por otra parte, los efectos estimulantes han sido

establecidos por Kitawaki *et al.* (1999) en humanos, utilizando concentraciones de 0.5 a 10 ng/ml de leptina. Este efecto bifásico de la leptina sobre la producción de estradiol en las células de la granulosa, puede estar relacionado con la mayor expresión del receptor OB-Rb, demostrada por Zachow *et al.*, (1999) en células de la granulosa. El receptor largo de leptina es el único capaz de señalizar vía JAK, de estimular la fosforilación de STAT 3 y por lo tanto de aumentar la cantidad de SRBP maduro que provoca un incremento en la activación del gene promotor de StAR (Ruíz-Cortés *et al.*, 2003 y Shea-Eaton *et al.*, 2001) y este mismo receptor es capaz de inducir la respuesta de autorregulación a través de SOCS 3 (Ghilardi *et al.*, 1995; Bjorbaek *et al.*, 1997 Brann *et al.*, 2002). Adicionalmente, Kitawaki *et al.* (1999) demostraron un aumento en la actividad y en la expresión de P450 aromatasas únicamente en las células cultivadas con suero, en tanto que los cultivos carentes de ello, no mostraron ningún cambio. A pesar de toda la evidencia anterior, también se ha descrito ausencia de efecto de leptina en la producción de estradiol en diferentes especies (bovinos, Spicer and Francisco, 1997; humanos, Ghizzoni *et al.*, 2001; y porcinos, Ruiz-Cortés *et al.*, 2003). Esta falta de efecto de leptina en la producción de estradiol, parece ser el producto de la ausencia del bloqueo de leptina sobre el estímulo de insulina e IGF-I debido a altas dosis de insulina o IGF-I (100 a 1000ng/ml) utilizadas en el cultivo.

En el presente trabajo, la leptina a concentraciones de 0.1 a 10 ng/ml mostró un efecto estimulador en el número de células que no contenían IGF-I y un efecto inhibitorio en el número de células cuando leptina se asoció con dicho factor de crecimiento (*Figura 8*), esto difiere de la mayoría de la evidencia encontrada en cultivos de células de bovino (Spicer *et al.*, 1997 y 1998), rata (Zachow and Magoffin, 1997, Zachow *et al.*, 1999), humano (Agarwal *et al.*, 1999; Kitawaki *et al.*, 1999 y Greisen *et al.*, 2000) y porcino (Ruíz-Cortés *et al.*, 2003) experimentos que no muestran efectos en el número de células asociados a leptina. Sin embargo, los análisis de flujo citométrico realizados por Ruíz-Cortés *et al.* han evidenciado que más del 90% de las células de los grupos control y tratados con leptina se encontraban en estado latente (Ruiz-Cortés *et al.*, 2003), esto podría reforzar la propuesta de que la leptina afecta la señalización de IGF-I por medio de la inhibición del IRS 1 (Cohen *et al.*, 1996). La ruta de señalización de IGF, en condiciones normales tiene como

finalidad la expresión de la proteína AP 1 (Alberts *et al.*, 1993, Hausser *et al.*, 2001 y Brann *et al.*, 2002), la cual conduce a activación mitogénica, es decir, que si leptina inhibe la transducción de IGF por medio del IRS 1, esto disminuirá la capacidad de que las células entren a estado mitótico y por tanto, entran a estado quiescente..

En el presente trabajo, las células de la teca mantuvieron su producción de testosterona por 168 horas con dosis de 0.1 ng/ml de LH (*Figuras 1 y 3*). Lo anterior es similar a lo demostrado por Campbell *et al.* (1998) para células de la teca ovinas, en donde la concentración fisiológica de 0.1 ng/ml de LH estimuló la producción de testosterona durante las primeras 48 horas de cultivo. En este trabajo, la producción de testosterona durante las primeras 120 horas de cultivo fue estimulada de manera dosis dependiente por LH con concentraciones de 0.1, 1 y 10 ng/ml (*Figura 1*). A las 168 horas de cultivo, dosis de 1 y 10 ng/ml de LH inhibieron la producción de testosterona y aumentaron la de progesterona lo que coincide con los resultados de Campbell *et al.*, (1998) (*Figuras 1 y 2*), esto se explica por una disminución en la acumulación y actividad de enzimas esteroideogénicas como la P450  $\alpha$  hidroxilasa, en presencia de concentraciones altas de LH, lo que se traduce en una disminución de testosterona. Así mismo, la expresión constitutiva de la enzima P450<sub>scc</sub> garantiza el continuo aporte de progesterona, independientemente de la concentración de LH (Voss and Fortune, 1993<sup>a</sup> y Voss and Fortune 1993b; Xu *et al.*, 1995; Campbell *et al.*, 1998 y Murphy, 2000). Adicionalmente, la relación testosterona:progesterona (T:P) no se vio afectada por la leptina bajo dosis fisiológicas de LH (0.1 ng/ml) en los folículos medianos (*Figura 3*). En contraste, en los folículos pequeños, la relación T:P aumentó con dosis altas de leptina debido a la disminución en la producción de progesterona. Así mismo, no se encontró evidencia morfológica de luteinización del cultivo cuando se emplearon dosis de LH menores a 1 ng/ml, ya que las células mostraban una apariencia redonda, con formación de cúmulos celulares y pedúnculos con células alargadas, morfología representativa de células no luteinizadas (*Figura 10*), a diferencia de las células alargadas con apariencia de fibroblastos y formando una monocapa, típica de cultivos luteinizados (Campbell *et al.*, 1998, Gutiérrez *et al.*,

1997b y Murphy, 2000). Por lo tanto, este sistema de cultivo manifiesta respuestas fisiológicas relevantes.

El mecanismo de señalización implicado en el estímulo de producción de testosterona e inhibición de progesterona con dosis bajas de LH (0.1 ng/ml) y de la inhibición de testosterona a altas concentraciones (1 y 10 ng/ml de LH), obedece a que LH incrementa la formación de AMPc y esto, a su vez, estimula la activación de la ruta de señalización PKA. Por medio de esta ruta de señalización, se induce la producción de RNAm para los citocromos P450 scc (Murphy, 2000 y Voss and Fortune, 1993a) y 17  $\alpha$  hidroxilasa (Voss and Fortune, 1993<sup>a</sup>, Voss and Fortune 1993b y Murphy, 2000). Entonces, las bajas concentraciones de LH son eficientes para mantener la producción de P450  $\alpha$  hidroxilasa necesarias para producir testosterona, mientras que las altas concentraciones de LH, disminuyen hasta en un 96% la expresión de dicha enzima, interrumpiéndose la producción de testosterona (Voss and Fortune, 1993b). Sin embargo, la P450 scc tiene una expresión constitutiva e insensible a AMPc y por tanto a su efecto refractario (Murphy, 2000). Así, en este estudio se demostró que 0.1 ng/ml de LH estimula la producción de testosterona sin aumentar la producción de progesterona, en tanto que las concentraciones de 1 y 10 ng/ml de LH estimulan la producción de progesterona y testosterona presumiblemente por un efecto de luteinización. No obstante, no se puede descartar que existiera un efecto del tiempo de cultivo sobre la producción de enzimas esteroideogénicas. En conclusión, se demostró una alta sensibilidad de las células de la teca al efecto de LH, ya que concentraciones de 0.1 ng/ml de LH estimulan la producción de testosterona aún durante un periodo prolongado (168 horas), a diferencia de los efectos de luteinización encontrados por Campbell *et al.*, 1998, con concentraciones mayores a 1 ng/ml de LH desde las 48 a 144 horas de cultivo. Esto demuestra que las dosis de LH que causan luteinización *in vivo* corresponden a las dosis de LH que causan luteinización *in vitro*.

A diferencia de los cultivos realizados por Spicer and Francisco (1998), y Agarwal *et al.* (1999) con células de la teca y Kitawaki *et al.* (1999), Greisen *et al.* (2000), Ghizoni *et al.* (2001) y Ruiz-Cortés *et al.* (2003) con células de la granulosa, este sistema de cultivo de

células de la teca demostró que con dosis fisiológicas de LH (0.1 ng/ml), IGF-1 (1 ng/ml), insulina (10ng/ml) y leptina (0 a 100 ng/ml) se puede mantener la producción de testosterona hasta por 168 horas. Dado que estas dosis se encuentran dentro de los rangos fisiológicos, es posible que la utilización de este cultivo para la comprensión de los procesos celulares *in vitro* constituya un sistema representativo de los procesos que ocurren *in vivo*.

## CONCLUSIONES

Este es el primer trabajo que muestra evidencia *in vitro* del efecto de la leptina en la producción de esteroides y en el número de células de la teca de bovino en cultivo no luteínizado. Se pudo determinar que la leptina muestra una respuesta bifásica en la producción de progesterona, observándose un efecto estimulador en el caso de dosis de leptina similares a las fisiológicas e inhibitorio para las dosis altas. Sin embargo, el efecto inhibitorio de la leptina no es un efecto directo, sino que se debe a que inhibe la acción estimulante de los factores de crecimiento como IGF-1.

El presente trabajo determinó que las células de teca luteinizadas (con dosis superiores a 1ng/ml de LH) manifiestan un efecto inhibitorio para la secreción de testosterona, mientras que para las células que no se encontraban luteinizadas (dosis de 0.1ng/ml de LH) no se observó ningún efecto.

Los efectos de las dosis fisiológicas de leptina sobre la producción de progesterona y número de células de la teca observados en el presente trabajo, sugieren que la leptina puede estar involucrada en el proceso de luteinización de las células, esto coincide con las observaciones de otros autores que indican un aumento en la cantidad de progesterona producida, el estado quiescente de las células y el aumento en irrigación, son factores que están implicados en la formación del cuerpo lúteo. Aunque no se deben de perder de vista los efectos estimuladores obtenidos con dosis fisiológicas de leptina, los que pueden estar

jugando un papel importante durante el crecimiento folicular o la ovulación. Siendo que esto puede ser una razón importante para entender los procesos fisiológicos reproductivos de vacas obesas o en estado franco de desnutrición. Sin embargo, se requiere seguir realizando más investigaciones que conduzcan a dilucidar el efecto de leptina sobre la reproducción a nivel ovárico, mediante el estudio de los receptores predominantes y las rutas de señalización involucradas para cada tipo de receptor en cada etapa del ciclo estral.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SE  
DE LA BIBLIOTECA

## VII. REFERENCIAS

- Agarwal SK, Vogel K, Weitsman SR and Magoffin DA. Leptin antagonizes the insulin like growth factor I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; (84) 3: 1072-1076.
- Ahima RS, Saper CB, Flier JS and Elmquist JK. Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 2000; (21):263-307.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD. Biología molecular de la célula. 3a Ed. Madrid: Omega: 1993.
- Armstrong DG, Gutiérrez CG, Baxter, Glazyrin AL, Mann GE, Woad KJ and Webb R. Expression of mRNA encoding IGF-I, IGF-II and type 1 IGF receptor in bovine ovarian follicle. *J Endocrinol* 2000; (165):101-113.
- Baumann H, Morella KK, White DW, Dembski M, Bailon PS, Kim H, Lai ChF and Tartaglia LA. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; (93): 8374-8378.
- Becker, Nikroo, Brabletz and Reisfield: *Proc Natl Acad Sci USA*. October 10, 1995: 9727
- Bedolla TN, Ulloa-Aguirre A, Landeros VJ y Pérez Palacios G. Análisis de datos y control de calidad en el radioinmunoanálisis I. Guía para evaluación de resultados. *Rev Inv Cli* 1984 (36):179-92.
- Berridge MV and Tan AS: Caracterización of the cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 1993; (303):474-482.
- Bjorbaek C, Uotani S, Da Silva B and Fliers J. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem* 1997; (272):32686-32695.
- Bjorbaek C, Buchholz RM, Davis SM, Bates SH, Pierroz DD, Gu H, Neel B, Myers MG and Fliers J. Divergent roles of SHP2 in ERK activation by leptin receptors. *J Biol Chem* 2001; (276)7: 4747- 4755.
- Botella Carretero JI, Lledin Barbancho MD, Valero GMA y Varela Dacosta C. Leptina: implicaciones fisiológicas y clínicas. *Anal Med Inter* 2001; (18) 3: 152-160.
- Brann DW, Wade MF, Dhandapani KM, Mahesh VB and Buchanan CD. Leptin and reproduction. *Steroids* 2002; (67):95-104.
- Burks DJ, Font de Mora J, Schubert M, Withers DJ, Myers MG, Towery HH et al. IRS 2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis Nature, 2000; (407): 377-382.
- Campbell BK, Baird DT and Webb R. Effects of dose of LH on androgen production and luteinization of ovine theca cells cultures in a serum-free system. *J Reprod Fertil* 1998; (112): 69-77.
- Casanueva FF and Diueguez C. Neuroendocrine regulation and actions of leptin. *Front Neuroendocrinol* 1999; (20): 317-363.
- Clarke IJ and Henry BA. Leptin and reproduction. *Rev Reprod* 1999; (4): 48 – 55.

- Caubo B, De Vinna RS and Tonetta SA. Regulation of steroidogenesis in cultured porcine theca cells by growth factors. *Endocrinology* 1989; (125): 321-326.
- Chehab FF. Leptin as a regulator of adipose mass and reproduction. *Trends Physiol Sci* 2000; (21):309-314.
- Cioffi JA, Van Blerkom J, Antczak M, Shafer A, Wittner S, Snodgrass HR. The expression of leptin and its receptors in the pre-ovulatory human follicles. *Mol Hum Reprod* 1997; (3): 467-472.
- Cohen B, Novick D and Rubinstein M. Modulation of insulin activities by leptin. *Science* 1996; (274) 5290:1185-1188.
- De Mora SJF y Burks D. Las rutas de señales de la insulina: mecanismos de integración de la homeostasis energética y la reproducción. *Endocrinología y nutrición* 2001; (48) 10: 295-302.
- Dewi DA, Abayasekara DRE and Wheeler Jones CPD. Requirement for ERK1/2 activation in the regulation of progesterone production in human granulosa-lutein cells is stimulus specific. *Endocrinology* 2002; (143) 3: 877-888.
- Duggal PS, Van der Hoek KH, Milner CR, Ryan NK, Armstrong DT, Magoffin DA and Norman RJ. The in vivo and in vitro effects of exogenous leptin on ovulation in the rat. *Endocrinology* 2000; (141) 6:1971-1976.
- Duggal PS, Weitsman SR, Magoffin DA and Norman RJ. Expression of the long (OB-Rb) and short (OB-Ra) forms of the leptin receptor throughout the oestrus cycle in the mature rat ovary. *Reproduction* 2002; (123): 899-905.
- Frühbeck G, Salvador J y Díez J. Implicaciones de la leptina en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares. *Clínica e investigación en Arterioesclerosis* 2000; (12) 2: 93-105.
- Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoeffel R and Heim MH. Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; (93):6231-6235.
- Ghilardi N, Skoda RC. The leptin receptor activates Janus Kinase 2 and signals for proliferation in a factor dependent cell line. *Mol Endocrinol* 1997; (93) :393-399.
- Ghizzoni L, Barreca A, Mastorakos G, Furlini M, Vottero A, Ferrari B, Chrousos GP, Bernasconi S. Leptin inhibits steroid biosynthesis by human granulosa-lutein cells. *Horm Metab Res* 2001; (33)6:323-328.
- Giudice LC. Insulin-Like Growth factors and ovarian follicular development. *Endoc Rev* 1992; (13) 4 :641-669.
- Glister C, Dionne ST, Nigel PG and Knight PG. Interactions between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and inhibin-related peptides by nonluteinized bovine granulosa cells. *Biol Reprod* 2001; (65): 1020-1028.
- Greisen S, Ledet T, Moller N, Jorgensen JO, Christiansen JS, Petersen K, Ovesen P. Effect of leptin on basal and FSH stimulated steroidogenesis in human granulosa luteal cells. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000; (79): 931-935.
- Grimard B, Humblot P, Mialot JP, Jeanguyot N, Sauviant D, Thibier M. Absence of response to oestrus induction and synchronization treatment is related to lipid mobilization in suckled beef cows. *Reprod Nut Dev* 1997; (37) 2:124-140.

- Gutiérrez CG, Campell BK y Webb R. Development of a long term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone and morphological characteristics. *Biol Reprod* 1997a ; (56): 608-616.
- Gutiérrez CG, Glazryn AL, Robertson GW, Campell BK, Gong JG, Bramley TA y Webb R. Ultra-structural characteristics of bovine granulosa cells associated with maintenance of estradiol production in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 1997b; (134): 51-58.
- Gyles S, Burnst CJ, Whitehouse BJ, Sudgen, Marsh PJ, Persuad SJ and Jones PM. ERKs Regulate cyclic AMP Steroid synthesis through transcription of Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) gene. *J Biol Chem* 2001; (276) 37: 34888- 34895.
- Hausser A, Storz P, Hübner S, Braendlin I, Martínez Moya M, Link G and Johannes FJ. Protein Kinase C m selectively activates the mitogen activated protein kinase (MAPK) p42 pathway. *FEBS letters* 2001; (492): 39- 44.
- Henson RBS. Leptin- Much more than a satiety signal. *Annual Rev Nutr* 2000; (20):45-75.
- Hervey GR. The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats. *J Physiol (Lond)* 1959; (145): 336-352.
- Heshka JT and Jones JH. A role for dietary fat in leptin receptor, OB-Rb function. *Life Sci* 2001; (69): 987-1003.
- Ingvarsen KL and Boisclair YR. Leptin and the regulation of food intake, energy homeostasis and immunity with special focus on periparturient ruminants. *Dom Anim Endocrinol* 2001; (21): 215-250.
- Karlsson C, Lindell K, Svensson E, Bergh Ch, Lind P, Billing H, Carlsson LMS and Carlsson B. Expression of functional leptin receptor in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; (82) 12: 4144 - 4148.
- Khireddine B, Grimard B, Ponter AA, Ponsar C, Boudjenah H, Mialot JP, Suavant D and Humblot P. Influence of flushing on LH secretion, follicular growth and the response to estrus synchronization treatment in suckled beef cows. *Theriogenology* 1998; (49):1409-1423.
- Kitawaki J, Kusuki I, Koshiha H, Tsukamoto K and Honjo H. Leptin directly stimulates aromatase activity in human luteinized granulosa cells. *Mol Hum Reprod* 1999; (5)8: 708-713.
- Korhonen S, Hipepeläinen M, Niskanen L, Vanhala M and Saarikoski S. Relationship of metabolic syndrome and obesity to polycystic ovary syndrome: a controlled, population based study. *Am J Obstetric Gynecol* 2001; (184) 3: 289 - 296.
- Lala DS, Syka PM, Lazarchik SB, Mangelsdorf DJ, Parker KL and Heyman RA. Activation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 by oxysterols. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; (94):4895-4900.
- Lane PW. The pituitary gonadal response of genetically obese mice in parabiosis with thin and obese siblings. *Endocrinology* 1959; (65): 863- 868.
- López AR, González DJP y Perera R. Leptina: conocimientos actuales e implicaciones clínicas. *BSCP Can Ped* 2000; (243): 159 - 164.

- Luna- Pinto G and Cronjé PB. The roles of the insulin-like growth system and leptin as possible mediators of the effects of nutritional restriction on age at puberty and compensatory growth in dairy heifers. *S Afr J Anim Sci* 2000; (30) 2: 155-163.
- Martin-Romero C and Sánchez-Margalet V. Human leptin activates PI3K and MAPK pathways in human peripheral blood mononuclear cells: possible role of Sam68. *Cell Immunol* 2001; (212):83-91.
- Monget P and Bondy C. Importance of the IGF system in early folliculogenesis. *Mol Cell Endocr* 2000; (163):89-93.
- Moschos S, Chan JL, Mantzoros ChS. Leptin and reproduction: a review. *Fertil Steril* 2002; (77): 433-444.
- Murphy BD. Models of luteinization. *Biol Reprod* 2000; (63):2-11.
- Pirwany IR, Fleming R, Sattar N, Greer IA and Wallace AM. Circulating leptin concentrations and ovarian function in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* 2001; (145): 289-294.
- Poretsky L and Kalin MF. The gonadotropic function of insulin. *Endoc Rev* 1987; (8): 132-141.
- Prolo P, Wong ML and Licino J. Leptin, molecules in focus. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; (30) :1285-1290.
- Qian H, Barb CR, Compton MM, Hausman GJ, Azain MJ, Kraeling RR and Baile CA. Leptin mRNA expression and serum leptin concentrations as influenced by age, weight and estradiol in pigs. *Dom Anim Endocrinol* 1999; (16)2 135-143.
- Reist M, erdin DK, Von Euw D, Tschumperlin KM, Leuenberger H, Hammon HM, Morel C, Philipona C, Zbinden Y and Kunzi N. Postpartum reproductive function: association with energy, metabolic and endocrine status in high yielding dairy cow. *Theriogenology* 2003; (59) 8: 1707- 1723.
- Ruiz Cortés T, Taoyan M, Palin MF, Downey BR, Lacroix DA and Murphy B. Porcine Leptin Receptor: Molecular structure and expression in the ovary. *Mol Reprod Dev* 2000; (56): 465-474.
- Ruiz Cortés T, Martel Kennes Y, Gévry NY, Downey B, Palin MF and Murphy B. Biphasic effects of leptin in porcine Granulosa cells. *Biol Reprod* 2003; (68):789-796.
- Szanto I and Kahn CR. Selective interaction between leptin and insulin signaling pathways in a hepatic cell line. *Proceedings Natl Acad Sciences USA*. 97:2355-2360.2000
- Sekar N, Lavoie HA and Veldhuis JD. Concerted regulation of steroidogenic acute regulatory gene expression by luteinizing hormone and insulin (or insulin-like growth factor- I) in primary cultures of porcine granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 2000; (141) 11:3983-3992.
- Seeger R, Hanoch T, Rosemberg R, Dantes A, Merz WE, Strauss JF and Amsterdam A. The ERK signaling cascade inhibits gonadotropin-stimulated steroidogenesis. *J Biol Chem* 2001; (276) 17: 13957-13964.
- Shea-Eaton WK, Trinidad MJ, López D, Nackley A and McLean MP. Sterol Regulatory Element Binding Protein 1a regulation of the Steroidogenic Acute Regulatory Protein gene. *Endocrinology*. 2001; (145) 4:1525-1533.
- Spicer LJ and Francisco CC. The adipose obese gene product, leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function. *Endocrinology* 1997; (138)8: 3347- 3379.

- Spicer LJ and Francisco CC. A diobese gene product, leptin: inhibits bovine ovarian thecal cell. *Biol Reprod* 1998; (58) 8: 207- 212.
- Spicer LJ, Alvarez P, Prado TM, Morgan GL y Hamilton TD. Effects of intraovarian infusion of insulin – like growth factor I on ovarian follicular function in cattle. *Dom Anim Endocrinol* 2000; (18): 265 – 278.
- Spicer LJ, Chamberlain CS and Maciel SM. Influence of gonadotropins on insulin- and insulin – like growth factor I (IGF I)-induced steroid production by bovine granulosa cells. *Dom Anim Endocrinol* 2002; (22): 237 – 254.
- Stewart RE, Spicer LJ, Hamilton TD and Keefer BE. Effects of insulin-like growth factor I and insulin on proliferation and basal and luteinizing hormone-induced steroidogenesis of bovine thecal cells: involvement of glucose and receptors for insuline-like growth factor I and luteinizing hormone. *J Anim Sci* 1995; (73): 3719-3731.
- Szanto I and Kahn CR. Selective interaction between leptin and insulin signaling pathways in a hepatic cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; (97):2355-2360.
- Takahasi Y, Okimura Y, Mizuno I, Iida K, Takahasi T, Kaji H, Abe H and Chihara K. Leptin induces mitogen activated protein kinase-dependent proliferation of C3H10T1/2 cells. *J Biol Chem* 1997; (272):12897-12900.
- Tanabe K, Okuya S, Tanizawa K, Matsutani A and Oka Y. Leptin induces proliferation of pancreatic b cell line MIN6 through activation of mitogen-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; (241):765-768.
- Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, devos R, Richards G, Campfield LA, Clark FT and Deeds J. Identification and expression cloning of a Leptin receptor OB R. *Cell* 1995; (83): 1263-1271.
- Tartaglia LA. The Leptin receptor. *Am Society Biochem Mol Biol* 1997; (272): 6093-6069.
- Vicennati V, Gambineri A, Calzoni F, Casimirri F, Macor C, Vettor R and Pasquali R. Serum leptin in obese women with pycystic ovary syndrome is correlated with body weiht and fat distribution but not with androgen and insulin levels. *Metabolism* 1998; (47) 8:988 – 992.
- Voss AK and Fortune. Levels of messenger ribonucleic acid for cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 and 3 $\beta$ -hydroxysteroid d ehydrogenase in bovine preovulatory follicles decrease after the luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 1993a; (132) 2:888-894.
- Voss AK and Fortune. Levels of messenger ribonucleic acid for cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxilase and P450 aromatase in preovulatory bovine follicles decrease after the luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 1993b; (132) 5:2239-2245.
- Xu ZZ, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA and Youngquist RS. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicle during the first follicular wave. *Biol Reprod* 1995; (53):951-957.
- Zachow RJ and Magoffin DA. Dyrect intraovarian effects of leptin: impairment of the synergistic action of insulin like growth factor I on follicle stimulating hormone dependent estradiol 17 $\beta$  production by rat ovarian granulose cells. *Endocrinology* 1997; (138)2: 847- 850.

Zachow RJ, Weitsman SR and Magoffin DA. Leptin impairs the synergistic stimulation by transforming growth factor- $\beta$  of follicle-stimulating hormone dependent aromatase activity and messenger ribonucleic acid expression in rat ovarian granulosa cells. *Biol Reprod* 1999; (61):1104-1109.

Zamorano PL, Mahesh VB, De Sevilla LM, Chorich LP, Bhat GK, Brann DW. Expression and localization of leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. *Neuroendocrinology* 1997; (65):223-228.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse gene and its human homologue. *Nature* 1994; (372):425-432.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN