

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
MODIFICACIONES INDUCIDAS POR GHRELINA EXÓGENA
SOBRE LA ACTIVIDAD FUNCIONAL DE LAS GAMETAS, LA
FERTILIZACIÓN Y EL DESARROLLO EMBRIONARIO
TEMPRANO EN UN MODELO MURINO.

Biól. Eugenia Mercedes Luque

Directora: Prof. Dra. Ana Carolina Martini

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FÍSICAS Y NATURALES



UNC

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**MODIFICACIONES INDUCIDAS POR GHRELINA
EXÓGENA SOBRE LA ACTIVIDAD FUNCIONAL DE LAS
GAMETAS, LA FERTILIZACIÓN Y EL DESARROLLO
EMBRIONARIO TEMPRANO EN UN MODELO MURINO.**

Biol. Eugenia Mercedes Luque

Directora: Prof. Dra. Ana Carolina Martini

CÁTEDRA DE FISIOLÓGÍA HUMANA, FCM - UNC



**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES
Córdoba, Argentina
2015**

COMISIÓN ASESORA

Nombre y Apellido: Dra. Débora J. Cohen; Lugar de Trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), CONICET.

Nombre y Apellido: Prof. Dra. Laura Giojalas; Lugar de Trabajo: Centro de Biología Celular y Molecular (CEBICEM – UNC) e Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIBYT), CONICET - UNC, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, UNC.

Nombre y Apellido: Prof. Dra. Ana Carolina Martini; Lugar de Trabajo: Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas e Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA), CONICET - FCM, UNC.

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:..... Aclaración:.....

Firma:..... Aclaración:.....

Firma:..... Aclaración:.....

Dedicado a:

Diego y Rodrigo

Mamá

La memoria de mi Papá

*“Alcanza tus sueños,
se firme en tus actitudes y perseverante en tu
ideal, pero se paciente, no pretendiendo que todo
llegue de inmediato.
Haz tiempo para todo, y todo lo que es tuyo,
vendrá a tus manos en el momento oportuno.
Y espera con paciencia a que maduren los frutos
para poder apreciar debidamente su dulzura...”*

Mahatma Gandhi.

Convencida que este trabajo es el resultado de la voluntad y colaboración de muchas personas, quiero expresar mi profundo agradecimiento:

- ❖ *A la Prof. Dra. Ana Carolina Martini, directora de esta Tesis de Doctorado, por haberme brindado un espacio en su equipo de trabajo, por confiar en mí y por sobre todo por su calidez humana en momentos difíciles de mi vida. Por su dedicación a mi formación académica y científica. Por la generosidad con que me guió en esta etapa, acompañándome en un marco de confianza y amistad.*

- ❖ *A la Prof. Dra. Graciela Stutz, Profesora Titular de la Cátedra de Fisiología Humana de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba, por haber posibilitado la realización de este trabajo y por sus valiosos aportes.*

- ❖ *A la Prof. Dra. Marta Fiol de Cuneo y especialmente al Prof. Dr. Rubén Daniel Ruiz por las valiosas sugerencias con los que enriquecieron este trabajo.*

- ❖ *A mis compañeros del Laboratorio de Reproducción: Laura, María Emilia, Charo, Valeria, Marina, Belén, Santiago, Pedro, Nicolás, Verónica y Andrés, por su aporte diario, predisposición constante y por hacer que el trabajo de todos los días sea más grato.*

- ❖ *A la Dra. Cintia Díaz por haber brindado generosamente sus conocimientos y su equipamiento de trabajo, necesarios para algunos experimentos de esta Tesis.*

- ❖ *A Diego por su permanente estímulo, apoyo e infinita paciencia. Pero por sobre todo por su gran amor y respeto, acompañándome siempre a la par junto con nuestro hijo Rodrigo.*

- ❖ *A toda mi familia por el estímulo y cariño brindado. Fundamentalmente a mi madre y Betty, ya que sin su apoyo incondicional y permanente colaboración en el cuidado de Rodrigo no hubiese podido finalizar esta etapa.*

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se publicaron y presentaron en Reuniones Científicas los siguientes trabajos.

PUBLICACIONES:

Trabajos publicados en revistas internacionales con referato (ver anexo I)

- * Luque EM, Torres PJ, De Loredó N, Vincenti LM, Stutz G, Santillán ME, Ruiz RD, Fiol de Cuneo M and Martini AC. Role of ghrelin in fertilization, early embryo development, and implantation periods. *Reproduction* 148: 159–167 (2014).

Resúmenes publicados en revistas internacionales con referato

- * Luque EM, Vincenti LM, Ruiz RD, Fiol de Cuneo M y Martini AC. Impact of exogenous ghrelin on early embryo development and implantation in mice. *Biocell* 35:A292 (2011). Trabajo presentado en la Reunión Anual de la Sociedad de Biología Argentina. San Juan, agosto 2011.
- * Luque EM, Vincenti LM, Stutz G, Santillán ME, Ruiz RD, Fiol de Cuneo M and Martini AC. Ghrelin modulates fertilization, early embryo development and implantation. *Endocrine Abstracts* 29:OC6.2 (2012). Trabajo presentado en el XV Congreso Internacional de Endocrinología y XIV Congreso Europeo de Endocrinología. Florencia, Italia, mayo 2012.
- * Luque EM, Torres PJ, de Loredó N, Vincenti LM, Fiol de Cuneo M and Martini AC. Modifications induced by the *in vitro* addition of ghrelin on mice sperm functional activity. *Rev. Fac. Cs. Med.* 70 (supl 1): 28-29 (2013). Trabajo presentado en las XIV Jornadas de Investigación Científica de la Facultad de Ciencias Médicas. Córdoba, octubre 2013.
- * De Loredó N, Luque EM, Torres P, Vincenti LM, Fiol de Cuneo M and Martini AC. Role of ghrelin on nitric oxide secretion and implantation in mice. *Fac. Cs. Med* 70 (supl 1): 32-33 (2013). Trabajo presentado en las XIV Jornadas de Investigación Científica de la Facultad de Ciencias Médicas. Córdoba, octubre 2013.
- * De Loredó N, Díaz Luján CM, Luque EM, Torres PJ, Vincenti LM, Fiol de Cuneo M y Martini AC. Ghrelin e implantación: efecto de las modificaciones en los niveles intragestacionales de ghrelin sobre la implantación y la actividad óxido nítrico sintasa en un modelo murino. *Physiological mini-reviews* 7:46 (2014). Trabajo presentado en la Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología. Buenos Aires, octubre 2014.

- * De Loredó N, Díaz LC, L EM, Vincenti LM, Cantarelli VI, Ponzio MF, Fretes R, Martini AC. Ghrelin modulates embryo implantation by different mechanisms: preliminary result. *Placenta* 36: 511-512 (2015). Trabajo presentado al VI Latin American Symposium on Maternal-Fetal Interaction and Placenta (SLIMP) and V Latin American Symposium on Reproductive Immunology (LASRI). Mar del Plata, abril de 2015.

OTRAS PUBLICACIONES RELACIONADAS:

Trabajos publicados en revistas internacionales con referato

- * Bertoldi ML, Luque EM, Carlini VP, Vincenti LM, Stutz G, Santillán ME, Ruiz RD, Fiol de Cuneo M and Martini AC. Inhibitory effects of ghrelin on sexual behavior: role of the peptide in the receptivity reduction induced by food restriction in mice. *Horm Metab Res* 43: 494-499 (2011).
- * Puechagut P, Martini AC, Stutz G, Santillán ME, Luque EM, Fiol de Cuneo M, Ruiz RD and Vincenti LM. Reproductive performance and fertility in male and female adult mice chronically treated with hexarelin. *Reprod Fertil Dev* 24: 451-460 (2012).

Resúmenes publicados en revistas internacionales con referato

- * Bertoldi ML, Luque EM, Vincenti LM, Desimone MF, Ruiz RD, Fiol de Cuneo M y Martini AC. Modificaciones inducidas por la restricción alimentaria o la administración de ghrelina (agudas o crónicas) sobre la conducta sexual de ratones hembras. *Medicina* 70: 62-63 (2010).
- * Ponzio MF, Luque EM, Ruiz RD, Fiol de Cuneo M, Martini AC. Environmental enrichment in laboratory mice: its effects upon reproductive physiology. *Altex* 28: 267 (2011).
- * Poretti MB, Frautschi C, Martini AC, Luque E, Vincenti L, Bianconi S, Stutz G, Fiol de Cuneo M and Carlini VP. Intrahypothalamic ghrelin administration decreases sperm concentration and motility in mice. *Rev Fac Cs Med* 70 (supl 1): 20-21 (2013).
- * Torres PJ, Luque EM, de Loredó N, Vincenti LM, Fiol de Cuneo M and Martini AC. Effects of intragestational hyperghrelinemia or endogenous ghrelin inhibition on litter postnatal development in mice. *Rev Fac Cs Med* 70 (supl 1): 30-31 (2013).
- * Luque EM, Torres PJ, de Loredó N, Vincenti LM, Fiol de Cuneo M y Martini AC. Papel de ghrelina intragestacional en el desarrollo posnatal y la función

reproductiva de ratones: ¿otro ejemplo de programación fetal? *Physiological Mini Reviews* 7: 33 (2014).

El presente Trabajo de Tesis ha sido realizado con subsidios de:

- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), PIP 2010-2012. Proyecto: “Modificaciones inducidas por ghrelina exógena en la fisiología reproductiva y la conducta sexual de ratones”; (resolución 918/10).
- Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de La Rioja (SECyT-UNLaR), 2012. Proyecto: “Efectos de la administración de ghrelina durante la gestación sobre la fisiología reproductiva y el desarrollo posnatal de ratones”; (resolución 063/11).
- Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de La Rioja (SECyT-UNLaR), 2013. Proyecto: “Papel de ghrelina en los procesos de fertilización, desarrollo embrionario temprano e implantación en un modelo murino”; (resolución 051/12).

Y en el marco de las siguientes Becas Doctorales:

- Beca tipo I de la Secretaria de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT-UNC); 2101-2013 (resolución 962/10).
- Beca tipo II de la Secretaria de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT-UNC); 2014-2015 (resolución 2279/13).
- Beca tipo II del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET); 2014-2016 (resolución 2936/13).

ÍNDICE:

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1a. Ghrelina características generales.....	6
1b. Ghrelina y su función en la reproducción.....	7
1b ₁ . Fisiología de las gametas y la fertilización: papel de ghrelina.....	8
1b ₂ . Ghrelina: desarrollo embrionario, felat y postnatal.....	11
1c. Objetivos.....	14
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
2a. Animales de experimentación.....	16
2b. Desarrollo de los objetivos.....	16
2b ₁ . Explorar un posible efecto directo de Ghr sobre la actividad funcional de los espermatozoides, su activación para la fertilización y sobre la fertilización en sí misma.....	16
2b ₂ . Evaluar el papel del péptido en la fertilización <i>in vivo</i>	18
2b ₃ . Determinar el papel del péptido en el desarrollo embrionario temprano y la implantación.....	18
2b ₄ . Evaluar el papel del péptido en la implantación, la secreción uterina de óxido nítrico y la concentración plasmática de progesterona (P ₄).....	19
2c. Parámetros evaluados.....	20
2c ₁ . Obtención de los espermatozoides y parámetros espermáticos evaluados <i>in vitro</i>	20
2c ₂ . Obtención de los ovocitos y parámetros ovocitarios evaluados <i>in vitro</i>	21
2c ₃ . Determinación de las dosis de Ghr y antagonista a administrar <i>in vivo</i>	22
2c ₄ . Parámetros de éxito reproductivo evaluados (<i>in vivo</i>) en las hembras.....	23
2c ₅ . Evaluación histológica de los cuernos uterinos.....	25
2c ₆ . Inmunohistoquímica para eNOS e iNOS.....	26
2c ₇ . Dosaje plasmático de P ₄	27

2d. Tratamiento estadístico de los resultados.....	27
3. RESULTADOS.....	28
3a. Experimentos <i>in vitro</i>	28
Efectos de Ghr sobre la actividad funcional de los espermatozoides, su activación para la fertilización y sobre la fertilización en sí misma.....	28
3b. Experimentos <i>in vivo</i>	37
Papel de Ghr en la fertilización <i>in vivo</i>	37
Papel de Ghr en el desarrollo embrionario temprano y la implantación.....	42
Evaluación histológica y de la expresión inmunohistoquímica para NOS en úteros de hembras tratadas con Ghr y/o su antagonista.	
Cuantificación de la concentración de P ₄ plasmática.....	50
4. DISCUSIÓN.....	61
4a. Experimentos <i>in vitro</i>	61
Efectos de Ghr sobre la actividad funcional de los espermatozoides, su activación para la fertilización y sobre la fertilización en sí misma.....	61
4b. Experimentos <i>in vivo</i>	65
Papel de Ghr en la fertilización <i>in vivo</i>	65
Papel de Ghr en el desarrollo embrionario temprano y la implantación.....	67
Evaluación histológica y de la expresión inmunohistoquímica para NOS en úteros de hembras tratadas con Ghr y/o su antagonista.	
Cuantificación de la concentración de P ₄ plasmática.....	69
4c. Conclusiones.....	74
Experimentos <i>in vitro</i>	74
Experimentos <i>in vivo</i>	74
5. BIBLIOGRAFÍA.....	77
6. ANEXO 1.....	88

ABREVIATURAS:

%:	porcentaje o por ciento (según corresponda)
°C:	grados centígrados
μM:	micromolar
μm:	micrómetros
ANOVA:	análisis de la varianza
Ant:	antagonista
ARNm:	ácido ribonucleico mensajero
Ca⁺⁺:	calcio
ClNa:	cloruro de sodio
CO₂:	dióxido de carbono
Con:	control
(D-Lys₃)GHRP-6:	antagonista de ghrelina
DPBS:	buffer fosfato salino Dulbecco
EIA:	enzimoinmunoanálisis
eNOS:	óxido nítrico sintasa endotelial
g:	gravedades
GH:	hormona de crecimiento
Ghr:	ghrelina
GHS-R:	receptor de ghrelina
GHS-R1a:	receptor de ghrelina 1a (funcional)
GHS-R1b:	receptor de ghrelina 1b (truncado= no funcional)
H/E:	hematoxilina/eosina
H258:	Hoechst 33258
H₂O:	agua
H₂O₂:	peróxido de hidrógeno
hCG:	gonadotropina coriónica humana
h:	hora/s
IgG:	Inmunoglobulina G
iNOS:	óxido nítrico sintasa inducible
kg:	kilogramo
LH:	hormona leutinizante
M:	molar

min:	minuto
ml:	mililitros
ng:	nanogramos
nmol:	nanomoles
NO:	óxido nítrico
NOS:	óxido nítrico sintasa
P₄:	progesterona
PAS:	ácido peryódico de Schiff
PBS:	buffer fosfato salino
pH:	potencial hidrógeno
PMS:	suero de yegua preñada
RA:	reacción acrosomal
s.c.:	subcutáneo
SFB:	suero fetal bovino
TM±EEM:	media ± error estándar de la media
ug:	microgramos
UI:	unidades internacionales
uNK:	células natural killer uterinas

RESUMEN:

Ghrelin (Ghr) es un polipéptido que vincula el balance energético con la reproducción. Si bien la hiperghrelinemia secundaria a restricción alimentaria reduce el éxito reproductivo, los niveles de Ghr aumentan fisiológicamente durante la gestación, por lo que se ha sugerido que esta proteína cumple un papel importante en este proceso.

Los objetivos del presente Trabajo de Tesis fueron: **1)** explorar mediante experimentos *in vitro*, los efectos de Ghr (10^{-9} y 10^{-7} M) y/o su antagonista ((D-Lys₃)GHRP-6, 10^{-5} y 10^{-4} M) sobre la motilidad, vitalidad y reacción acrosomal espontánea o inducida por progesterona (P₄) a los 3, 40 y 120 min de incubación, así como sobre la fertilización *in vitro*; **2)** determinar el papel de Ghr en la fertilización *in vivo*, inyectando hembras de ratón con Ghr (2 ó 4 nmol/animal/día) y/o el antagonista (6 nmol/animal/día) durante una semana previa a la cópula y hasta la misma, evaluando a los 18 días de gestación el éxito reproductivo; **3)** establecer el papel de Ghr en el desarrollo embrionario temprano y la implantación, inyectando a las hembras preñadas con Ghr y/o el antagonista, **a)** desde la inducción de ovulación hasta las 80 h de la misma, evaluando el porcentaje de fertilización y el desarrollo embrionario pre-implantatorio o, **b)** desde el 3° al 7° día de preñez, sacrificando las hembras a los 18 días poscópula y cuantificando el éxito reproductivo. En base a los resultados se agregó un cuarto objetivo: **4)** evaluar, en hembras inyectadas con la mayor dosis de Ghr y/o el antagonista desde el día 3 al 7 de gestación, la anátomo-patología uterina, la marcación inmunohistoquímica de óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) e inducible (iNOS) y la concentración plasmática de P₄.

Referente al objetivo 1, observamos que Ghr disminuyó la motilidad espermática y aumentó la reacción acrosomal a los 3 min de incubación (motilidad: control=54,1±4,3 vs Ghr 10^{-9} M=42,7±6,0 y Ghr 10^{-7} M=40,7±5,9. Reacción acrosomal: control=9,6±1,2 vs Ghr 10^{-9} M=13,2±1,2; n=8/grupo, $p<0,05$). Este efecto no se detectó a los 40 ni a los 120 min. Los tratamientos no modificaron los índices de fertilización *in vitro*, ni los de partenogénesis.

En cuanto al objetivo 2, Ghr 4 nmol aumentó el porcentaje de hembras con pérdida embrionaria (Ghr 4 nmol=73 vs control=11, n=11 y 9/grupo respectivamente, $p<0,05$) y el antagonista aumentó el porcentaje de hembras con atrofia fetal y el porcentaje de fetos atrofiados/hembra.

En el objetivo 3a, el antagonista disminuyó la tasa de fertilización y todos los tratamientos retrasaron el desarrollo embrionario (porcentaje de blastocitos: control=78 vs Ghr 4 nmol=51, Ghr 2 nmol=62, Ghr+antagonista=48 y antagonista=61, n=79-102 embriones/tratamiento, $p<0,05$). Cuando los tratamientos fueron aplicados durante el período peri-implantatorio (objetivo 3b), tanto Ghr como el antagonista disminuyeron el peso fetal y la ganancia de peso de las hembras gestantes ($p<0,05$). Asimismo, Ghr 4 nmol, Ghr+antagonista y antagonista aumentaron el porcentaje de hembras con pérdida embrionaria o atrofia fetal.

En el cuarto objetivo, se detectó un aumento significativo de las resorciones embrionarias y del porcentaje de atrofia fetal en las hembras tratadas con el antagonista; aparentemente los efectos de Ghr ocurrirían en forma más tardía. Ghrelin y el antagonista aumentaron la expresión de eNOS e iNOS uterina. Como hallazgos preliminares observamos que los tratamientos con Ghr o el antagonista aumentaron la marcación de células “natural killer” uterinas, macrófagos y linfocitos.

En resumen, es aparente que existe un nivel intragestacional “ideal” de Ghr, por encima o debajo del cual se registran alteraciones en la gestación temprana. Algunas evidencias preliminares apuntan al óxido nítrico (NO) y a la respuesta inmunológica materna como posibles causas de estas alteraciones.

ABSTRACT:

The polypeptide ghrelin (Ghr) links energy balance and reproduction. Hyperghrelinemia secondary to food restriction exerts negative effects on reproductive functions. Nevertheless, Ghr concentrations present a physiological increase during gestation, suggesting that Ghr could exert an important role on pregnancy.

The objectives of this study were: **1)** using an *in vitro* approach, to explore the effects of Ghr (10^{-9} y 10^{-7} M) and/or its antagonist ((D-Lys₃)GHRP-6, 10^{-5} y 10^{-4} M) on sperm motility, viability, acrosome reaction (after 3, 40 and 120 min of incubation), and fertilization index; **2)** to determine the *in vivo* role of Ghr on fertilization, by injecting female mice with Ghr (2 ó 4 nmol/animal/day) and/or its antagonist (6 nmol/animal/day) from one week previous to mating confirmation and evaluating the reproductive success at gestation day 18; **3)** to evaluate the role of Ghr on embryo development and implantation, by injecting females with Ghr or its antagonist, **a)** from ovulation induction to 80 h after ovulation and evaluating fertilization index and embryo development or, **b)** from day 3 to 7 of gestation, by euthanasia of the females at pregnancy day 18 and quantifying reproductive success. Based on the results, we further investigated: **4)** in females injected with the higher dose of Ghr and/or its antagonist from day 3 to 7 of gestation, the uterine anatomo-pathology, the expression of endothelial (eNOS) or inducible (iNOS) nitric oxide synthase (by immunohistochemistry) and plasma progesterone concentrations.

In experiment 1, Ghr significantly diminished sperm motility and increased acrosome reaction after 3 min of incubation (motility: control= 54.1 ± 4.3 vs Ghr 10^{-9} M= 42.7 ± 6.0 y Ghr 10^{-7} M= 40.7 ± 5.9 . Acrosome reaction: control= 9.6 ± 1.2 vs Ghr 10^{-9} M= 13.2 ± 1.2 ; n=8/group, $p < 0.05$). After 40 or 120 min of incubation, no effects were detected. *In vitro* fertilization or parthenogenic indexes were not modified either.

In experiment 2, Ghr 4 nmol increased the percentage of females presenting embryo loss (Ghr 4 nmol=73 vs control=11, n=11 y 9/group respectively, $p < 0.05$) and the antagonist increased the percentages of females with fetal atrophy and the percentage of fetuses atrophied/female.

In experiment 3, the antagonist significantly reduced the fertilization index and all treatments delayed embryo development (porcentaje of blastocytes: control=78 vs Ghr 4 nmol=51, Ghr 2 nmol=62, Ghr+antagonist=48 and antagonist=61, n=79-102 embryo/treatment, $p < 0.05$). When the treatments were applied during the peri-implantation period (objective 3b), not only Ghr but also the antagonist decreased fetal weight and females gained weight thorough pregnancy ($p < 0.05$). Moreover, Ghr 4 nmol, Ghr+antagonist and the antagonist increased the percentage of females with embryo loss or fetal atrophy.

In experiment 4 we detected in females treated with the antagonist, a significant increase in embryo resorption and in the percentage of fetal atrophy; apparently Ghr effects appeared later during gestation. Ghrelin and the antagonist enhanced uterine eNOS and iNOS expression. As preliminary results, we detected that Ghr or the antagonist increase uterine natural killer cells, lymphocytes and macrophages.

In summary, apparently there is an “ideal” intragestational Ghr level; when this concentration increases or decreases, gestational alterations seem to emerge. Some preliminary evidences point out to nitric oxide or maternal immunological response as the possible causes.

1. INTRODUCCIÓN:

A menudo los animales, se encuentran expuestos a situaciones climáticas fluctuantes propias de la ecorregión que ocupan; las condiciones invernales en climas no tropicales pueden llegar ser verdaderos desafíos energéticos, ya que la demanda metabólica aumenta y los recursos calóricos disminuyen (1). Debido a que la reproducción es un proceso energéticamente costoso, es que los mecanismos fisiológicos que controlan la fertilidad están recíprocamente ligados a aquéllos que controlan el balance calórico. Juntos, optimizan el éxito reproductivo bajo condiciones metabólicas fluctuantes, asegurando que la preñez y la lactancia sólo ocurran en condiciones energéticamente favorables. Es así como, los estímulos metabólicos, mediadores hormonales y/o neuropéptidos que controlan el balance energético también intervienen en el control de la reproducción, tanto en los aspectos orgánicos como en los conductuales (2, 3).

Al respecto, es conocida la participación de algunos de estos mediadores como moduladores de: el inicio de la pubertad, la maduración gonadal, la ocurrencia y continuidad de los ciclos estrales, la eficacia del proceso de fertilización, la implantación, el desarrollo intrauterino y/o las funciones del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (4-7). Como un ejemplo, Young y col. (8), han demostrado que la restricción alimentaria del 70% induce regresión testicular mediada por apoptosis y puede inhibir el inicio y mantenimiento de la capacidad reproductiva, debiendo alcanzarse un umbral nutricional determinado para prevenir estas alteraciones.

Puesto que las hembras invierten mayor cantidad de energía y tiempo en la producción de una prole viable, son especialmente susceptibles a la falta de nutrientes (9). No obstante, si la preñez se llevara a cabo aún en condiciones energéticas negativas, podría comprometerse la capacidad reproductiva futura de las crías. En un estudio realizado por Léonhardt y col. (7), se demostró que la restricción alimentaria (50%) de ratas en la etapa prenatal (día 14 al 21 de gestación) y/o durante la lactancia, produce retraso en el crecimiento testicular y ovárico de las crías.

En cuanto a las sustancias que participan en la modulación de la ingesta y el balance nutricional del organismo, mencionadas en el primer párrafo, se destacan ghrelina (Ghr) y leptina. Estos péptidos, producen efectos antagónicos y sus concentraciones plasmáticas se correlacionan con el nivel nutricional del individuo. Ambos ligandos han

sido relacionados con la fisiología reproductiva en numerosas especies de mamíferos. Por ello constituyen “nexos” entre la reproducción y la nutrición; ya que su síntesis y la presencia de sus receptores no ocurren únicamente en estructuras corporales vinculadas a la homeostasis de los nutrientes, sino también en tejidos y órganos directamente implicados en la reproducción (10-12). En referencia a los objetivos del presente Trabajo de Tesis, se comentan aspectos relacionados a Ghr.

1a. Ghrelina; características generales:

Ghrelina fue originalmente identificada en 1999, como el ligando endógeno para el receptor GHS-R (“growth hormone secretagogue receptor”), que había sido descrito años antes (13). Esta hormona es un polipéptido de 28 aminoácidos que posee una fuerte actividad estimuladora de la secreción de las células somatotropas (14, 15). Se expresa principalmente en estómago e hipotálamo y regula a nivel central, la liberación de la hormona del crecimiento (GH) y la ingesta de alimentos, entre otros. Asimismo, se ha comprobado que la Ghr sistémica atraviesa la barrera hemato-encefálica (16) y es producida además en otros numerosos órganos, tales como intestino, hipófisis, hígado, riñón, corazón, páncreas, tiroides, pulmón, endotelio y sistema reproductivo (11, 15-19).

El precursor de este péptido (prepro-ghrelina) está compuesto por 117 aminoácidos. Antes de ser secretada, una parte de la Ghr es modificada, sufriendo un proceso de esterificación en el citoplasma que se encarga de añadir un grupo n-octanoilo a la tercera serina; es precisamente este proceso el que otorga actividad biológica al péptido (11, 17).

La acción de Ghr es mediada principalmente por receptores en serpentina ligados a proteína G. Se han identificado dos subtipos de GHS-R; uno largo llamado GHS-R1a y un receptor corto, GHS-R1b. El primero tiene actividad funcional mientras que, el GHS-R1b, carece de los dominios transmembrana 6 y 7 por lo que no presenta afinidad por el ligando (11, 20, 21). Algunos estudios han sugerido la existencia de otros receptores para Ghr aún no descritos, ya que el GHS-R1a por sí solo no puede explicar todas las acciones biológicas informadas para el péptido (22-26).

Ghrelina posee una vida media de 30 min y posteriormente es inactivada y biodegradada por proteasas plasmáticas y esterases tisulares (16, 27). En cuanto a su ritmo de secreción, se conoce que en la rata, Ghr exhibe un patrón de liberación episódico de 5 a 6 pulsos cada tres horas; a la vez, la secreción de esta hormona está íntimamente ligada al estado nutricional del organismo. Se conoce que los niveles plasmáticos de Ghr aumentan

durante la desnutrición, ya que los principales factores que estimulan su síntesis son la hipoglucemia y el ayuno, mientras que los factores inhibidores más importantes son la ingesta de alimentos y la obesidad (10, 11, 16, 28).

1b. Ghrelina y su función en la reproducción:

Se ha descrito la expresión del péptido y de sus receptores específicos en numerosos sitios del aparato reproductivo, incluyendo trompas de Falopio, ovario, útero, placenta, próstata y testículos (en células de Leydig y/o Sertoli) e incluso en las gametas (11, 17, 29-33). Se ha informado además que en ratas machos, la Ghr es capaz de inhibir la síntesis de LH y testosterona (34-36) mientras que en hembras, el bloqueo del pico preovulatorio de gonadotrofinas o la reducción de la concentración plasmática de LH, provocan una disminución en los niveles de ARNm para Ghr en el ovario; esto sugiere que existe una vinculación entre la secreción de gonadotrofinas y la síntesis del péptido (31). Aunque la Ghr sistémica modifica la fisiología del eje reproductivo mediante patrones complejos, en líneas generales puede afirmarse que ejerce efectos inhibitorios sobre dicho eje, especialmente en situaciones de hiperghrelinemia crónica (1, 3, 37, 38).

No obstante, la relación de Ghr con la función reproductiva no se limita únicamente a la actividad del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal. Existen algunas evidencias que vinculan al péptido con el proceso de fertilización, implantación, desarrollo embrionario y fetal y más aún, con el desarrollo posnatal de la camada (39, 40). En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio, determinamos que el tratamiento crónico (durante 30 días) de hembras de ratón adultas con un análogo de Ghr (hexarelina, 200 ug/kg/día) seguido de la inyección del mismo péptido durante los primeros 6 días poscópula, provocaba una disminución en el número de fetos y en el índice fetos/cuerpos lúteos con respecto a animales inyectados con el vehículo (41). Asimismo, en otro estudio en el cual se inyectó a hembras de ratón preñadas con Ghr (4 nmol/animal/día) o con un antagonista ((D-Lys₃)GHRP-6; 6 nmol/animal/día) durante toda la gestación, detectamos que el (D-Lys₃)GHRP-6 adelantó la maduración sexual de las crías y el volumen gonadal. Al llegar a la adultez sin embargo, las crías hembras de las madres tratadas con Ghr o antagonista, mostraron una mayor tendencia a sufrir pérdida embrionaria y atrofia fetal, situación que podría atribuirse a fenómenos de programación fetal (39).

Es decir, que Ghr podría constituir una importante señal metabólica que “advirtiera” al organismo acerca de la escasez en la disponibilidad de nutrientes,

reduciendo/inhibiendo la fertilidad y evitando de esta forma, la preñez y la lactancia en condiciones energéticas desfavorables.

1b₁. Fisiología de las gametas y la fertilización; papel de ghrelina:

El éxito reproductivo depende, entre otros factores, de una correcta actividad del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, cuyas hormonas aseguran la producción y disponibilidad de gametas de buena calidad. Sin embargo estas gametas, luego de abandonar las gónadas, deben sufrir una serie de procesos de maduración que las preparan para la fertilización (42, 43).

La espermatogénesis es el primer evento que ocurre en el tracto reproductor masculino; en este proceso la espermatogonia (célula madre de los espermatozoides) se divide, dando como resultado luego de varias etapas intermedias, cuatro gametas masculinas; los espermatozoides. Estas células haploides, altamente especializadas, abandonan el túbulo seminífero para recorrer la *rete testis* y llegar hasta el epidídimo. La gameta masculina no posee aún motilidad ni capacidad fertilizante (42, 43).

Durante el recorrido por el epidídimo el espermatozoide sufre la denominada maduración epididimaria y, con ella, la adquisición de su motilidad. Durante este proceso de maduración, ocurren cambios físicos y químicos en los lípidos de la membrana, en el patrón de distribución de proteínas y una transferencia de colesterol desde el líquido epididimario hacia el plasmalema espermático. Se adsorben además glicoproteínas y polipéptidos que otorgan estabilidad a la membrana (“cubierta primaria”) evitando la ocurrencia prematura de otros procesos tales como la reacción acrosomal (42, 44, 45).

Cuando el espermatozoide es eyaculado y entra en contacto con el plasma seminal sufre cambios adicionales en el plasmalema, formándose la “cubierta secundaria”, que le otorga mayor estabilidad a la membrana (42, 44, 45). Estas gametas no son capaces aún de fertilizar al ovocito. Para ello, deben permanecer cierto tiempo en el tracto reproductivo de la hembra tras el cual adquieren capacidad fecundante. Esto es posible ya que durante este período, caracterizado por la quiescencia espermática, ocurren modificaciones metabólicas y alteraciones en la permeabilidad de la membrana a diversos iones, fenómeno que se ha denominado capacitación espermática (42, 46). Este proceso es reversible y Ca^{++} dependiente e implica una serie de cambios tales como separación y/o alteración de materiales de las cubiertas primaria y secundaria (glicoproteínas, polipéptidos), la

redistribución de fosfolípidos de membrana y, principalmente, la remoción de colesterol (42, 44, 45).

La capacitación espermática también puede llevarse a cabo en un medio de incubación adecuado. El tiempo requerido para la capacitación *in vitro* varía entre las diferentes especies de roedores: 1-2 h para los ratones (47), 2,5 h para los hámsters (48) y 5-7 h para las ratas (49). La evidencia acumulada sugiere que el evento que inicia la capacitación espermática es el eflujo de colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide. Esto aumenta la permeabilidad y fluidez de la membrana y estimula la entrada de iones Ca^{++} , iniciando una cascada de señalización que da como resultado la capacitación (45). Este proceso, permite la ocurrencia de nuevos eventos tales como la hiperactivación (modificación de los patrones de movilidad espermática) y la reacción acrosomal (42, 50).

El acrosoma es una pequeña vesícula situada en el extremo apical de la cabeza del espermatozoide, justo por encima del núcleo (42). Durante el proceso de reacción acrosomal (RA) se fusiona la membrana citoplásmica con la membrana acrosomal externa, provocando la formación de poros y la liberación de enzimas, tales como la hialuronidasa y la acrosina. Las mismas son esenciales para que el espermatozoide pueda atravesar las células del cúmulus, llegar hasta la zona pelúcida y fertilizar al ovocito (51).

Está aceptado que estos dos eventos, capacitación y reacción acrosomal, están unidos secuencial y funcionalmente y que varios de los procesos de activación de señales intracelulares que ocurren durante la reacción acrosomal, fueron iniciados durante la capacitación. Las evidencias indican que para que estos cambios ocurran, es necesario el influjo de calcio extracelular (42, 52).

Por su parte las hembras, desde el nacimiento, poseen un número limitado de gametas. El proceso meiótico que determina la formación de las mismas se denomina ovogénesis y comienza durante la etapa fetal. En dicha fase, la meiosis se detiene en el estadio de profase I, dando lugar a la formación del denominado ovocito primario; las hembras de mamíferos nacen con todas sus gametas detenidas en esta etapa. Alcanzada la pubertad y durante cada ciclo sexual, estos ovocitos primarios aumentan de tamaño y adquieren estructuras importantes para la fertilización, tales como la zona pelúcida y los gránulos corticales. Una vez que el ovocito ha completado su crecimiento, ocurre un nuevo proceso denominado maduración meiótica; éste consiste en la reanudación de la meiosis

(hasta metafase II, con la consiguiente expulsión del primer corpúsculo polar) originando el ovocito secundario y la posterior ovulación (42).

Para que la fertilización sea exitosa, deben ocurrir diversos procesos concatenados. Estos son: la capacitación espermática, la unión del espermatozoide capacitado a la zona pelúcida del ovocito, la inducción de la reacción acrosomal (se discute el orden en que ocurren estos últimos dos procesos), la penetración de la zona pelúcida, la incorporación del espermatozoide al citoplasma ovocitario, la activación del ovocito, la formación de los pronúcleos, la migración de los pronúcleos y unión del genoma (singamia) y finalmente, la iniciación de las divisiones mitóticas (desarrollo embrionario temprano) (44, 53).

La activación del ovocito y la reacción cortical ocurren conjuntamente con la incorporación física del espermatozoide. La activación ovocitaria consiste principalmente en la finalización de la meiosis, con la consecuente liberación del segundo corpúsculo polar; este proceso es Ca^{++} dependiente. La reacción cortical evita la incorporación de más de un espermatozoide al citoplasma ovocitario y finalmente, los pronúcleos se unen y son rodeados por una membrana nuclear de origen materno (42, 44, 45).

En base a los párrafos anteriores, es importante destacar que uno de los mecanismos de acción de Ghr es el aumento en la concentración intracelular de Ca^{++} a través de una proteína Gq (54, 55). Ya que el desarrollo de la motilidad espermática y que la mayoría de los procesos de preparación y/o activación de las gametas para la fertilización (tales como la capacitación, la reacción acrosomal y la activación ovocitaria) y/o la fertilización en sí misma son fenómenos calcio-dependientes, las variaciones en las concentraciones de Ghr podrían alterar de alguna manera estos procesos. Sin embargo hasta el presente, no se ha estudiado el efecto de la adición *in vivo* o *in vitro* de Ghr sobre estos fenómenos o sobre la calidad de las gametas. En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio en el que añadíamos al medio de cultivo hexarelina (10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9}M), detectamos que este hexapéptido disminuía la motilidad espermática luego de 3 min de su adición. Aparentemente este efecto inhibitorio era pasajero, ya que a los 20 min de incubación no se observaron diferencias en este parámetro (56). No existen a nuestro entender, estudios que evalúen los efectos de la adición *in vitro* de Ghr sobre la actividad funcional espermática o sobre la fertilización *in vitro*.

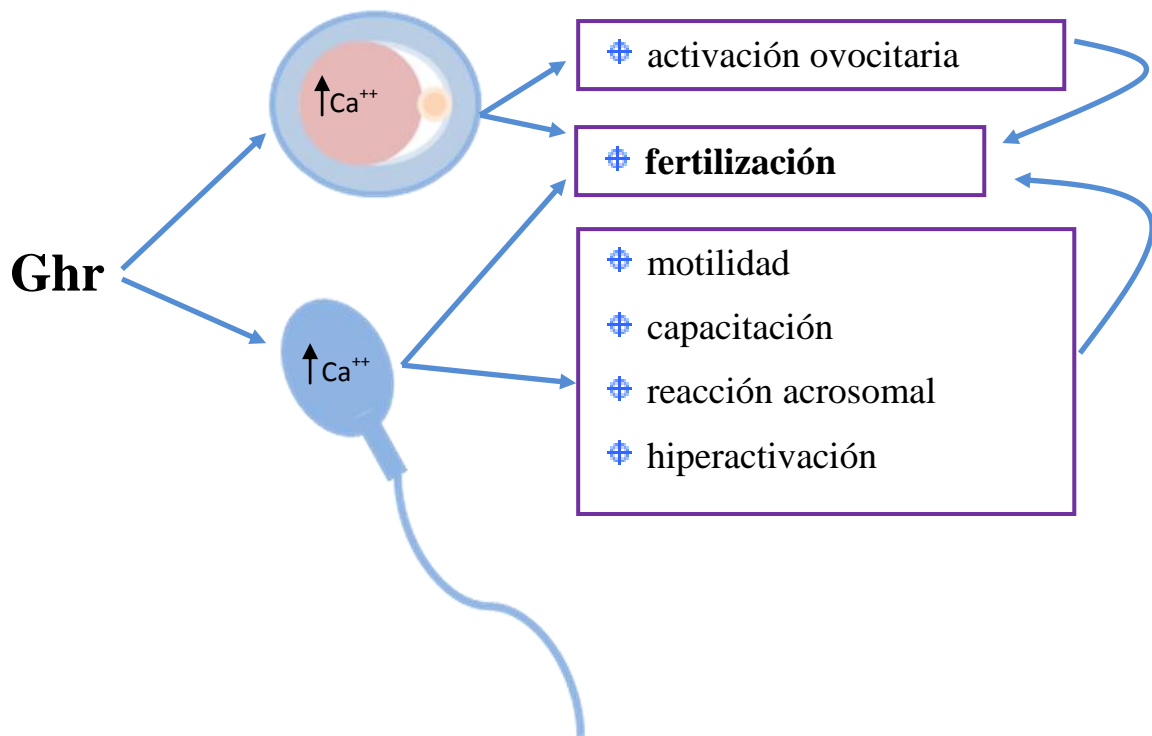


Figura 1: Representación esquemática de los efectos informados para ghrelina (Ghr) sobre la concentración intracelular de calcio (Ca^{++}). Posibles efectos sobre la actividad funcional de las gametas.

1b₂. Ghrelina; desarrollo embrionario, fetal y posnatal:

Durante la preñez, aumentan los niveles fisiológicos de Ghr, tanto fetales como maternos; esto se ha verificado en todas las especies de mamíferos estudiadas (18, 57-63). *Esto sugiere que la hiperghrelinemia gestacional cumple una función importante.*

Se ha descrito que en algunas especies de mamíferos el pico plasmático materno del péptido se registra en el primer tercio de la preñez (cerdas) (59, 60), en otras en el segundo (humanos) (61, 62), mientras que en ratas y ovejas se ha reportado en etapas más avanzadas de la gestación (58, 61-63). Esta falta de consenso acerca de la etapa gestacional en que ocurre el aumento máximo de Ghr, se acompaña de incertidumbres acerca del origen de la misma; pudiendo ser sintetizada en diversos tejidos tanto maternos como fetales (64). En un trabajo realizado por Shibata y col. (58), empleando un modelo de roedores, informaron que si bien los niveles plasmáticos de Ghr aumentan significativamente durante la preñez, no ocurría lo mismo con la concentración del péptido en estómago, siendo que normalmente este órgano aporta entre el 65-70% de la Ghr endógena. Esto sugiere que los cambios en la concentración gestacional del péptido se deberían a modificaciones en la secreción del mismo a partir de otros tejidos; entre ellos se

postulan el cuerpo lúteo, la placenta, el endometrio decidual y/o el páncreas fetal (19, 31, 60, 63).

Por otro lado se ha informado la presencia del GHS-R1a en placenta, endometrio y trompas de Falopio (19, 63, 65), lo cual sugiere que Ghr podría constituir uno de los numerosos péptidos que participan en el proceso de implantación embrionaria (19, 66). Apoyando esta hipótesis, en humanos se ha demostrado la síntesis de Ghr en células deciduales y extravelosas placentarias; asimismo, se ha comprobado que *in vitro*, este péptido es capaz de estimular la decidualización de células del estroma endometrial (19).

Se ha demostrado además, en modelos no reproductivos, que Ghr estimula la secreción de óxido nítrico (NO) (67) y éste, a su vez, se encuentra asociado no solo a la regulación de la angiogénesis decidual, sino también a la embriogénesis y a la relajación del músculo liso uterino (68). Estas evidencias conducen a postular a Ghr como uno de los numerosos péptidos que regulan el proceso de implantación embrionaria (19).

Con respecto al desarrollo embrionario, un estudio *in vitro* realizado en embriones preimplantatorios de ratón, demostró en estas estructuras la expresión de ARNm, tanto de Ghr como de su receptor, desde la etapa de mórula. Se determinó además que la adición del péptido al medio de cultivo retardaba el desarrollo embrionario (69). Sin embargo, cuando se evaluó el efecto de concentraciones semejantes de Ghr sobre el desarrollo embrionario porcino, se detectó que esta sustancia estimulaba la formación de blastocitos a partir de embriones fertilizados *in vitro* o partenogénicos y se comprobó que estos efectos eran evidentes desde etapas previas a las de mórula (70). Estudios recientes apoyan estas evidencias y han confirmado la expresión del ARNm para Ghr desde la etapa de ovocito secundario hasta la de blastocito, con la mayor marcación en ovocitos en metafase II y estadio embrionario de 2 células (57, 71). Es por esto que, más allá de las diferencias detectadas entre los diversos autores, es evidente que Ghr (materna y/o fetal) es capaz de afectar el desarrollo embrionario preimplantatorio. Al respecto, se ha informado también que la Ghr materna atraviesa fácilmente la placenta hacia la circulación fetal y el líquido amniótico y que esta sustancia tendría un efecto estimulador en la proliferación de células epiteliales embrionarias en cultivo. Estos autores determinaron además, que la inmunización activa de las madres contra Ghr durante la preñez, disminuyó el peso corporal de las crías; coincidentemente, el tratamiento de las hembras preñadas con Ghr desde el día 14 de gestación hasta el final de la misma, provocó un aumento en el peso de la camada (18).

Sin embargo no todos los investigadores coinciden en que la hiperghrelinemia materna estimula el desarrollo fetal. Diversos autores han demostrado que la restricción alimentaria de ratas preñadas (con el aumento concomitante de los niveles de Ghr plasmática) provoca disminución del peso corporal de las crías al nacer, aumento en los niveles de Ghr plasmática fetal e incremento en el número de células pancreáticas positivas para Ghr, siendo este tejido el principal productor del polipéptido durante la etapa fetal y posnatal temprana (64, 72, 73).

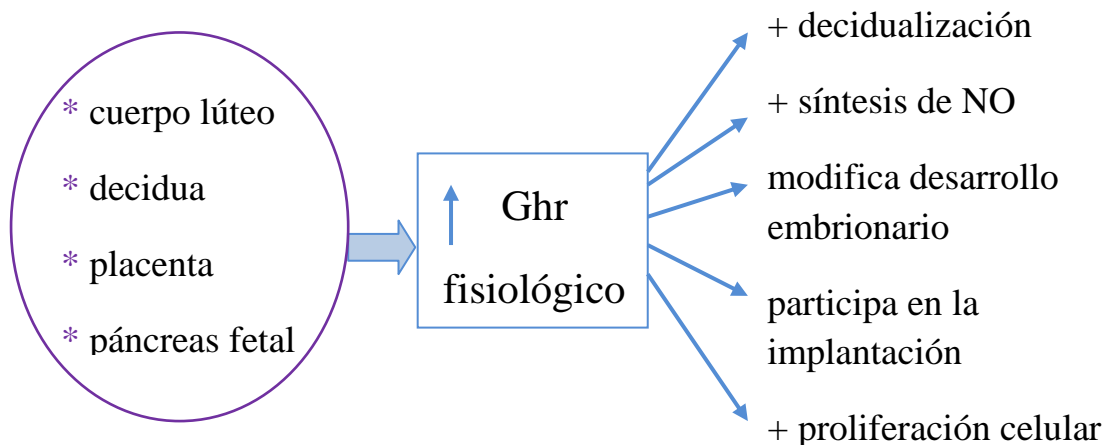


Figura 2: Representación esquemática del origen de ghrelina (Ghr) intragestacional y sus posibles efectos. += estimula

Es importante resaltar que el papel de Ghr en el control de la actividad reproductiva ha recibido hasta la fecha atención limitada, invirtiéndose los mayores esfuerzos en la exploración de sus efectos metabólicos y orexigénicos (34). Los estudios en los que se evalúa el papel de esta sustancia en la funcionalidad de las gametas, en los procesos de preparación de las mismas para la fertilización, en la fertilización en sí misma, en la implantación y/o en el desarrollo embrionario, además de escasos son contradictorios y, en muchas situaciones, las evidencias han surgido a partir de modelos *in vitro*. *Es por ello que consideramos que es necesario un estudio sistematizado del tema, puesto que la hiperghrelinemia podría ejercer efectos estimuladores o inhibidores de la reproducción, de acuerdo a la etapa reproductiva en que se presente (gestacional o pregestacional) y a los niveles plasmáticos que alcance (fisiológicos o patológicos).*

En base a resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio y a la bibliografía disponible, podemos hipotetizar que: *“El aumento en los niveles plasmáticos de ghrelina*

es capaz de inducir alteraciones, no sólo en la fisiología de las gametas, su activación para la fertilización y la fertilización en sí misma, sino también en el desarrollo embrionario temprano y la implantación.”

1c. Objetivos:

Para comprobar esta hipótesis nos propusimos alcanzar los siguientes objetivos para lo cual se trabajó con ratones machos o hembras *Albino Swiss* sexualmente maduros y/o con sus gametas, a los que se trató *in vivo* o *in vitro* con Ghr y/o con un antagonista de la misma:

Objetivo 1: Explorar un posible efecto directo de Ghr sobre la actividad funcional de los espermatozoides, su activación para la fertilización y sobre la fertilización en sí misma, evaluando el efecto de la adición *in vitro* de Ghr con o sin la adición previa de un antagonista del receptor sobre:

a) la actividad funcional de espermatozoides epididimarios de ratón en función del tiempo de incubación en medio de Tyrode;

b) la actividad funcional de espermatozoides epididimarios de ratón tras su incubación en condiciones capacitantes y

c) el porcentaje de fertilización *in vitro* de ovocitos homólogos, incubando tanto los espermatozoides como los ovocitos en presencia del péptido y/o su antagonista.

Objetivo 2: Evaluar el papel del péptido en la fertilización *in vivo*, investigando en hembras inyectadas con Ghr y/o con el antagonista del receptor durante una semana previa a la cópula y hasta la confirmación de la misma, los efectos de estos tratamientos sobre el éxito reproductivo a los 18 días poscópula.

Objetivo 3: Determinar el papel del péptido en el desarrollo embrionario temprano y la implantación, investigando en hembras preñadas e inyectadas con Ghr y/o con el antagonista del receptor durante los primeros días de gestación, los efectos de estos tratamientos sobre:

a) el desarrollo embrionario pre-implantatorio, inyectando a las hembras desde la inducción de ovulación hasta el tercer día de preñez y

b) el éxito reproductivo, inyectando a las hembras desde el 3º al 7º día de preñez y sacrificándolas a los 18 días poscópula.

En base a los resultados obtenidos en el objetivo 3b, durante el desarrollo de este Trabajo de Tesis Doctoral se agregó un cuarto objetivo:

Objetivo 4: Evaluar el papel del péptido en la implantación, la secreción uterina de óxido nítrico y la concentración plasmática de progesterona (P_4), estudiando en hembras inyectadas con Ghr y/o con el antagonista desde el día 3 al 7 de la gestación:

- a) la anátomo-patología uterina;
- b) la expresión de óxido nítrico sintasa (NOS) endotelial (eNOS) e inducible (iNOS) y
- c) la concentración plasmática de P_4 .

2. MATERIALES Y MÉTODOS:

2a. Animales de experimentación:

Se utilizaron ratones *Albino Swiss* (N:NIH) adultos (60 días) machos y hembras, mantenidos bajo ciclos controlados de luz:oscuridad (14:10) y condiciones climatizadas ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), con libre acceso al agua. A fin de evitar posibles modificaciones en la ingesta de alimentos y/o el peso corporal que pudieran alterar los parámetros reproductivos, las hembras inyectadas con Ghr (objetivos 2 y 3) contaron con una cantidad limitada de alimento balanceado (Grupo Pilar - Gepsa), calculada a partir de la ingesta de hembras controles en las mismas condiciones experimentales.

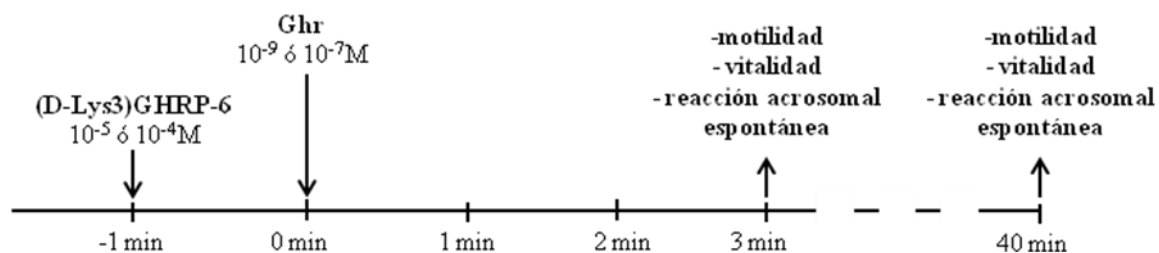
2b. Desarrollo de los objetivos:

2b₁. Explorar un posible efecto directo de Ghr sobre la actividad funcional de los espermatozoides, su activación para la fertilización y sobre la fertilización en sí misma (objetivo 1):

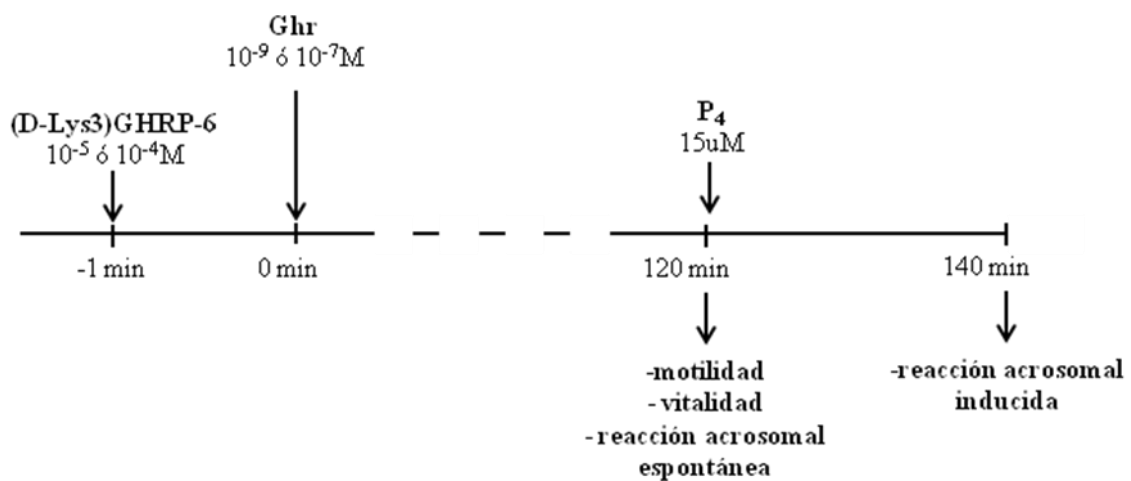
Se adicionó al medio de cultivo conteniendo las gametas, Ghr en concentraciones finales de 10^{-9} ó 10^{-7} M, con la adición previa o no de 10^{-5} ó 10^{-4} M de un antagonista del receptor de Ghr ((D-Lys₃)GHRP-6). Estas concentraciones han sido probadas en otros modelos *in vitro* (30, 54). Los grupos experimentales por lo tanto fueron seis: control (Tyrode solo); Ghr 10^{-9} M, Ghr 10^{-7} M, Ghr 10^{-9} M+antagonista, Ghr 10^{-7} M+antagonista y antagonista solo.

Se evaluó:

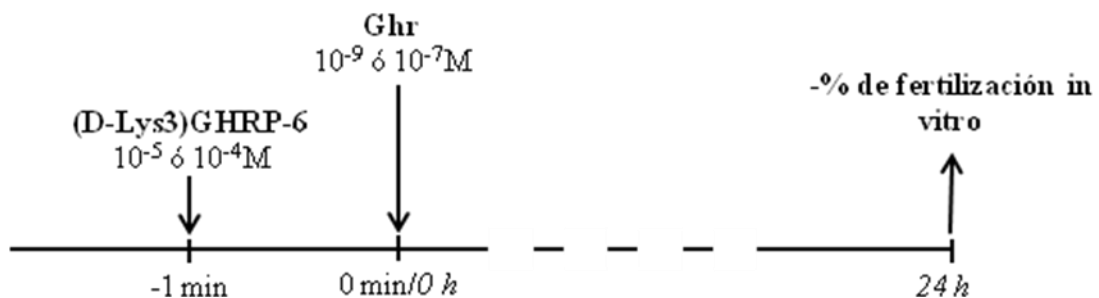
a) en un pool de espermatozoides epididimarios obtenidos de ratones sin tratamiento alguno: motilidad, vitalidad y estadío acrosomal (reacción acrosomal espontánea) a los 3 ó 40 min desde la adición de Ghr (ver más adelante punto 2c₁). Cabe aclarar que solo en este objetivo, inicialmente se utilizó una dosis del antagonista de 10^{-5} M y, posteriormente, la misma se aumentó a 10^{-4} M;



b) en un pool de espermatozoides epididimarios obtenidos de ratones sin tratamiento alguno (ajustada la concentración de los mismos a 1×10^6 espermatozoides/ml): motilidad, vitalidad y estado acrosomal a los 120 min de incubación en condiciones capacitantes desde la adición de Ghr (ver más adelante punto 2c₁). Una vez finalizado este período, se adicionó durante 20 min un inductor fisiológico de reacción acrosomal ($15 \mu\text{M}$ de P_4 , dosis previamente ensayada en nuestro laboratorio) y se evaluó el grado de inducción de la misma. Se acepta que la excitosis acrosomal en respuesta a P_4 es evidencia de que la gameta masculina está capacitada (74, 75);

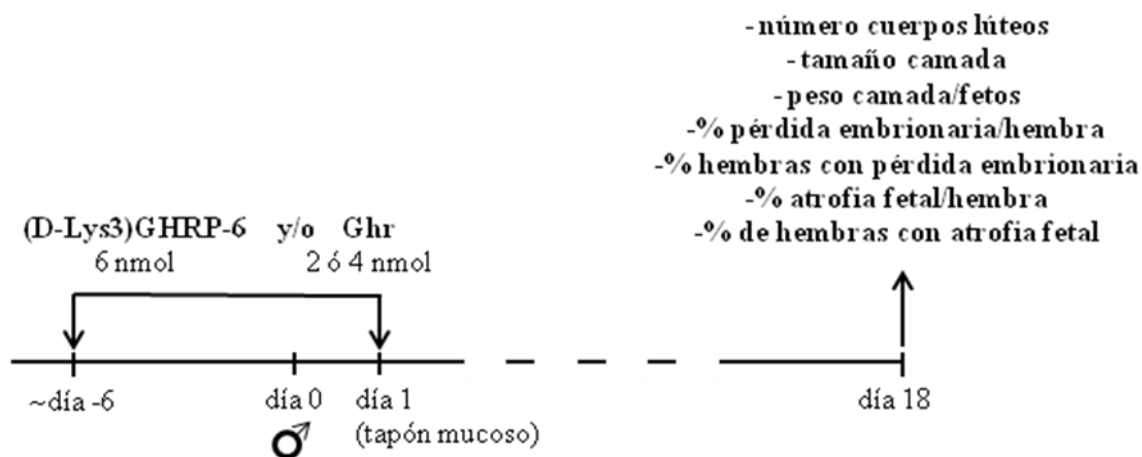


c) en cápsulas conteniendo espermatozoides epididimarios y ovocitos (con o sin cúmulus) provenientes de animales sin tratamiento: el porcentaje de ovocitos fertilizados (presencia de pronúcleos o de embriones de 2 células) a las 24 h de incubación (ver más adelante punto 2c₂). En los casos en que se adicionó el antagonista del receptor, el mismo fue agregado 1 min antes que Ghr.



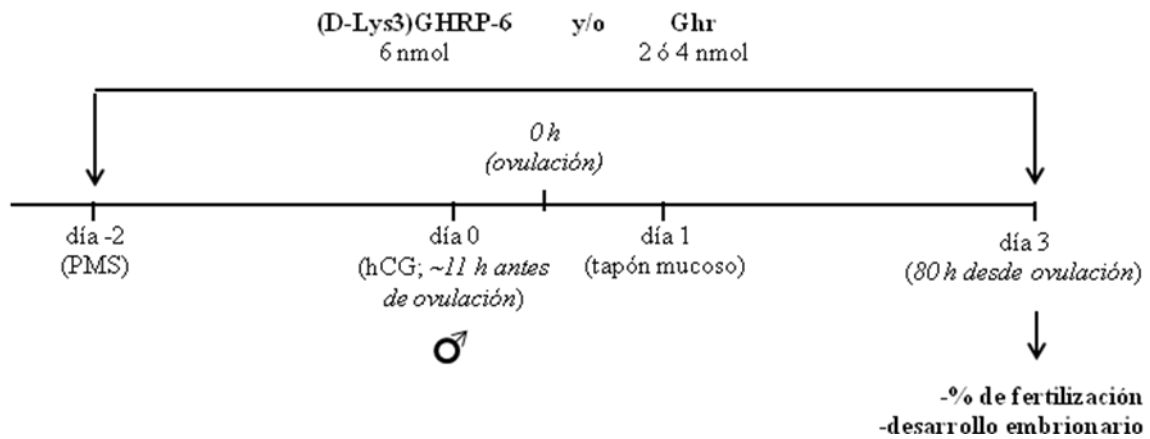
2b₂. Evaluar el papel del péptido en la fertilización *in vivo* (objetivo 2):

Se estudiaron los efectos de la inyección s.c. de Ghr (2 ó 4 nmol/animal/día) y/o de su antagonista ((D-Lys₃)GHRP-6, 6 nmol/animal/día) (ver más adelante punto 2c₃) durante 7 días previos a la cópula y hasta la confirmación de la misma (mediante la presencia del tapón mucoso o de espermatozoides en el extendido vaginal) sobre el número de cuerpos lúteos, el tamaño de la camada y el peso de la misma, sacrificando los animales a los 18 días de gestación (ver más adelante punto 2c₄). Asimismo, se cuantificaron los porcentajes de pérdida embrionaria y de atrofia fetal en cada hembra, así como los porcentajes de hembras por tratamiento que presentaban algún grado de pérdida embrionaria o atrofia fetal (ver más adelante punto 2c₄). Las hembras controles fueron inyectadas con solución isotónica de ClNa (0.9%).

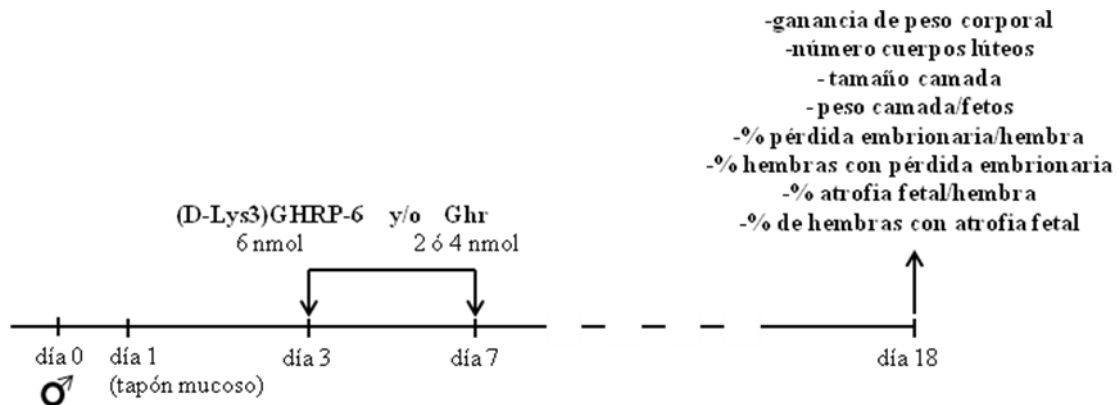
**2b₃. Determinar el papel del péptido en el desarrollo embrionario temprano y la implantación (objetivo 3):**

Para cumplimentar este objetivo, se evaluaron los efectos de la inyección s.c. de Ghr (2 ó 4 nmol/animal/día) y/o de su antagonista ((D-Lys₃)GHRP-6, 6 nmol/animal/día) (ver más adelante punto 2c₃) en diferentes períodos de la preñez sobre:

a) el porcentaje de fertilización *in vivo* y el desarrollo embrionario pre-implantatorio, inyectando a las hembras desde el comienzo de la inducción de ovulación (conjuntamente con la inyección de suero de yegua preñada –PMS-) hasta el 3° día de preñez (confirmado el apareamiento por la presencia del tapón mucoso o de espermatozoides en el extendido vaginal), sacrificándolas a las 80 h de la ovulación estimada (ver más adelante punto 2c₄).



b) la ganancia de peso corporal durante la gestación así como el tamaño y peso de la camada, inyectando a las hembras durante el período peri-implantatorio (desde el 3° al 7° día de preñez, confirmado el apareamiento por la presencia del tapón mucoso o de espermatozoides en el extendido vaginal) y sacrificándolas a los 18 días de gestación (ver más adelante punto 2c₄). Se cuantificaron además, los porcentajes de pérdida embrionaria y de atrofia fetal en cada hembra, así como los porcentajes de hembras por tratamiento que presentaban algún grado de pérdida embrionaria o atrofia fetal (ver más adelante punto 2c₄). Las hembras controles fueron inyectadas con solución isotónica de ClNa (0.9%).

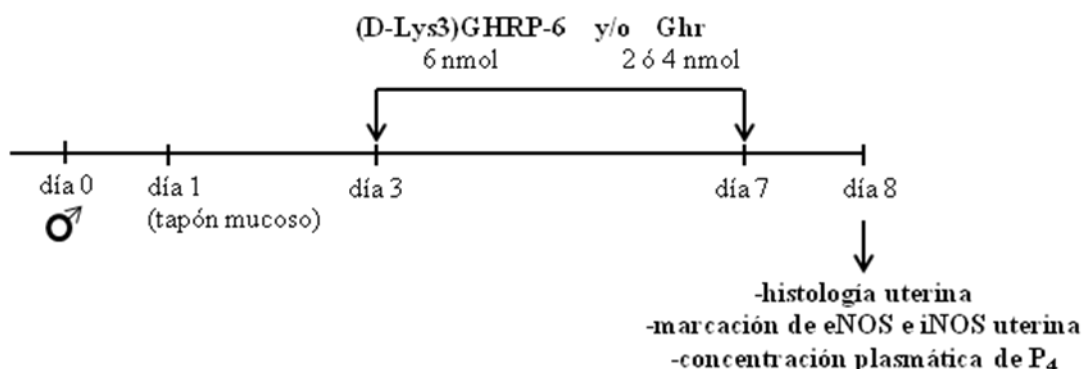


2b₄. Evaluar el papel del péptido en la implantación, la secreción uterina de óxido nítrico y la concentración plasmática de progesterona (P₄) (objetivo 4):

En base a los resultados obtenidos a partir del objetivo 3b (comentados en la sección correspondiente), nos propusimos evaluar si el tratamiento con Ghr y/o el antagonista durante el período peri-implantatorio modificaba la expresión de NOS. Para

ello, se alojaron machos con hembras sin tratamiento alguno hasta confirmar la cópula. El día de detección de tapón mucoso o espermatozoides en el extendido vaginal fue considerado como día 1 de gestación. A partir de allí las hembras fueron inyectadas, desde el día 3 al 7 de preñez, con Ghr (4 nmol/animal/día) y/o su antagonista ((D-Lys₃)GHRP-6, 6 nmol/animal/día); los controles fueron inyectados con el vehículo (solución isotónica de ClNa). En el día 8, las madres fueron sacrificadas, se obtuvieron sus úteros grávidos y se cuantificaron macroscópicamente el número de fetos normales y atrofiados. Posteriormente, los úteros fueron pesados y suspendidos en formol bufferado para su posterior análisis histológico (evaluación de sitios de implantación/resorción y área de implantación; ver más adelante punto 2c₅) y la realización de inmunohistoquímica para evaluar la expresión de NOS (ver más adelante punto 2c₆).

Asimismo, consideramos necesario realizar el dosaje plasmático de P₄. Para ello, estas hembras fueron sacrificadas por decapitación a fin de obtener sangre para el posterior dosaje de esta hormona esteroidea (ver más adelante punto 2c₇).



2c. Parámetros evaluados:

2c₁. **Obtención de los espermatozoides y parámetros espermáticos evaluados *in vitro*:**

Obtención de espermatozoides: los machos fueron sacrificados por dislocación cervical y mediante laparotomía amplia se separaron las porciones caudales de los epidídimos, los que se colocaron en una cápsula de Petri conteniendo medio de Tyrode (76) suplementado con albúmina (Sigma Chemical Co., Argentina; 4 mg/ml). Se realizaron varios cortes con tijera de microdissección para permitir la extrusión de los espermatozoides y las cápsulas se llevaron a estufa termostatzada a 37°C (95% aire: 5% CO₂ y humedad a saturación) durante 10 min y se procedió a la cuantificación de los parámetros reproductivos (77, 78).

Concentración y motilidad espermática: estos parámetros se cuantificaron simultáneamente en cámara de Makler (79). La concentración espermática se informó como millones de espermatozoides/ml. Para la evaluación de la motilidad, se contabilizaron al menos 100 células y los resultados se informan como porcentaje de espermatozoides móviles (progresivos + no progresivos).

Vitalidad espermática: se determinó mediante la tinción con Hoechst 33258 (H258, Sigma Chemical Co., Argentina), colorante fluorescente que se une al ADN de las células muertas. A la muestra en estudio se le añadió 1,5 µg/ml de H258 y se incubó durante 5 min en estufa termostaticada (80). Posteriormente se contabilizaron, en microscopio de epifluorescencia, no menos de 100 células entre teñidas (muertas) y no teñidas (vivas); los resultados se expresan como porcentaje de éstas últimas.

Reacción acrosomal: para evaluar este parámetro se utilizó la tinción de coomasie G blue 250 (Fluka Analítica, EE.UU.), de acuerdo a Larson y Miller (81); esta coloración distingue claramente los diferentes estados del acrosoma (intacto o reaccionado). Brevemente, los espermatozoides fueron fijados con un volumen de paraformaldehído al 8% en solución buffer fosfato (PBS; concentración final 4%) durante 1 h, a 4°C. Posteriormente, se centrifugó 3 veces con acetato de amonio (0,1 M; pH 9) durante 7 min a 400g. Luego se realizaron extendidos de cada muestra de espermatozoides en un portaobjetos y se tiñeron las células durante 5 min con 0,2% de coomasie G blue en una solución de 10% de ácido acético, 50% de metanol y 39,8% de agua destilada; luego se lavó con agua destilada. Finalmente, las muestras se dejaron secar y se montaron con 90% de glicerol en PBS. El estado acrosomal fue evaluado bajo microscopio óptico a 40x, identificándose dos patrones: acrosoma azul oscuro y azul claro; intacto y reaccionado respectivamente. Se consideraron no menos de 100 espermatozoides por muestra y se informan como porcentaje de los últimos. Asimismo, en los experimentos en los que se indujo la reacción acrosomal con P₄ (objetivo 1b), los resultados se presentan como porcentaje de aumento en este parámetro con respecto a la reacción acrosomal espontánea.

2c₂. Obtención de los ovocitos y parámetros ovocitarios evaluados *in vitro*:

Obtención de ovocitos: hembras estimuladas farmacológicamente a superovular (mediante la administración de 5UI de PMS (Sigma Chemical Co., Argentina) y 48 h después de 10 UI de gonadotropina coriónica humana (-hCG- Sigma Chemical Co., Argentina)) fueron sacrificadas 13-14 h después de la última inyección por dislocación cervical. Mediante

laparotomía amplia se procedió a la extracción de los oviductos, que fueron colocados en una cápsula con medio de Tyrode. Bajo lupa estereoscópica se visualizó la ampolla oviductal y mediante punción de la misma se procedió a la obtención de los complejos cúmulus-ovocito. Los mismos fueron suspendidos en otra cápsula con medio de Tyrode y llevados a incubadora termostatzada a 37°C hasta el momento de su utilización.

Porcentaje de fertilización *in vitro*: esta técnica se realizó de acuerdo a Yelian y Dukelow (82). Los ovocitos (con o sin células del cúmulus) obtenidos a partir de la ampolla oviductal luego de la inducción a superovulación, fueron colocados en medio de Tyrode suplementado con albúmina (~20/cápsula) e inseminados con 8-10 x 10⁵ espermatozoides/ml obtenidos de un pool de machos sin tratamiento alguno. En los casos que correspondiera, para la remoción de las células del cúmulus, los ovocitos se colocaron previamente en una gota de 0,1% de hialuronidasa en buffer fosfato salino Dulbecco (DPBS; Sigma Chemical Co., Argentina; en estufa durante 5 minutos) y luego se pasaron por tres gotas de medio limpio.

El porcentaje de fertilización *in vitro* y el clivaje embrionario se determinó 24 h después de la inseminación, por visualización directa en microscopio invertido y los resultados se expresan como porcentaje de ovocitos fertilizados (presencia de pronúcleos o embriones de 2 células). Asimismo, los resultados también se informan en relación al grupo control (como porcentaje de variación en la fertilización con respecto al control).

Porcentaje de partenogénesis: para la evaluación de este parámetro, los ovocitos fueron obtenidos y tratados de acuerdo con el punto anterior, aunque no fueron inseminados. El porcentaje de partenogénesis se determinó 24 h más tarde, por visualización directa en microscopio invertido y los resultados se expresan como porcentaje de ovocitos activados espontáneamente (partenogénicos) (presencia de pronúcleos o de 2 o más células) (83).

2c₃. Determinación de las dosis de Ghr y antagonista a administrar *in vivo*:

A fin de establecer las dosis de Ghr a administrar a nuestros animales, ratones machos adultos agrupados homogéneamente según su peso corporal, fueron inyectados con Ghr en cuatro dosis diferentes (0,5; 1; 2 ó 3 nmol/animal; Innovagen, Suecia) y 30 min después se los sacrificó por decapitación a fin de obtener muestras de sangre y plasma sanguíneo. Se determinaron los niveles de GH mediante un kit de enzimoimmunoensayo (EIA) para GH de rata/ratón (EZRMGH-45K de Millipore, Estados Unidos; sensibilidad: 0,07 ng/ml). Se eligió como dosis de inyección para los experimentos *in vivo*, la menor entre las que provocaron una estimulación estadísticamente significativa de la liberación de

GH, es decir, 2 nmol; posteriormente y en base a los resultados detectados, se ensayó una dosis mayor (4 nmol). Los coeficientes de variación intra- e interensayo fueron <10%.

La dosis del antagonista, (D-Lys₃)GHRP-6 (Sigma Chemical Co., Argentina), fue determinada en estudios previos en los que comprobamos que la misma es capaz de revertir los efectos biológicos provocados por la hiperghrelinemia, ya sea producto de la restricción alimentaria o de la administración exógena de Ghr. Esto valida a este antagonista, en nuestro modelo animal, como un inhibidor competitivo de Ghr (37). Cabe remarcar sin embargo, que ya que estas evidencias han sido obtenidas a partir de estudios funcionales, no conocemos el grado de inhibición competitiva que esta dosis de (D-Lys₃)GHRP-6 provoca a nivel tisular.

Las vías y protocolos de administración de estas sustancias han sido utilizadas previamente no solo en nuestro laboratorio, sino también por otros autores (36, 37, 39, 84, 85).

2c₄. Parámetros de éxito reproductivo evaluados (*in vivo*) en las hembras:

Apareamiento tras ciclos espontáneos o inducción de superovulación: para los experimentos del objetivo 2 y 3b, a hembras en ciclo sexual natural se las alojó con un macho sin tratamiento alguno y en forma diaria se realizaron extendidos vaginales hasta confirmar la cópula, es decir, la presencia del tapón mucoso o de espermatozoides en el extendido. En los experimentos correspondientes al objetivo 2, si bien no todas las hembras aceptaron al macho el día siguiente a su introducción en la jaula, sólo se consideraron aquellas que presentaron tapón mucoso entre 1 y 3 días después (es decir, entre 7 y 10 días de aplicación del tratamiento con Ghr y/o el antagonista).

Para los experimentos del objetivo 3a, a hembras inducidas a superovular (tal como se detalla en el punto 2c₂) se las alojó con un macho sin tratamiento alguno y, a la mañana del día siguiente, se confirmó la cópula mediante la presencia del tapón mucoso o de espermatozoides en el extendido vaginal. En protocolos de este tipo se estima que la ovulación ocurre alrededor de 10-12 h posteriores a la administración del hCG.

Ganancia de peso corporal durante la gestación: luego del apareamiento, a las hembras del objetivo 3b se las pesó en los días 1, 7, 14 y 18 de preñez, a fin de valorar la ganancia de peso durante la gestación, calculada mediante la diferencia entre el peso corporal final de cada semana de gestación y el inicial (día 1 de preñez). Asimismo, una vez sacrificadas las

hembras al día 18, se cuantificó el “peso de la madre sin sus fetos”, es decir, habiendo extraído del útero de las mismas los fetos.

Tamaño y peso de la camada: las hembras fueron sacrificadas a los 18 días de la cópula comprobada. Se obtuvieron sus úteros grávidos y, por visualización directa, se contabilizó el número total de fetos (tanto los viables como los atrofiados). Éstos fueron extraídos del útero, liberados de la placenta y del saco vitelino y pesados. Sólo los fetos viables (es decir, de tamaño acorde a su edad gestacional) fueron considerados para la valoración de este último parámetro.

Porcentaje de pérdida embrionaria y de atrofia fetal: las hembras fueron sacrificadas a los 18 días de la cópula comprobada. A fin de calcular la pérdida embrionaria, se tuvo en cuenta la relación entre el número total de fetos y de cuerpos lúteos (indicador de la tasa de ovulación) de acuerdo a la siguiente fórmula=100 - (tamaño de camada x 100/ número de cuerpos lúteos); este parámetro se calculó en cada una de las hembras evaluadas. Asimismo, se consideró el porcentaje de hembras de cada tratamiento que tenía algún grado de pérdida embrionaria, independiente de cual fuera el mismo. Cabe aclarar que esta variable es de tipo estimativa, ya que no podemos establecer en cuál de los procesos reproductivos ocurrió la alteración, producto de la cual se observan menos fetos que cuerpos lúteos.

Otro parámetro calculado en este estudio es el porcentaje de atrofia fetal. Consideramos que un feto está atrofiado cuando, a los 18 días de gestación, presenta un tamaño marcadamente inferior al esperado por su edad gestacional (Figura 3). En cada hembra se calculó por lo tanto, la proporción de fetos atrofiados con respecto al total (porcentaje de fetos atrofiados); se cuantificó también, el porcentaje de hembras de cada tratamiento que presentaban algún grado de atrofia fetal (1 o más fetos atrofiados).

Asimismo, estos dos parámetros se presentaron en relación al valor control, como porcentaje de aumento con respecto al control.

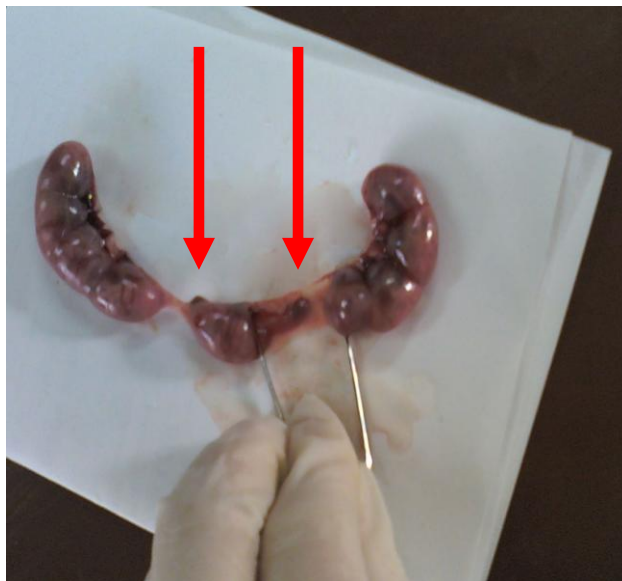


Figura 3: Fetos atrofiados (marcados con flechas) en comparación a los de tamaño normal, en úteros de hembras sacrificadas al día 18 de preñez.

Porcentaje de fertilización in vivo y desarrollo embrionario pre-implantatorio: tras la inducción a superovular y el apareamiento con machos sin tratamiento, las hembras fueron sacrificadas a las 80 h posteriores a la ovulación estimada. Se les extrajeron oviductos y útero, los que fueron suspendidos en medio de Tyrode y lavados por separado (“flushing”) con el medio de incubación, a fin de obtener los embriones. Bajo microscopio invertido, se determinó su número, localización (útero u oviducto) y su grado de desarrollo, determinando dos estadios (desarrollo hasta mórula -embriones de 2 o más células o mórulas- y blastocitos). En aquellos casos en que se obtuvieron ovocitos en lugar de embriones, se consideraron gametas “no fertilizadas”, a fin de calcular el porcentaje de fertilización (cantidad de embriones x 100/ cantidad de embriones+ovocitos). Tal como se realizó para otras variables, el mismo fue expresado también en relación al grupo control.

2c5. Evaluación histológica de los cuernos uterinos:

Procesamiento histológico de los úteros: los cuernos uterinos obtenidos de los ratones al día 8 de preñez se fijaron en fijador bufferado neutro (Biopur, Argentina) por 24 h. Luego se deshidrataron en una serie graduada de etanol (15 min cada paso) de 50°, 70°, 96°, 100° hasta llegar a xilol. Posteriormente, fueron incluidos en parafina y se realizaron cortes seriados en 3 niveles.

Evaluación anátomo-patológica de los úteros: algunos cortes se desparafinaron e hidrataron usando xilol y una serie graduada de etanol hasta PBS y fueron teñidos con Hematoxilina/Eosina (H/E).

Bajo microscopio óptico, se contabilizaron los embriones y los puntos indicativos de implantaciones y/o reabsorción (tempranas o tardías) a todo lo largo de cada útero. Se midió además, mediante el programa Axiovision, el porcentaje del área uterina ocupado por el área de implantación; los resultados se expresan en μm^2 .

Técnica de PAS: debido a la gran cantidad de vacuolas presentes en los cortes histológicos de algunos grupos, se realizó la tinción con ácido peryódico al 1% durante 20 minutos (86). Los cortes se lavaron luego con agua corriente durante 20 minutos y fueron sumergidos en reactivo de Schiff (PAS) por otros 20 min. Luego se procedió a su lavado en agua corriente por 10 min y por último se efectuó la contratinción con Hematoxilina activada (Biopur, Argentina) durante 1 minuto y su viraje en agua corriente. Finalmente se procedió a la deshidratación, aclaración y montaje en xileno de dibutilftalato de poliestireno (Sigma Chemical Co., Argentina).

2c6. Inmunohistoquímica para eNOS e iNOS:

Los cortes de los cuernos uterinos de 5 μm de espesor se desparafinaron en xilol y rehidrataron en una serie de alcoholes de concentración decreciente hasta H_2O destilada. Posteriormente se efectuó el desenmascaramiento antigénico en olla a presión con buffer citrato a pH 6 (Vector Antigen Unmasking Solucion Low pH) durante 1 minuto. Se bloqueó el peróxido endógeno con H_2O_2 (3%) por 30 min y se bloqueó con suero fetal bovino (SFB) al 20% en PBS. Luego se incubó durante toda la noche con los anticuerpos primarios (Abcam eNOS -ab66127- y anti iNOS -H-174-), obtenidos contra el epítipo de una secuencia amino terminal en conejo (Santa Cruz Biotechnology, Inc). Posteriormente, en ambos casos se incubó con el anticuerpo secundario IgG unido a Biotina Multilink por 1 h a 37°C. Finalmente, los cortes se revelaron con el sistema de detección Kit ABC Vectastin Pk 6101. Los núcleos se contrastaron con Hematoxilina. Los controles de técnica se realizaron reemplazando el anticuerpo primario con SFB. Se realizó una semi-cuantificación de la expresión de ambas enzimas comparando los distintos grupos experimentales, sobre fotos digitalizadas de cada centro de implantación (a un aumento de 40x). Para ello se aplicó un sistema de signos “+” que define la intensidad de marcación: +=escasa marcación, ++=intensidad media de marcación y +++=marcación intensa.

2c7. Dosaje plasmático de P₄:

Las hembras tratadas fueron sacrificadas por decapitación a fin de recolectar sangre. La misma fue heparinizada, centrifugada para obtener el plasma y el mismo conservado a -20°C hasta el momento de su procesamiento. Los niveles de P₄ plasmática se determinaron mediante EIA, utilizando un anticuerpo policlonal y sus correspondientes conjugados de peroxidasa para la detección de P₄ (progesterone R4859, Department of Population Health and Reproduction, Coralie Munro, UC Davis, CA, USA) (87). Las lecturas se realizaron en lector de microplacas (Thermo Electron Corporation, USA) a 405 nm. La sensibilidad del ensayo fue de 0,018 ng/ml. Los coeficientes de variación intra- e interensayo fueron <10%.

2d. Tratamiento estadístico de los resultados:

Los resultados de las variables cuantitativas expresadas como Media±EEM (error estándar de la media) fueron analizados mediante ANOVA secuencial (orden de los factores: Ghr y antagonista). Previamente se controló el cumplimiento de los supuestos necesarios (o se procedió a la transformación de las variables) para la aplicación de la prueba paramétrica y, en último término, se aplicó un test no paramétrico (Kruskall-Wallis). Los resultados de las variables cualitativas expresados como porcentaje (porcentaje de fertilización *in vitro*, porcentaje de hembras que perdieron embriones, porcentaje de hembras con embriones atrofiados, etc), se evaluaron por el test de Chi-cuadrado o, Chi-cuadrado exacto de Fisher en el caso en que no se cumplieran los supuestos esperados. En todos los casos, se consideraron diferencias significativas a aquellas en las cuales el valor de *p* fue menor a 0,050.

3. RESULTADOS:

3a. EXPERIMENTOS IN VITRO

Objetivo 1: Efectos de Ghr sobre la actividad funcional de los espermatozoides, su activación para la fertilización y sobre la fertilización en sí misma:

Objetivo 1a: con el objeto de determinar los efectos de la adición *in vitro* de diferentes concentraciones de Ghr (10^{-7} y 10^{-9} M) con la adición previa o no del antagonista ((D-Lys₃)GHRP-6, 10^{-5} M) sobre la actividad funcional espermática, se evaluó en espermatozoides epididimarios de ratón, la motilidad, vitalidad y reacción acrosomal espontánea a los 3 y 40 min de incubación.

En la Figura 4, se presentan los porcentajes de espermatozoides móviles (progresivos + no progresivos) en los dos períodos de incubación mencionados. Como puede observarse y bajo nuestras condiciones experimentales, Ghr (con o sin su antagonista) disminuyó significativamente este parámetro a los 3 min de incubación; este fenómeno no se observó a los 40 min. Cabe destacar que el antagonista, en la concentración utilizada en este experimento, no fue capaz de revertir los efectos deletéreos de Ghr.

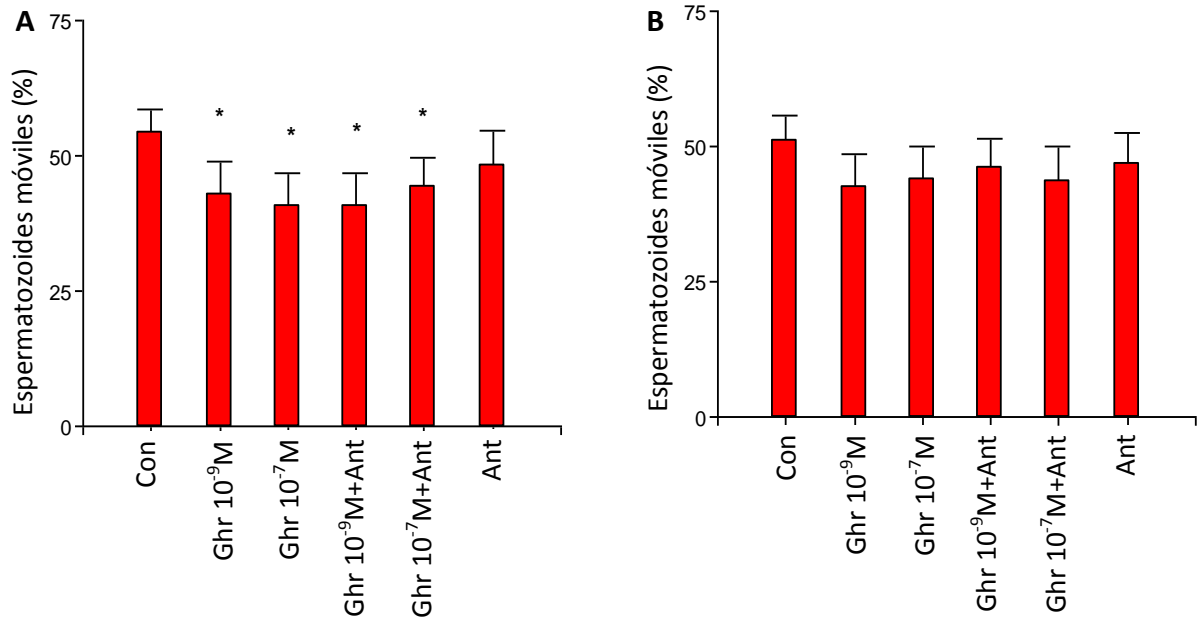


Figura 4: Motilidad de espermatozoides epididimarios de ratón incubados en medio de Tyrode suplementado con albúmina durante 3 y 40 min (panel A y B respectivamente), con concentraciones crecientes de ghrelina (Ghr) o sin ella (control=Con), con la adición o no de un antagonista (Ant: (D-Lys₃)GHRP-6, 10⁻⁵M). Espermatozoides móviles: sumatoria de espermatozoides progresivos y no progresivos. Los valores se expresan como TM±EEM. Número de experimentos=8 en cada tratamiento. *: $p=0,003$ vs Con.

Con respecto a la vitalidad espermática, ninguno de los tratamientos o períodos de incubación aplicados afectaron significativamente este parámetro (Figura 5).

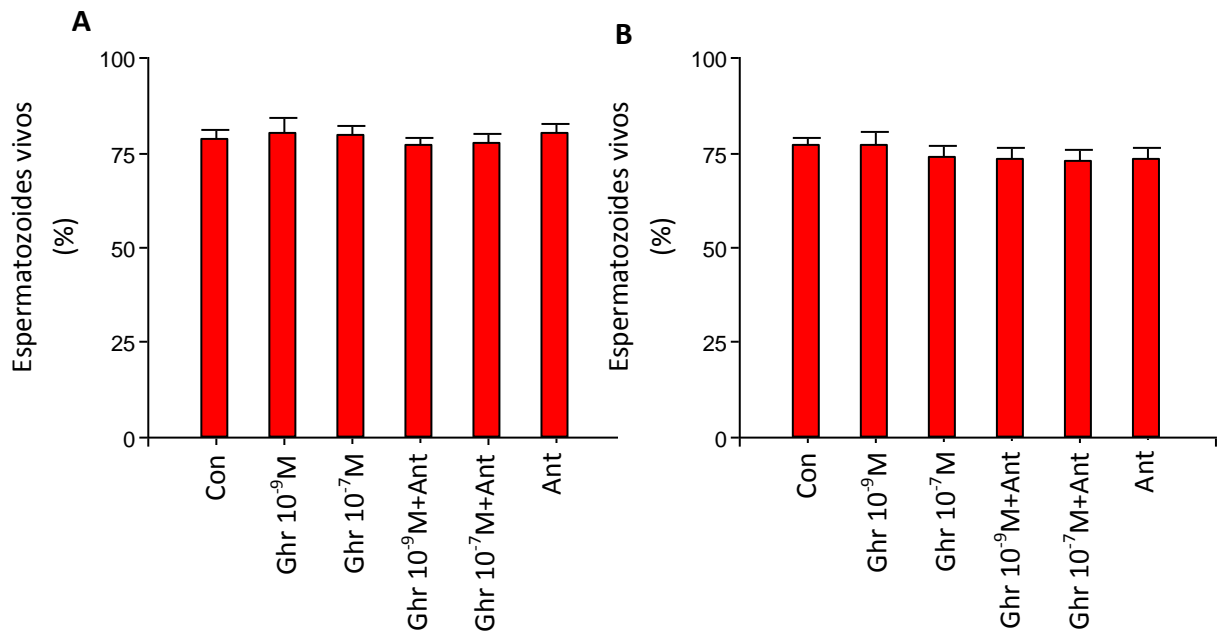


Figura 5: Vitalidad de espermatozoides epididimarios de ratón incubados en medio de Tyrode suplementado con albúmina durante 3 y 40 min (panel A y B respectivamente), con concentraciones crecientes de ghrelina (Ghr) o sin ella (control=Con), con la adición o no de un antagonista (Ant: (D-Lys₃)GHRP-6, 10^{-5} M). Los valores se expresan como $TM \pm EEM$. Número de experimentos=8 en cada tratamiento.

En cuanto a los índices de reacción acrosomal espontánea, el tratamiento con la menor dosis de Ghr (10^{-9} M), con o sin su antagonista, aumentó significativamente el porcentaje de espermatozoides reaccionados con respecto al control a los 3 min de incubación. No se observaron estas diferencias a los 40 min (Figura 6).

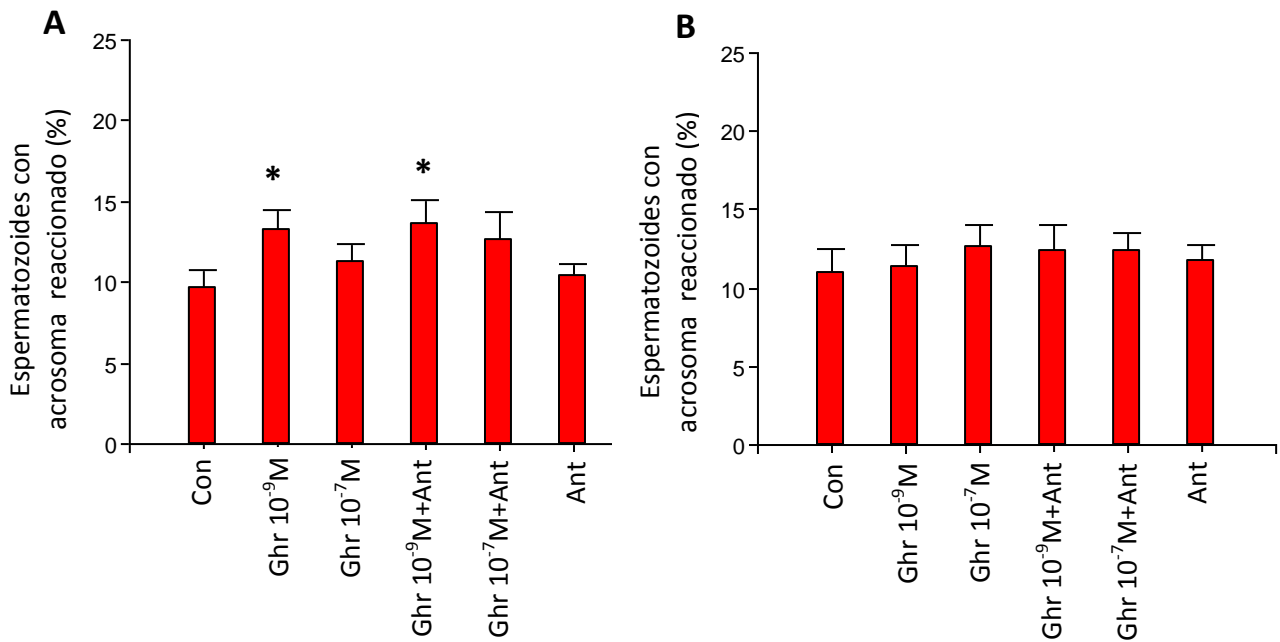


Figura 6: Porcentaje de espermatozoides epididimarios de ratón que presentaron reacción acrosomal espontánea. Se incubaron en medio de Tyrode suplementado con albúmina durante 3 y 40 min (panel A y B respectivamente), con concentraciones crecientes de ghrelina (Ghr) o sin ella (control=Con), con la adición o no de un antagonista (Ant: (D-Lys₃)GHRP-6, 10^{-5} M). Los valores se expresan como $TM \pm EEM$. Número de experimentos=8 en cada tratamiento. *: $p=0,033$ vs Con.

Dado que la concentración del antagonista (10^{-5} M) empleada en estos experimentos no logró revertir los efectos deletéreos del péptido (en los parámetros motilidad y reacción acrosomal), se realizaron nuevos ensayos de calidad espermática utilizando una dosis mayor (10^{-4} M). Esta nueva dosis logró antagonizar los efectos negativos de Ghr. Es necesario aclarar que dichos experimentos solo se efectuaron con la menor dosis de Ghr (10^{-9} M), ya que fue ésta la que presentó diferencias en ambos parámetros. Los resultados obtenidos se presentan en las Figuras 7, 8 y 9.

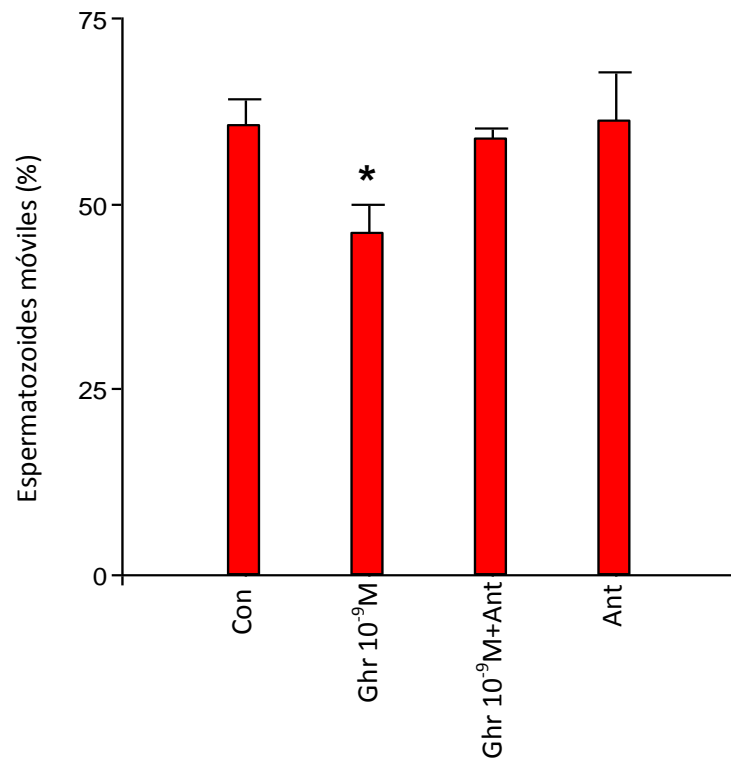


Figura 7: Motilidad de espermatozoides epididimarios de ratón incubados en medio de Tyrode suplementado con albúmina durante 3 min, con ghrelina 10^{-9} M (Ghr) o sin ella (control=Con), con la adición o no de un antagonista (Ant: (D-Lys₃)GHRP-6, 10^{-4} M). Espermatozoides móviles: sumatoria de espermatozoides progresivos y no progresivos. Los valores se expresan como $TM \pm EEM$. Número de experimentos=4 en cada tratamiento. *: $p=0,040$ vs el resto de los grupos.

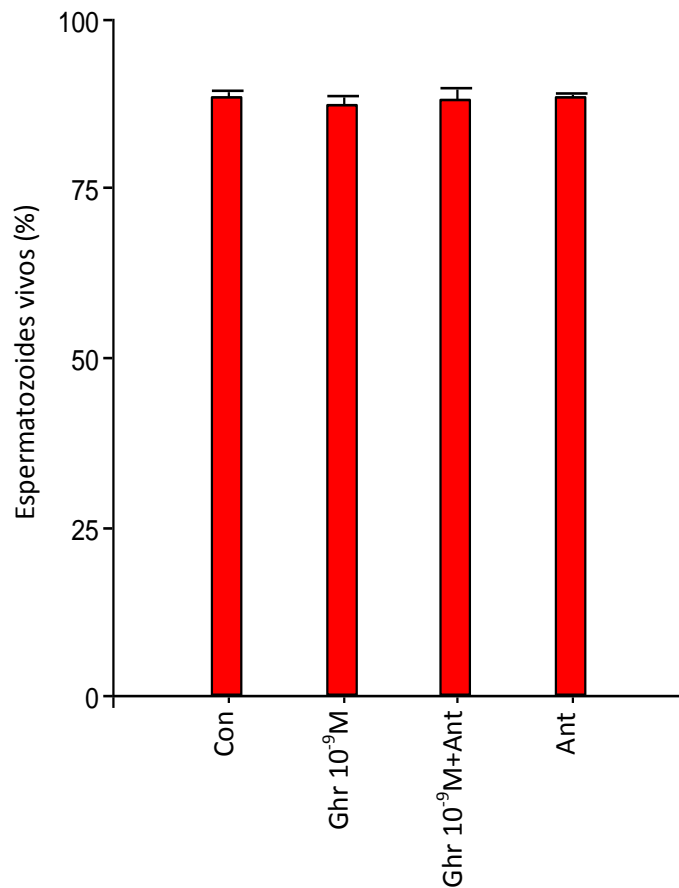


Figura 8: Vitalidad de espermatozoides epididimarios de ratón incubados en medio de Tyrode suplementado con albúmina durante 3 min, con ghrelina 10⁻⁹ M (Ghr) o sin ella (control=Con), con la adición o no de un antagonista (Ant: (D-Lys₃)GHRP-6, 10⁻⁴M). Los valores se expresan como TM±EEM. Número de experimentos=4 en cada tratamiento.

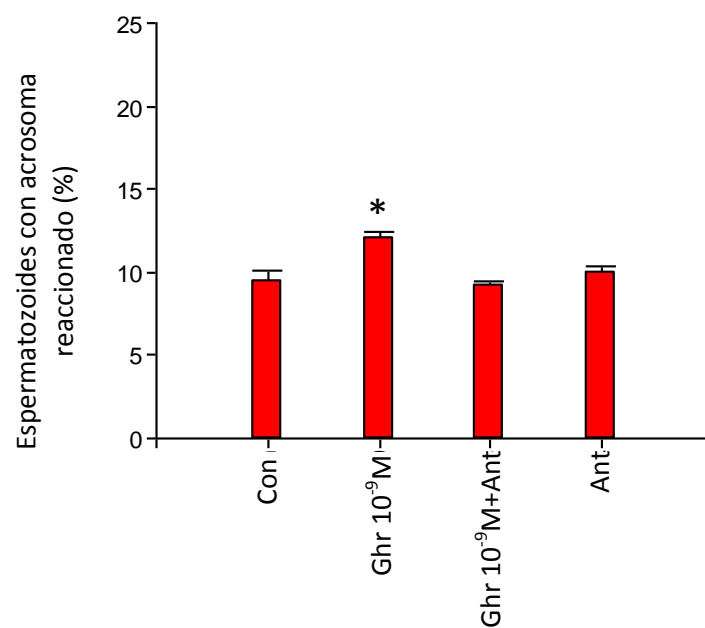


Figura 9: Porcentaje de espermatozoides epididimarios de ratón que presentaron reacción acrosomal espontánea. Se incubaron en medio de Tyrode suplementado con albúmina

durante 3 min, con ghrelina 10^{-9} M (Ghr) o sin ella (control=Con), con la adición o no de un antagonista (Ant: (D-Lys₃)GHRP-6, 10^{-4} M). Los valores se expresan como $TM \pm EEM$. Número de experimentos=4 en cada tratamiento. *: $p=0,008$ vs el resto de los grupos.

Esta nueva concentración del antagonista (10^{-4} M), fue por lo tanto la que se utilizó para los experimentos de incubación de espermatozoides durante 120 min y los de fertilización *in vitro*; resultados que se presentan a continuación.

Objetivo 1b: con el propósito de determinar los efectos de la adición *in vitro* de diferentes concentraciones de Ghr (10^{-7} y 10^{-9} M) y/o el antagonista ((D-Lys₃)GHRP-6, 10^{-4} M) sobre la calidad espermática y la capacitación, se evaluó, en espermatozoides epididimarios de ratón, la motilidad, vitalidad y reacción acrosomal espontánea e inducida por progesterona, luego de 120 min de incubación (Tabla 1).

Tabla 1: Efecto de ghrelina y/o su antagonista sobre la calidad espermática y la reacción acrosomal inducida a los 120 min de incubación:

Parámetros	Control	Ghr 10^{-9} M	Ghr 10^{-7} M	Ghr 10^{-9} M+Ant	Ghr 10^{-7} M+Ant	Antagonista
Espermatozoides móviles (%)	28,0±3,8	18,9±4,1	28,8±5,4	28,7±6,2	25,0±4,6	33,7±5,8
Espermatozoides vivos (%)	76,7±3,7	76,3±3,1	73,5±3,7	77,5±3,4	77,0±3,5	74,6±3,9
Espermatozoides reaccionados espontáneamente (%)	12,0±1,1	13,0±1,2	13,3±1,4	12,3±0,8	14,5±0,9	13,8±0,8
Aumento de la RA tras inducción con P ₄ (%)	45,9±2,6	44,1±5,5	43,9±5,0	42,1±2,3	34,4±4,6	37,1±4,4
	*	*	*	*	*	*

Calidad espermática de espermatozoides epididimarios de ratón incubados en medio de Tyrode suplementado con albúmina durante 120 min con ghrelina (Ghr) 10^{-9} M o 10^{-7} M o sin ella (control), con la adición o no de un antagonista (Ant: (D-Lys₃)GHRP-6, 10^{-4} M).

Móviles: sumatoria de espermatozoides progresivos y no progresivos. Aumento de la RA (reacción acrosomal) tras inducción con progesterona (P_4): % de aumento de espermatozoides reaccionados luego de 20 min de incubación en presencia de 15 μ g de progesterona; la misma se adicionó luego de 120 min de incubación. Los valores se expresan como $TM \pm EEM$. Número de experimentos=6 en cada tratamiento. *: $p < 0,050$ vs RA espontánea.

Como puede observarse en la Tabla, ninguno de los tratamientos aplicados modificó la motilidad, la vitalidad, ni la reacción acrosomal (espontánea o inducida) luego de 120 min de incubación. Tal como era de esperar, progesterona indujo un aumento significativo de la reacción acrosomal, en todos los casos.

Objetivo 1c: con el propósito de elucidar los efectos de Ghr (10^{-9} o 10^{-7} M) y/o su antagonista sobre la fertilización, se evaluó en ovocitos de ratón (con o sin células del cúmulus) el porcentaje de fertilización *in vitro*, adicionando al medio de cultivo el péptido y/o su antagonista ((D-Lys₃)GHRP-6, 10^{-4} M).

Como puede apreciarse en la Figura 10, bajo nuestras condiciones experimentales ninguno de los tratamientos empleados modificó el porcentaje de fertilización con respecto al control. Tampoco se observaron diferencias en este parámetro cuando a los ovocitos se les removió el cúmulus.

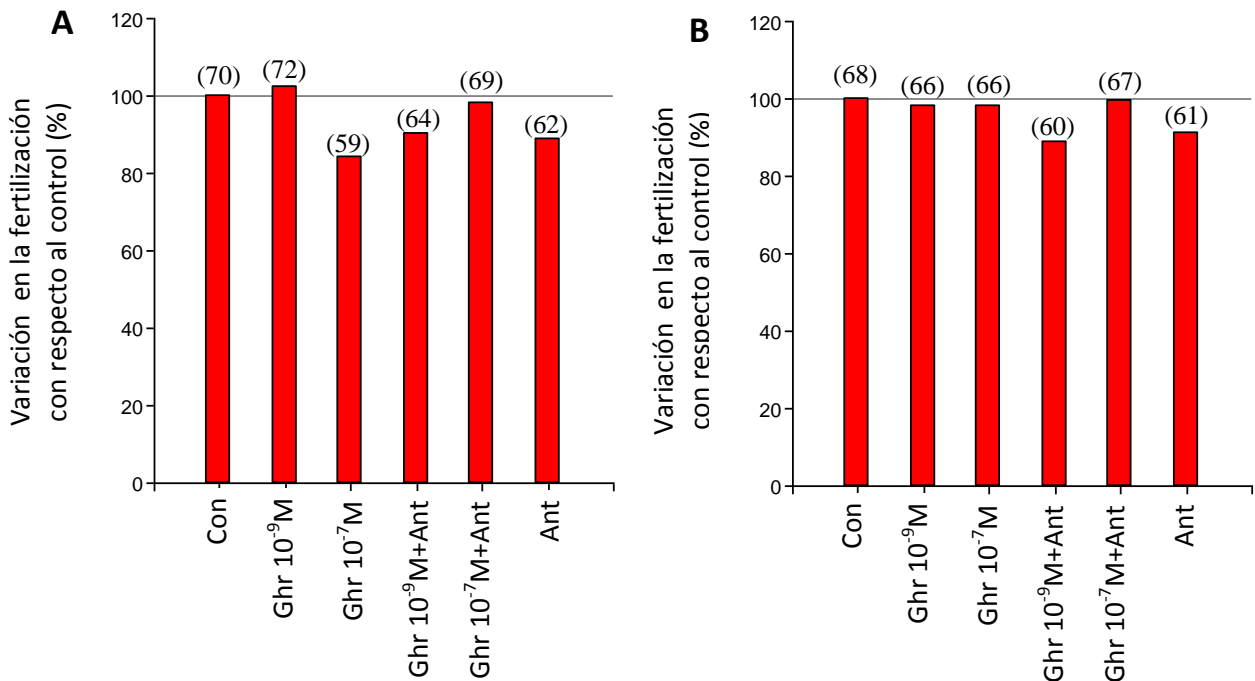


Figura 10: Porcentaje de variación en la fertilización *in vitro* con respecto al control de ovocitos de ratón (con o sin cúmulus, panel A y B respectivamente) incubados durante 24 h en medio de Tyrode suplementado con albúmina. Tanto los espermatozoides (epididimarios) como los ovocitos se co-incubaron con ghrelina (Ghr) 10^{-9} M o 10^{-7} M o sin ella (control=Con), con la adición o no de un antagonista (Ant: (D-Lys₃)GHRP-6, 10^{-4} M) durante todo el período de incubación. El porcentaje de variación se calculó tomando el valor de la fertilización control como el 100%; los valores entre paréntesis indican el porcentaje de fertilización absoluto. Número de ovocitos/embriones en cada tratamiento; con cúmulus: Con=102, Ghr⁻⁹M=76, Ghr⁻⁷M=94, Ghr⁻⁹+Ant=83, Ghr⁻⁷+Ant=91 y Ant=91; sin cúmulus: Con=102, Ghr⁻⁹M=104, Ghr⁻⁷M=80, Ghr⁻⁹+Ant=95, Ghr⁻⁷+Ant=83 y Ant=91.

Es importante remarcar que, cuando se analizó el porcentaje de partenogénesis de ovocitos tratados bajo estas condiciones experimentales, no se registraron modificaciones vinculadas a los tratamientos (porcentaje de partenogénesis en ovocitos con cúmulus: control=15,4; Ghr 10^{-9} M=22,2 y antagonista=15,2. Porcentaje de partenogénesis en ovocitos sin cúmulus: control=10,6; Ghr 10^{-9} M=15,1 y antagonista=14,6; $p > 0,050$; $n = 46-63/\text{tratamiento}$). Estos valores además, coinciden con los detectados previamente en nuestro laboratorio.

3b. EXPERIMENTOS IN VIVO

Para poder llevar a cabo los objetivos *in vivo* planteados en este proyecto, debíamos determinar primero la dosis de Ghr a inyectar en nuestros animales. Para ello, realizamos una curva dosis-respuesta de Ghr-GH. Los resultados obtenidos se ilustran en la Figura 11.

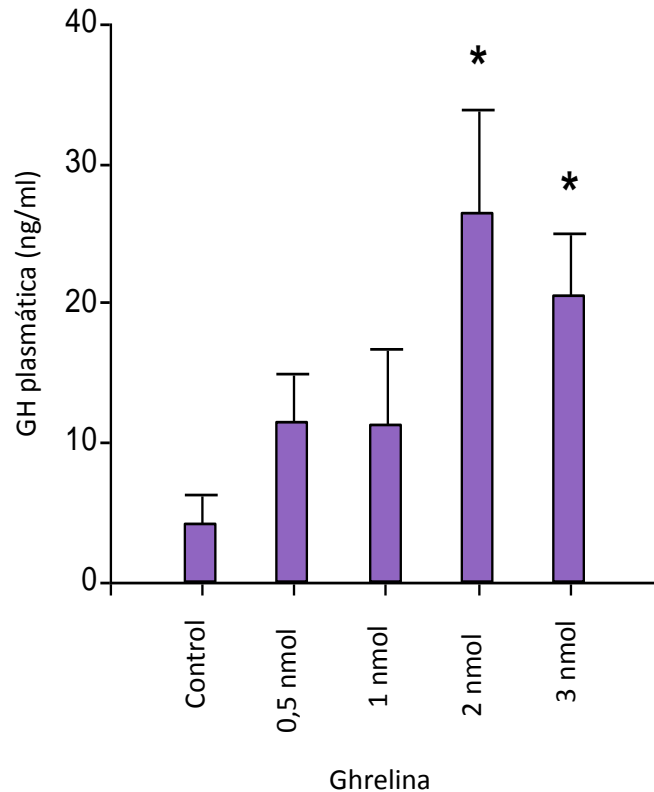


Figura 11: Concentración plasmática de hormona del crecimiento (GH) evaluada 30 min después de la administración de diferentes dosis de ghrelina (0,5 nmol n=8; 1 nmol n=7; 2 nmol n=9 y 3 nmol n=9) a ratones machos adultos. Los controles (n=10) fueron inyectados con el vehículo únicamente (0,1 ml de solución isotónica de ClNa). *: $p < 0,050$ vs Control.

Del análisis de la figura, surge claramente que a partir de la dosis de 2 nmol de Ghr/animal detectamos un incremento significativo en la secreción de GH. En base a estos resultados, se seleccionó la dosis de 2 nmol/animal/día para los realización de los experimentos y luego de obtenidos los primeros resultados, una segunda dosis de 4 nmol/animal/día.

Objetivo 2: Papel de Ghr en la fertilización *in vivo*:

En hembras inyectadas con el péptido y/o con el antagonista durante una semana previa a la cópula y hasta la confirmación de la misma, se investigaron los efectos de estos

tratamientos sobre el éxito reproductivo: la tasa de ovulación (evaluada como número de cuerpos lúteos), tamaño y peso de la camada y la ocurrencia de pérdida embrionaria o atrofia fetal sacrificando a las hembras a los 18 días poscópula.

Bajo estas condiciones experimentales, ninguno de los tratamientos empleados modificó el tamaño de la camada, el peso de las crías o el número de cuerpos lúteos (Tabla 2). De hecho, los valores detectados para estos parámetros coinciden con los encontrados previamente por nuestro equipo en otras líneas experimentales (88).

Tabla 2: Efectos de la inyección de diferentes dosis de ghrelina, con o sin su antagonista, desde una semana previa a la cópula y hasta la confirmación de la misma, sobre el éxito reproductivo.

Parámetros	Control (n=9)	Ghr 2 nmol (n=9)	Ghr 4 nmol (n=11)	Ghr+Ant (4 nmol+6 nmol) (n=10)	Antagonista (n=8)
Tamaño de la camada (número de fetos)	11,7 ± 0,7	11,7±1,0	11,3 ± 0,7	11,6 ± 0,4	12,2 ± 0,6
Peso de la camada (g)	11,2 ± 0,8	11,6±1,2	9,8 ± 1,1	9,6 ± 1,1	10,5 ± 1,3
Peso de cada feto (g)	1,0 ± 0,0	1,0±0,0	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,1
Número de cuerpos lúteos	11,9 ± 0,6	12,7±0,7	12,6 ± 0,6	12,6 ± 0,5	13,2 ± 0,7

Ghrelina (Ghr, 2 ó 4 nmol/animal/día) y/o el antagonista (Ant: (D-Lys₃)GHRP-6, 6 nmol/animal/día) fueron inyectados (s.c. y en dos inyecciones diarias) desde una semana previa a la cópula y hasta confirmada la misma. Las hembras controles fueron inyectadas con vehículo (solución isotónica de ClNa). La cópula se confirmó mediante la presencia de tapón mucoso o de espermatozoides en el extendido vaginal. Los animales fueron sacrificados al día 18 de preñez. El parámetro “tamaño de la camada” incluye fetos viables y no viables; los parámetros de peso incluyen solo fetos viables. Los valores se expresan como TM±EEM. n=número de hembras evaluadas.

Sin embargo, las hembras tratadas con Ghr y/o su antagonista mostraron, con mayor frecuencia que las controles (entre 300 y 550% de aumento), algún grado de pérdida embrionaria (Figura 12). Este parámetro se calculó como el número de fetos presentes en el útero al día 18 de gestación, en relación al número de cuerpos lúteos cuantificados en los respectivos ovarios (considerado este último parámetro como indicador de la tasa de ovulación). Este aumento en el porcentaje de hembras con pérdida embrionaria alcanzó valores estadísticamente significativos, únicamente en las hembras tratadas con la mayor dosis de Ghr.

En cuanto a los niveles de pérdida embrionaria que presentó cada hembra, registramos una tendencia a aumentar (sin significancia estadística) en todos los tratamientos aplicados con respecto al control (Tabla 3).

Es importante destacar que el grupo Ghr+antagonista tendió a disminuir los efectos encontrados (es decir, los valores se acercan al control) con los tratamientos Ghr o antagonista por separado.

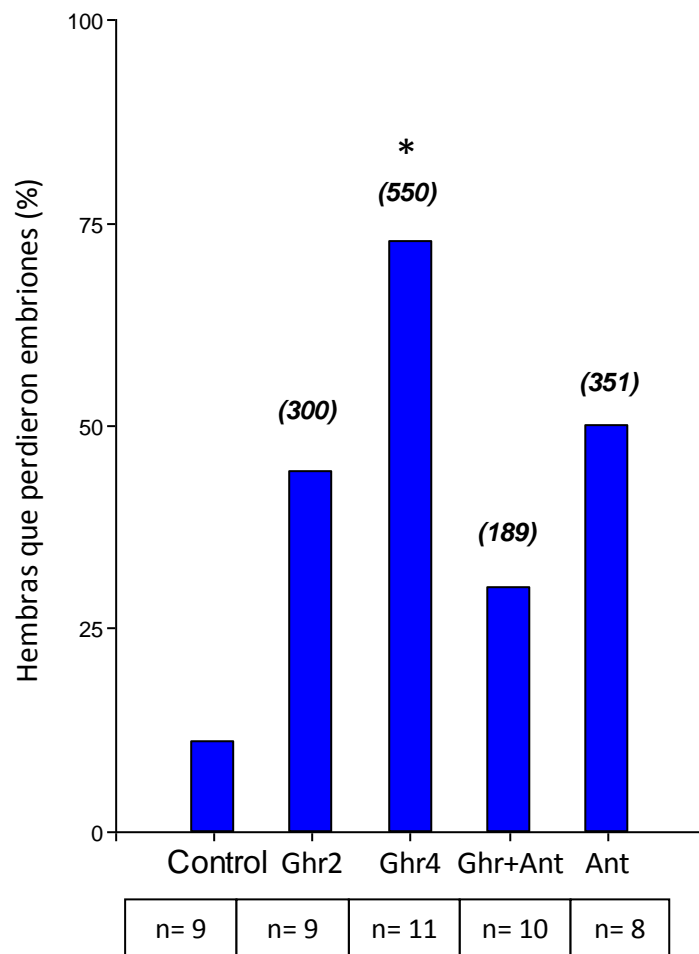


Figura 12: Efectos de la inyección diaria (s.c) de ghrelina (Ghr: 2 ó 4 nmol/animal/día; Ghr2 y Ghr4 respectivamente) con o sin la co-administración de un antagonista del receptor (ant: (D-Lys₃)GHRP-6; 6 nmol/animal/día), desde una semana previa a la cópula y hasta confirmada la misma, sobre el % de hembras con pérdida embrionaria. Se consideró pérdida embrionaria a un menor número de fetos que de cuerpos lúteos encontrados al día 18 de gestación. Los valores entre paréntesis corresponden al % de aumento en las hembras que perdieron embriones con respecto al control= (% de hembras con pérdida - % de hembras controles con pérdida) x 100/ % de hembras controles con pérdida. Los animales controles recibieron solución isotónica ClNa. Se consideró día 1 de preñez a la presencia de tapón mucoso o espermatozoides en el extendido vaginal y las hembras fueron sacrificadas al día 18 de preñez. n=número de hembras evaluadas. *: $p < 0,001$ vs Control.

Tabla 3: Efectos de la inyección de diferentes dosis de ghrelina, con o sin su antagonista, desde una semana previa a la cópula y hasta la confirmación de la misma, sobre el porcentaje de pérdida embrionaria.

Tratamiento	% pérdida embrionaria	% de aumento en la pérdida con respecto al control
Control (n=9)	2,2 ± 2,2	-
Ghr 2 nmol (n=9)	7,3 ± 6,9	232
Ghr 4 nmol (n=11)	9,8 ± 5,3	345
Ghr+Ant (4 nmol+6 nmol) (n=10)	4,2 ± 2,2	100
Antagonista (6 nmol) (n=8)	6,8 ± 3,7	218

Ghrelina (Ghr, 2 ó 4 nmol/animal/día) y/o el antagonista (Ant: (D-Lys₃)GHRP-6, 6 nmol/animal/día) fueron inyectadas (s.c. y en dos inyecciones diarias) desde una semana previa a la cópula y hasta confirmada la misma. Las hembras controles fueron inyectadas con vehículo (solución isotónica de ClNa). La cópula se confirmó mediante la presencia de tapón mucoso o de espermatozoides en el extendido vaginal. % de pérdida embrionaria= 100 - (camada x 100/ número de cuerpos lúteos); % de aumento en la pérdida con respecto al control= (% de pérdida - % de pérdida del control) x 100/ % de pérdida del control. Los animales fueron sacrificados al día 18 de preñez. Los valores se expresan como TM±EEM o % según corresponda. n=número de hembras evaluadas.

Una situación similar a la anterior ocurrió cuando evaluamos el porcentaje de hembras que presentaban algún grado de atrofia fetal, es decir, fetos que presentaban un

tamaño marcadamente menor a los normales. Un mayor porcentaje de hembras tratadas con Ghr y especialmente con el antagonista ($p < 0,050$) presentaron fetos atrofiados (171 a 576% de aumento con respecto al grupo control) (Figura 13).

Con respecto al grado de atrofia fetal que presentaban cada una de estas hembras, los valores se presentan en la Figura 14. Si bien todos los tratamientos aumentaron el porcentaje de atrofia fetal/hembra, solo se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas en las del grupo antagonista con respecto al control o a Ghr+antagonista.

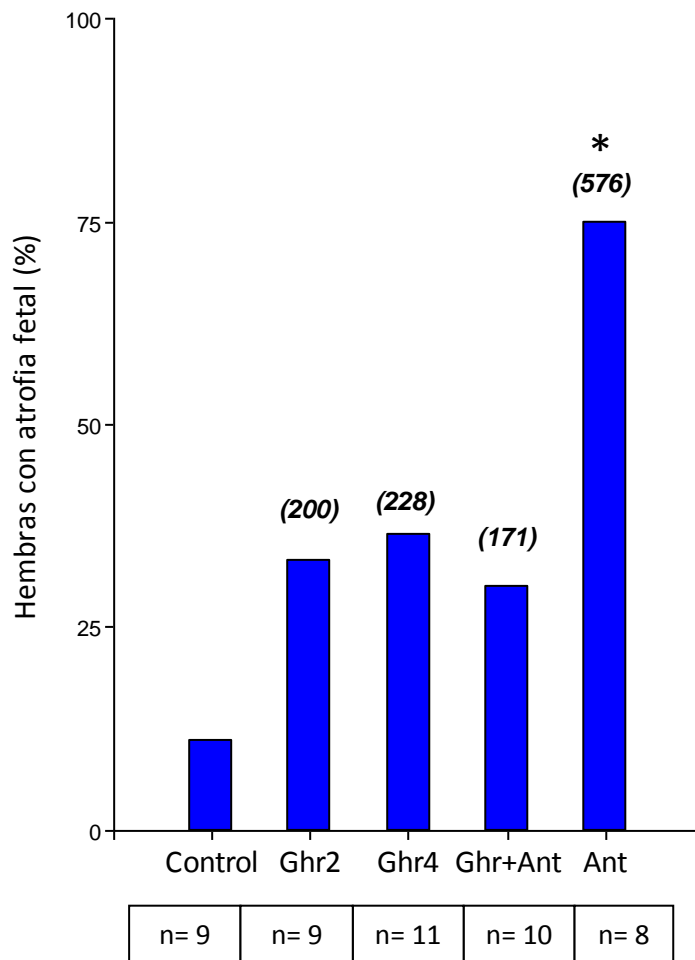


Figura 13: Efectos de la inyección diaria (s.c) de ghrelina (Ghr: 2 ó 4 nmol/animal/día) con o sin la co-administración de un antagonista del receptor (Ant: (D-Lys₃)GHRP-6; 6 nmol/animal/día), desde una semana previa a la cópula y hasta confirmada la misma, sobre el % de hembras con atrofia fetal. Se consideró atrofia fetal a la presencia de fetos que detuvieron su crecimiento (es decir, de tamaño notablemente más pequeño que los normales al día 18 de gestación). Los valores entre paréntesis corresponden al % de aumento en el número de hembras con atrofia fetal con respecto al % control= $(\% \text{ de hembras con atrofia} - \% \text{ de hembras controles con atrofia}) \times 100 / \% \text{ de hembras controles con atrofia}$. Los animales controles recibieron únicamente el vehículo (solución isotónica CINA). Se consideró día 1 de preñez a la presencia de tapón mucoso o espermatozoides en el extendido vaginal. *: $p = 0,013$ vs Control. n=número de hembras evaluadas.

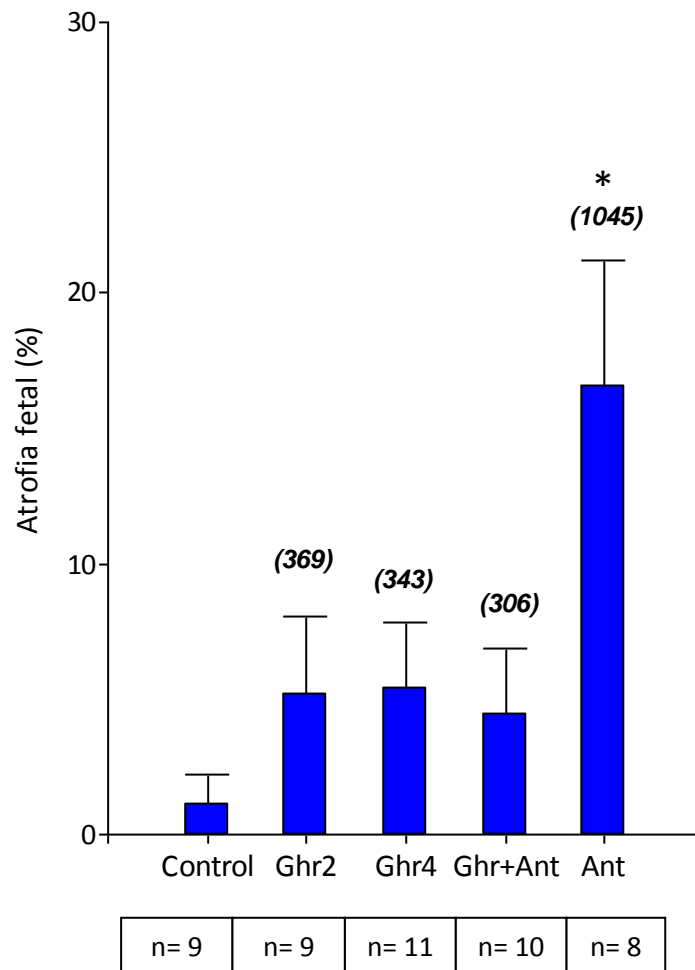


Figura 14: Efectos de la inyección diaria (s.c) de ghrelina (Ghr: 2 ó 4 nmol/animal/día) con o sin la co-administración de un antagonista del receptor (Ant: (D-Lys₃)GHRP-6; 6 nmol/animal/día), desde una semana previa a la cópula y hasta confirmada la misma, sobre el % de atrofia fetal (atrofiados x 100/ camada). Se consideró atrofia fetal a la presencia de fetos que detuvieron su crecimiento (es decir, de tamaño notablemente más pequeño que los normales al día 18 de gestación). Los valores que se expresan entre paréntesis corresponden al % de aumento de atrofia fetal con respecto al control= (% de atrofiados - % de atrofiados control) x 100/ % de atrofiados control. Los animales controles recibieron únicamente el vehículo (solución isotónica ClNa). Se consideró día 1 de preñez a la presencia de tapón mucoso o espermatozoides en el extendido vaginal.*: $p=0,040$ vs Control y Ghr+Ant. n=número de hembras evaluadas.

Objetivo 3: Papel de Ghr en el desarrollo embrionario temprano y la implantación:

Objetivo 3a: con el propósito de determinar el papel del péptido en el desarrollo embrionario pre-implantatorio, investigamos en hembras preñadas e inyectadas con Ghr (2 ó 4 nmol/animal/día) y/o con el antagonista (6 nmol/animal/día) durante los primeros días de gestación, los efectos de estos tratamientos sobre la presencia de embriones de 2 o más

células, mórulas y blastocitos en diferentes etapas de desarrollo (blastocitos compactos, expandidos o eclosionados), sacrificando los animales a las 80 h de la ovulación estimada.

Para ello, se obtuvieron los ovocitos/embriones mediante lavados de oviductos y úteros. Dado que encontramos solo un 6,4% de los embriones en los oviductos con respecto al total recogido de todo el tracto reproductivo y que no detectamos diferencias entre los tratamientos en relación al porcentaje de ovocitos/embriones obtenidos de oviducto y/o a su nivel de desarrollo, los resultados se han expresado sin diferenciar la procedencia de los mismos. Como puede observarse en la Figura 15, el tratamiento de las hembras con el antagonista desde la inducción de ovulación hasta las 80 h de ocurrida la misma disminuyó, en forma significativa, el porcentaje de fertilización con respecto al control. Nuevamente, la co-administración de Ghr revirtió este efecto.

Por otro lado, todos los tratamientos aplicados a estas hembras retrasaron significativamente el desarrollo embrionario con respecto al control, este efecto se evidenció en un aumento en el porcentaje de embriones en etapa “hasta mórula” y una disminución en el porcentaje de blastocitos (Tabla 4).

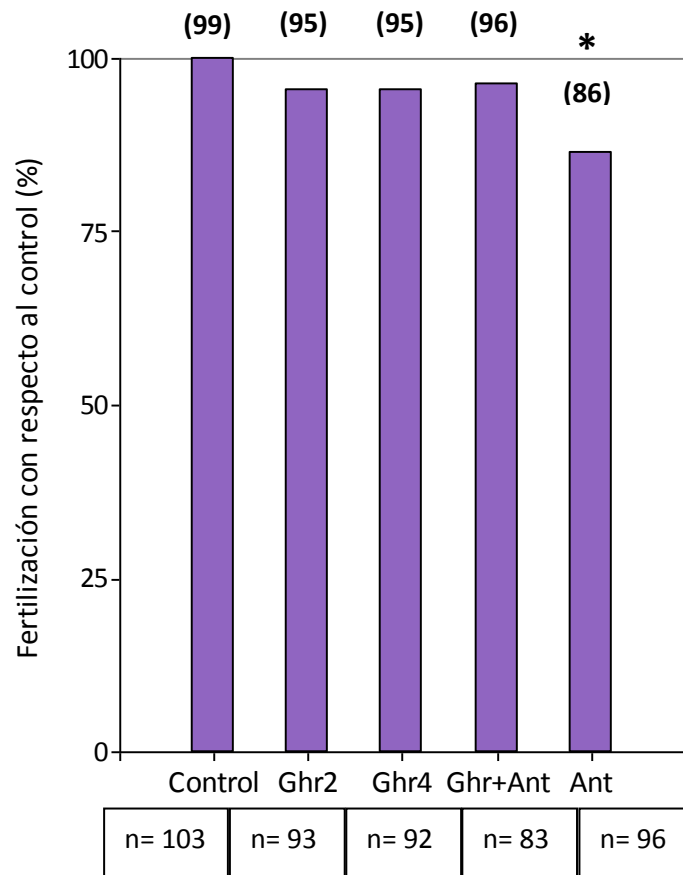


Figura 15: Efectos de la inyección diaria (s.c) en hembras adultas, desde la inducción de ovulación hasta el 3º día de preñez, de Ghr (2 ó 4 nmol/animal/día) con o sin la administración conjunta de un antagonista del receptor (Ant: (D-Lys₃)GHRP-6; 6 nmol/animal/día) sobre el % de fertilización. Ghrelina y/o el ant fueron administrados en dos inyecciones/día. % de fertilización con respecto al control= % de fertilización x 100/ % de fertilización control. Los valores que se expresan entre paréntesis corresponden al % de fertilización real. n=número de ovocitos/embriones evaluados. *: $p < 0,050$ vs los demás grupos.

Tabla 4: Efectos de la inyección de ghrelina, con o sin la co-administración de un antagonista del receptor, durante los primeros tres días de preñez, sobre el desarrollo embrionario pre-implantatorio.

Tratamiento	Hasta mórula (%)	Blastocitos (%)
Control (n=102)	22	78 *
Ghr 2 nmol (n=88)	38	62
Ghr 4 nmol (n=87)	49	51
Ghr+Ant (4 nmol+6 nmol) (n=79)	52	48
Antagonista (6 nmol) (n=82)	39	61

Efectos de la inyección diaria (s.c) en hembras adultas, desde la inducción de ovulación hasta el 3° día de preñez, de ghrelina (Ghr: 2 ó 4 nmol/animal/día) con o sin la administración conjunta de un antagonista del receptor (Ant: (D-Lys₃)GHRP-6; 6 nmol/animal/día) sobre el desarrollo embrionario temprano. Ghrelina y/o el ant fueron administrados en dos inyecciones/día. % de embriones desarrollados hasta mórula: incluye embriones de 2 o más células y mórulas. % de blastocitos: incluye blastocitos compactos, blastocitos expandidos y blastocitos eclosionados de la zona pelúcida. n=número de ovocitos evaluados. *: $p < 0,050$ vs los demás grupos.

Objetivo 3b: con el propósito de determinar el papel de Ghr sobre la etapa peri-implantatoria, se inyectó la hormona (2 ó 4 nmol/animal/día) y/o el antagonista ((D-Lys₃)GHRP-6, 6 nmol/animal/día) a hembras preñadas, desde el día 3 al 7 de gestación. Se controló el peso corporal de la madre el día 1 de preñez (día de confirmación de la cópula) y se siguió la evolución del mismo, evaluando este parámetro en los días 7, 14 y 18. Tras el sacrificio de las hembras (día 18 de gestación), se cuantificó el tamaño y peso de la camada, el número de cuerpos lúteos, el porcentaje de pérdida embrionaria y la presencia o no de fetos atrofiados.

Bajo estas condiciones experimentales, ninguno de los tratamientos modificó el número de fetos/hembra. Sin embargo las camadas de las hembras tratadas con Ghr (4 nmol) o con el antagonista solo, tendieron a ser de menor peso; esta diferencia alcanzó valores estadísticamente significativos solo en el grupo Ghr 4 nmol/animal. Cuando se

evaluó el peso inicial de cada cría (considerando únicamente las crías viables), detectamos que Ghr (en ambas dosis) y el antagonista disminuyeron significativamente este parámetro. Nuevamente, la co-administración de Ghr con el antagonista suavizó este efecto (Tabla 5).

Tabla 5: Efectos de la inyección de ghrelina, con o sin la co-administración de un antagonista del receptor, sobre el éxito reproductivo de ratones hembras.

Parámetros	Control (n=10)	Ghr 2 nmol (n=13)	Ghr 4 nmol (n=7)	Ghr+Ant (4 nmol+6 nmol) (n=9)	Antagonista (n=8)
Tamaño de la camada (número de fetos)	11,5 ± 0,6	12,1 ± 1,1	10,0 ± 1,2	11,7 ± 0,5	12,2 ± 0,1
Peso camada completa (g)	11,5 ± 0,7	10,2 ± 0,9	8,2 ± 0,9 *	10,9 ± 0,5	9,2 ± 1,2
Peso inicial de cada feto (g)	1,0 ± 0,0 ○	0,8 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,7 ± 0,1
Número de cuerpos lúteos	12,0 ± 0,3	13,5 ± 0,8	13,1 ± 0,7	13,6 ± 0,6	13,1 ± 0,7

Ghrelina (Ghr) y/o su antagonista (Ant: (D-Lys₃)GHRP-6, 6 nmol/animal/día) fueron inyectados (s.c. y en dos inyecciones diarias, con la mitad de la dosis cada una) desde el 3° al 7° día de preñez. Las hembras controles fueron inyectadas con vehículo (solución isotónica de ClNa). La cópula se confirmó mediante la presencia de tapón mucoso o de espermatozoides en el extendido vaginal. Los animales fueron sacrificados al día 18 de preñez. El parámetro “tamaño de la camada” incluye fetos viables y no viables; los parámetros de peso incluyen solo fetos viables. Los valores se expresan como TM±EEM. n=número de hembras evaluadas. *: $p=0,010$ vs Control; ○: $p=0,050$ vs Ghr 2 nmol, Ghr 4 nmol y Antagonista.

Cuando evaluamos la proporción de las madres de cada tratamiento que presentaron algún grado de pérdida embrionaria o de atrofia fetal, detectamos que estos parámetros aumentaban significativamente con respecto al control tanto con la mayor dosis de Ghr, como con Ghr+antagonista y con el antagonista solo (Figuras 16 y 17). No se detectaron sin embargo, diferencias significativas en el porcentaje de pérdida embrionaria/hembra o de atrofia fetal/hembra (Tabla 6). Cabe destacar, no obstante, que en la variable porcentaje de pérdida embrionaria/hembra, la administración conjunta de Ghr con el antagonista sí logró atenuar los efectos ejercidos por Ghr, efecto que no es evidente en la Figura 16.

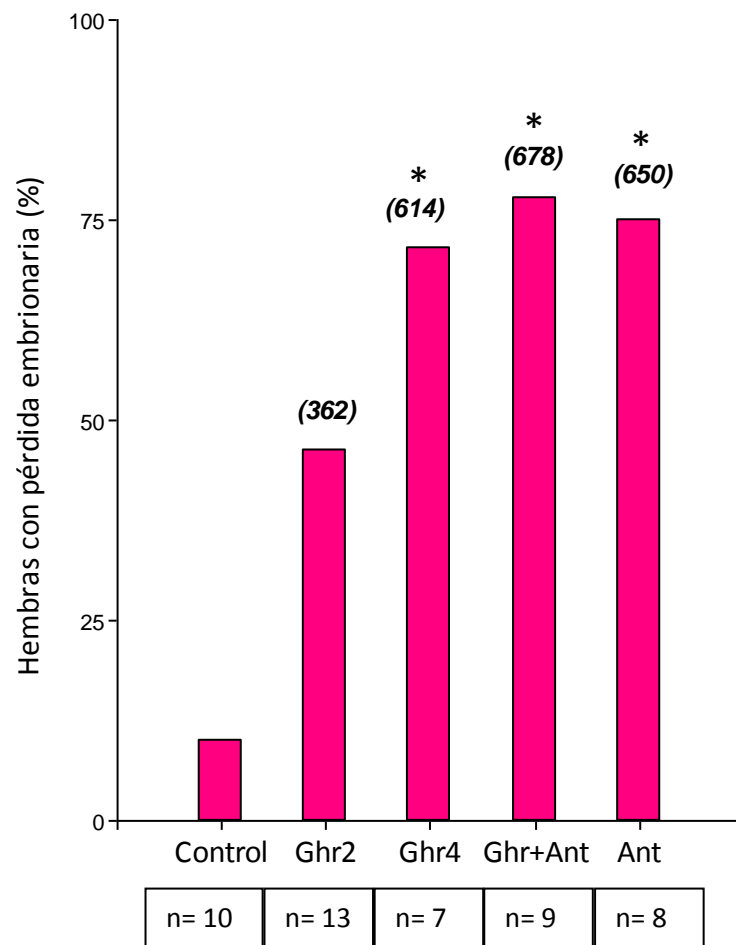


Figura 16: Efectos de la inyección diaria (s.c) de ghrelina (Ghr: 2 ó 4 nmol/animal/día) con o sin la co-administración de un antagonista del receptor (Ant: (D-Lys₃)GHRP-6; 6 nmol/animal/día), desde el 3° al 7° día de preñez sobre el % de hembras con pérdida embrionaria. Se consideró pérdida embrionaria a un menor número de fetos que de cuerpos lúteos al día 18 de gestación. Los valores que se expresan entre paréntesis corresponden al % de aumento de hembras que perdieron embriones con respecto al control= $(\% \text{ de hembras con pérdida} - \% \text{ de hembras con pérdida control}) \times 100 / \% \text{ de hembras con pérdida control}$. Los animales controles recibieron únicamente el vehículo (solución isotónica C1Na). Se consideró día 1 de preñez a la presencia de tapón mucoso o espermatozoides en el extendido vaginal y las hembras fueron sacrificadas al día 18 de preñez. n=número de hembras evaluadas. *: $p < 0,050$ vs Control.

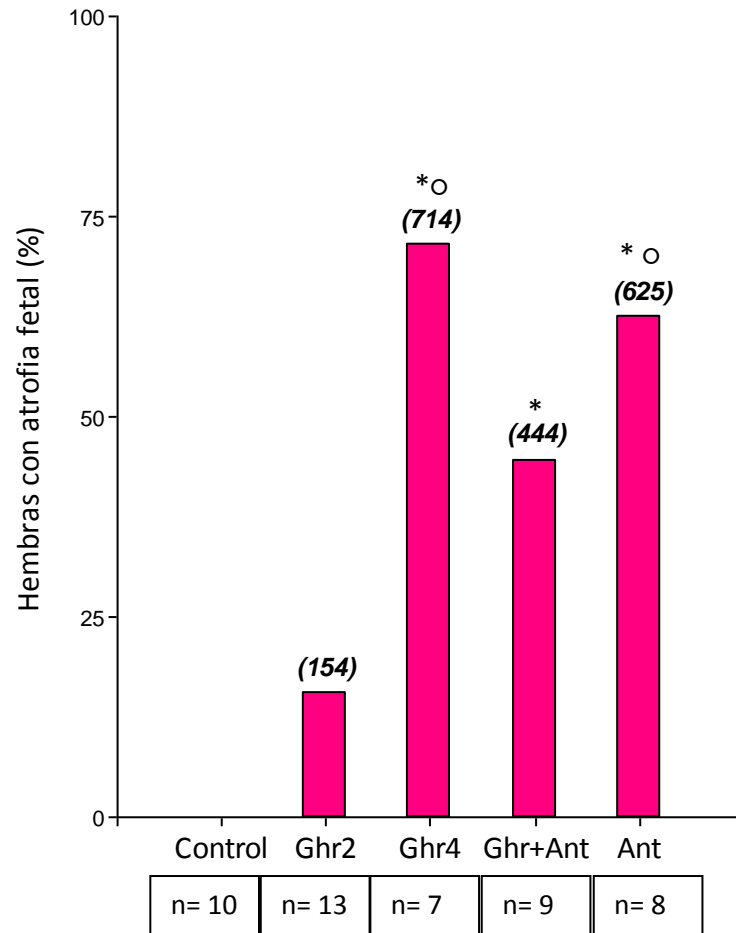


Figura 17: Efectos de la inyección diaria (s.c) de ghrelina (Ghr: 2 ó 4 nmol/animal/día) con o sin la co-administración de un antagonista del receptor (Ant: (D-Lys₃)GHRP-6; 6 nmol/animal/día), desde el 3° al 7° día de preñez, sobre el % de hembras con atrofia fetal (fetos atrofiados x 100/ camada). Se consideró atrofia fetal a la presencia de fetos que detuvieron su crecimiento (es decir, de tamaño notablemente más pequeño que los normales al día 18 de gestación). Los valores que se expresan entre paréntesis corresponden al % de aumento de hembras con atrofia fetal con respecto al control= (% de hembra con atrofia - % de hembras controles con atrofia) x 100/ % de hembras controles con atrofia. Los animales controles recibieron únicamente el vehículo (solución isotónica ClNa). Se consideró día 1 de preñez a la presencia de tapón mucoso o espermatozoides en el extendido vaginal. n=número de hembras evaluadas. *: $p < 0,050$ vs Control, o: $p < 0,050$ vs Ghr 2 nmol.

Tabla 6: Efectos de la inyección de ghrelina, con o sin la co-administración de un antagonista del receptor, sobre el porcentaje de pérdida o de atrofia fetal en hembras de ratón.

Tratamiento	% pérdida embrionaria	% de aumento en la pérdida con respecto al control	% de fetos atrofiados	% de aumento de fetos atrofiados con respecto al control
Control (n=10)	3,8 ± 4,8	-	0,0 ± 0,0	-
Ghr 2 nmol (n=13)	5,8 ± 8,6	53	8,3 ± 7,7	830
Ghr 4 nmol (n=7)	24,4 ± 7,3	542	13,9 ± 4,9	1390
Ghr+Ant (4 nmol+6 nmol) (n=9)	13,3 ± 3,7	250	7,5 ± 3,3	750
Antagonista (6 nmol) (n=8)	6,7 ± 4,0	76	8,0 ± 2,9	800

Ghrelina (Ghr) y/o su antagonista (Ant: (D-Lys₃)GHRP-6, 6 nmol/animal/día) fueron inyectados (s.c. y en dos inyecciones diarias, con la mitad de la dosis cada una) desde el 3° al 7° día de preñez. Las hembras controles fueron inyectadas con vehículo (solución isotónica de ClNa). La cópula se confirmó mediante la presencia de tapón mucoso o de espermatozoides en el extendido vaginal. Los animales fueron sacrificados al día 18 de preñez. % de pérdida embrionaria= 100- (número de embriones x 100/ número de cuerpos lúteos); % de atrofia fetal= fetos atrofiados x 100/ camada; % de aumento en la pérdida embrionaria con respecto al control= (% de pérdida - % de pérdida del control) x 100/ % de pérdida del control; % de aumento en la atrofia fetal con respecto al control= (% de atrofiados - % de atrofiados control) x 100/ % de atrofiados control. Se consideró atrofia fetal a la presencia de fetos que detuvieron su crecimiento (es decir, de tamaño notablemente más pequeño que los normales al día 18 de gestación). Los valores se expresan como TM±EEM. n=número de hembras evaluadas.

En cuanto a la evolución del peso corporal materno durante la preñez, la misma fue calculada mediante la diferencia entre el peso corporal final de cada semana de gestación y el inicial (día 1 de preñez). Como puede apreciarse en la Figura 18, las hembras tratadas con la mayor dosis de Ghr o con el antagonista solo, ganaron significativamente menos peso que las controles o que aquéllas tratadas con la menor dosis del péptido. Es importante destacar que el peso de las hembras (excluyendo los fetos) al día del sacrificio, no presentó variaciones significativas entre los diferentes grupos experimentales.

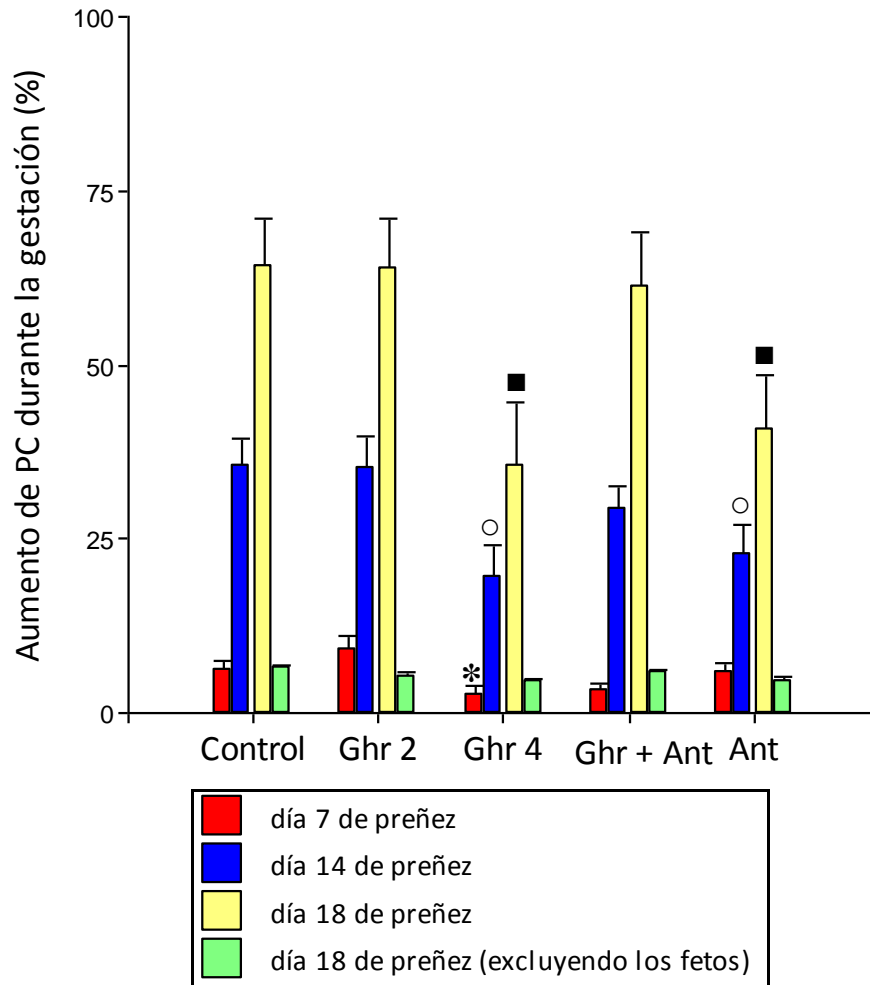


Figura 18: Efectos de la inyección diaria (s.c) de ghrelina (Ghr: 2 ó 4 nmol/animal/día) con o sin la administración conjunta de un antagonista del receptor (Ant: (D-Lys₃)GHRP-6; 6 nmol/animal/día) desde el 3° al 7° día de preñez sobre el % de aumento en el peso corporal (PC) durante la gestación en relación al 1° día de preñez. Los animales controles recibieron únicamente el vehículo (solución isotónica C1Na). Se consideró día 1 de preñez a la presencia de tapón mucoso o espermatozoides en el extendido vaginal y las hembras se sacrificaron al día 18. Día 18 de preñez sin crías: aumento del PC de la hembra al día 18 restando el peso de sus crías. Los valores se expresan como TM±EEM. Número de hembras evaluadas: Control n=12, Ghr2 n=14, Ghr4 n=9, Ghr+Ant n=10 y ant n=11. *: $p=0,002$ vs Control y Ghr2; ○: $p=0,015$ vs Control y Ghr2; ■: $p=0,003$ vs Control y Ghr2.

Objetivo 4: Evaluación histológica y de la expresión inmunohistoquímica para NOS en úteros de hembras tratadas con Ghr y/o su antagonista. Cuantificación de la concentración de P₄ plasmática (objetivo 4):

Con el propósito de evaluar el efecto peri-implantatorio de los tratamientos experimentales sobre los parámetros arriba mencionados, se inyectaron hembras de ratón desde el día 3 al 7 de preñez, con Ghr (4 nmol/animal/día) y/o su antagonista (6

nmol/animal/día). Tras el sacrificio (día 8 de gestación) se realizó el dosaje plasmático de progesterona, el análisis macroscópico e histológico de los úteros grávidos y mediante inmunohistoquímica, la evaluación de la expresión de NOS.

En cuanto a la concentración plasmática de progesterona, ninguno de los tratamientos modificó significativamente este parámetro con respecto al control (Tabla 7).

Tabla 7: Concentración de progesterona plasmática de hembras inyectadas del día 3 al 7 de preñez con ghrelina y/o un antagonista.

Parámetro	Control (n=10)	Ghr (4 nmol/animal/día) (n=12)	Ghr+Ant (n=9)	Antagonista (6 nmol/animal/día) (n=10)
Progesterona (ng/ml)	6,0 ± 1,0	7,1 ± 0,7	6,8 ± 0,8	7.0 ± 0,8

Ghrelina (Ghr) y/o su antagonista (Ant: (D-Lys₃)GHRP-6) fueron inyectados (s.c. y en dos inyecciones diarias, con la mitad de la dosis cada una) desde el 3° al 7° día de preñez. Las hembras controles fueron inyectadas con vehículo (solución isotónica de ClNa). La cópula se confirmó mediante la presencia de tapón mucoso o de espermatozoides en el extendido vaginal. Los animales fueron sacrificados al día 8 de preñez. Los valores se expresan como TM±EEM. n=número de hembras/tratamiento.

Asimismo, ninguno de los tratamientos aplicados modificó el peso corporal de las hembras al día 8 de gestación. Tampoco se detectaron diferencias en otras variables evaluadas tales como peso uterino, área de implantación y porcentaje del útero ocupado por el área de implantación (Tabla 8). De manera similar, ninguno de los tratamientos modificó el número de embriones totales; no obstante, el tratamiento con antagonista solo aumentó en forma significativa la proporción de resorciones y de embriones atrofiados (Tabla 9 y Figura 19). Los animales tratados con Ghr mostraron tendencias similares, aunque sin alcanzar diferencias significativas. Es importante destacar que en el grupo antagonista solo, eran más frecuentes las resorciones tempranas (Figura 19b) que en las hembras tratadas con Ghr (porcentaje de interrupciones tempranas: antagonista=93 vs Ghr=66; n=15 y 6 respectivamente, $p>0,050$).

Tabla 8: Efectos de la inyección de ghrelina y/o de un antagonista del día 3 al 7 de preñez sobre algunas características uterinas macro o microscópicas.

Parámetros	Control (n=4)	Ghr (4 nmol/animal/día) (n=5)	Ghr+Ant (n=4)	Antagonista (6 nmol/animal/día) (n=4)
Peso corporal materno (g)	30,4 ± 1,3	30,5 ± 1,1	31,7 ± 1,3	30,5 ± 1,3
Peso uterino relativo (%)	1,5 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,1
Área de implantación (mm ²)	4,1 ± 0,5	3,7 ± 0,4	4,1 ± 0,5	3,0 ± 0,5
% del útero ocupado por el área de implantación	73,3 ± 2,8	68,7 ± 2,5	67,6 ± 2,7	65,7 ± 2,8

Ghrelina (Ghr) y/o su antagonista (Ant: (D-Lys₃)GHRP-6) fueron inyectados (s.c. y en dos inyecciones diarias, con la mitad de la dosis cada una) desde el 3° al 7° día de preñez. Las hembras controles fueron inyectadas con vehículo (solución isotónica de ClNa). La cópula se confirmó mediante la presencia de tapón mucoso o de espermatozoides en el extendido vaginal. Los animales fueron sacrificados al día 8 de preñez. El área de implantación y el % del útero ocupado por el área de implantación se calcularon durante la evaluación histológica del tejido. Peso uterino relativo: % del peso corporal correspondiente al peso uterino (peso uterino x 100/peso corporal). Los valores se expresan como TM±EEM.

Tabla 9: Efectos de la inyección de ghrelina y/o de su antagonista desde el día 3 al 7 de preñez sobre el número de embriones totales y los porcentajes de resorciones y atrofia fetal.

Parámetros	Número total de embriones	% de resorciones	% de aumento de resorciones con respecto al control	% de embriones atrofiados	% de aumento de embriones atrofiados con respecto al control
Control (n=4)	13,0 ± 0,9	0,5 ± 0,5	-	4,4 ± 4,0	-
Ghr (n=5)	13,2 ± 0,8	1,2 ± 0,4	140	8,9 ± 3,6	102
Ghr+Ant (n=4)	13,8 ± 0,9	1,0 ± 0,5	100	7,1 ± 4,0	61
Antagonista (n=4)	12,2 ± 0,9	3,7 ± 0,5 *	640*	30,2 ± 4,0 *	586*

Ghrelina (Ghr, (4nmol/animal/día)) y/o su antagonista (ant: (D-Lys₃)GHRP-6; (6nmol/animal/día)) fueron inyectados (s.c. y en dos inyecciones diarias, con la mitad de la dosis cada una) desde el 3° al 7° día de preñez. Las hembras controles fueron inyectadas con vehículo (solución isotónica de ClNa). La cópula se confirmó mediante la presencia de tapón mucoso o de espermatozoides en el extendido vaginal. Los animales fueron sacrificados al día 8 de preñez. El % de embriones atrofiados se evaluó macroscópicamente. El número de resorciones se calculó durante la evaluación histológica del tejido. Los valores se expresan como TM±EEM. n=número de hembras evaluadas. *: $p < 0,050$ vs demás grupos.

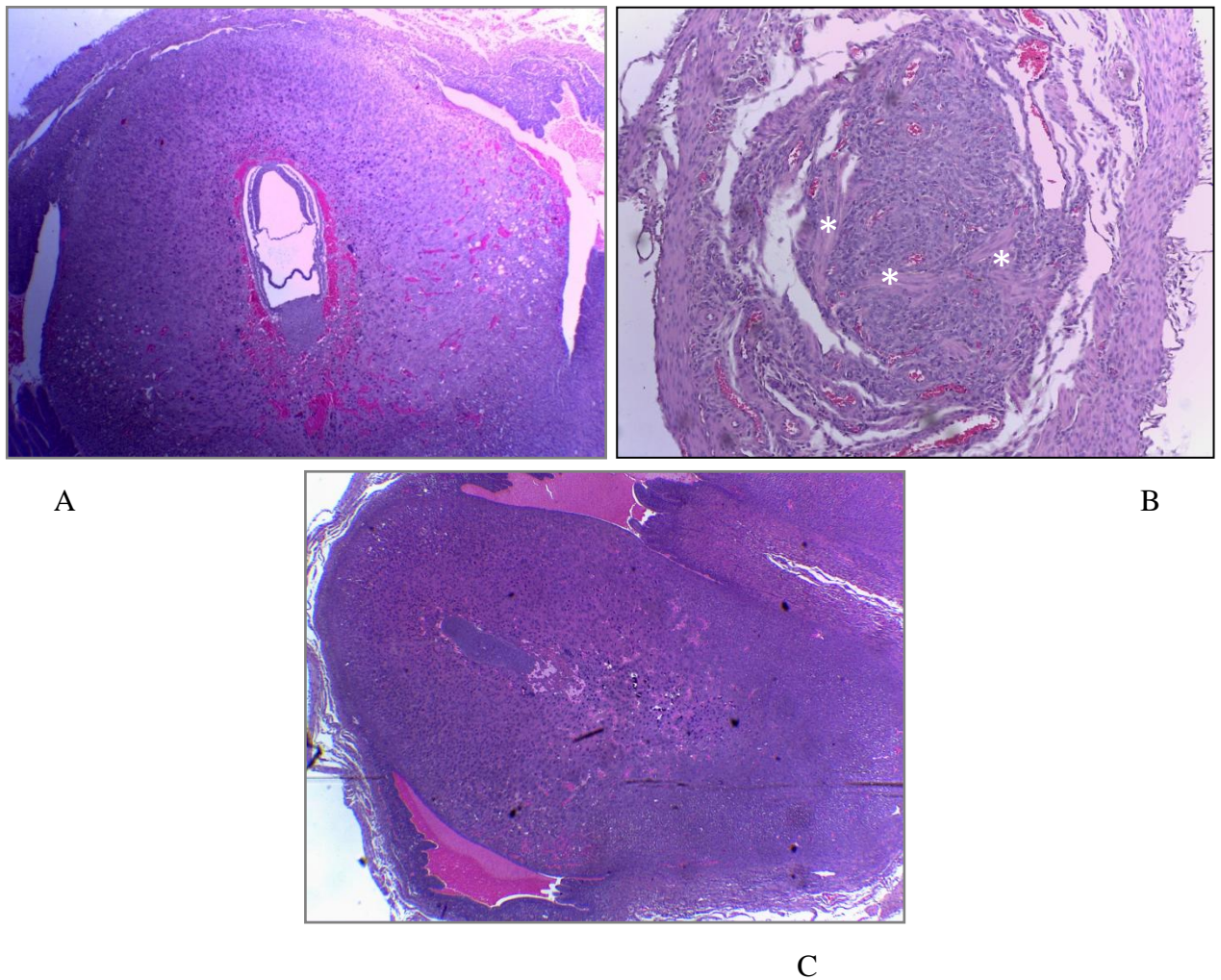


Figura 19: Microfotografías digitales tomadas mediante el software Axiovision 3.0.6 de muestras de cortes uterinos de 5 μ m pertenecientes a hembras tratadas del día 3 a 7 de preñez con ghrelina (4 nmol/animal/día) y/o su antagonista (6 nmol/animal/día). A: sitio de implantación normal, en el medio del cual se observa el embrión (control); B: resorción/disrupción temprana (antagonista); C: resorción/disrupción tardía (ghrelina). En B se distinguen áreas fibróticas en el sitio de implantación (*). Magnificación 10x. Tinción: H/E.

Otra característica a destacar, es que durante la evaluación histológica de estos tejidos detectamos que, fundamentalmente en el polo embrionario, se observaba una importante cantidad de células vacuoladas en los úteros de hembras tratadas con antagonista o Ghr y, en menor medida, con Ghr+antagonista o el control (Figuras 20 y 21).

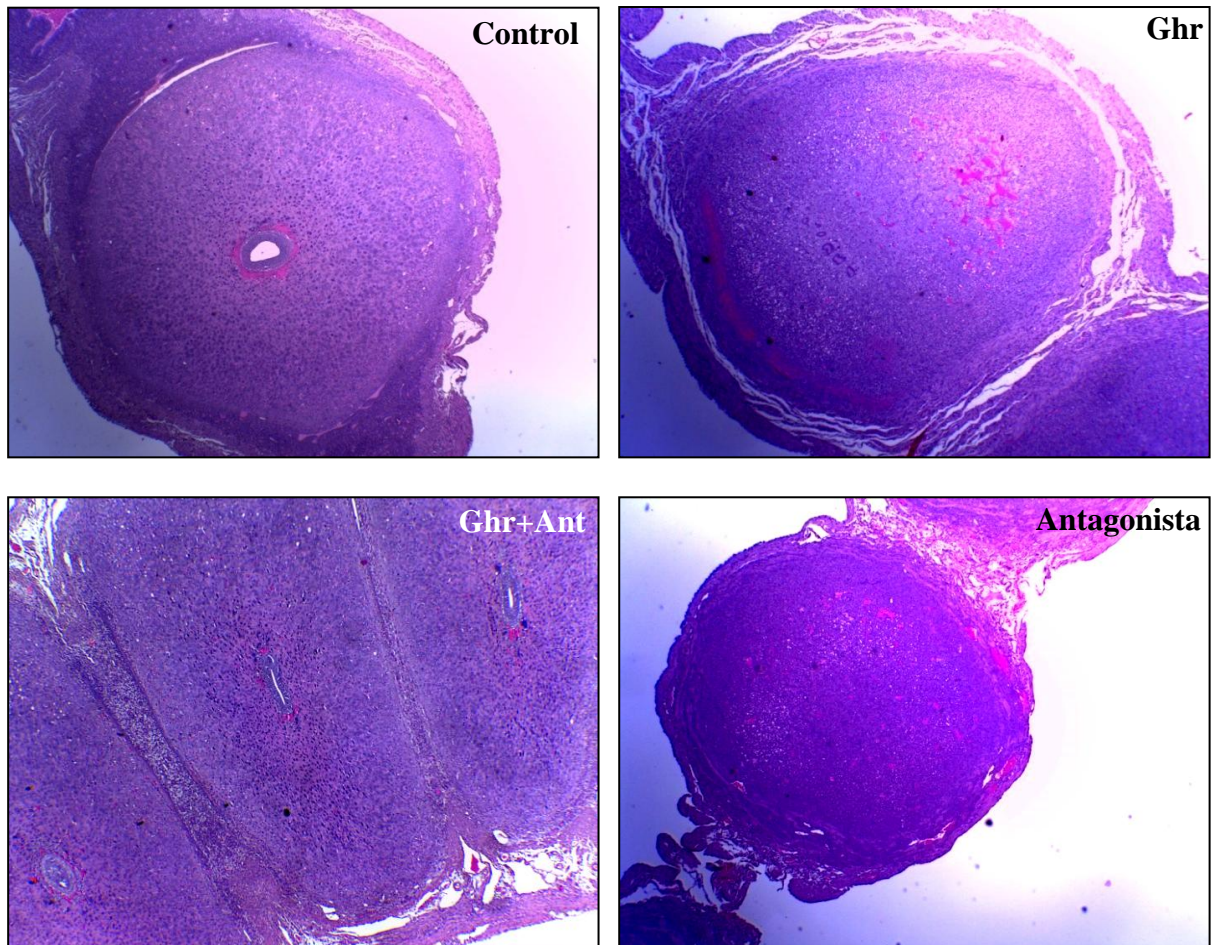


Figura 20: Microfotografías digitales tomadas mediante el software Axiovision 3.0.6 de muestras de cortes uterinos de 5 μ m pertenecientes a hembras tratadas del día 3 al 7 de preñez con ghrelina (Ghr: 4 nmol/animal/día) y/o su antagonista (Ant: 6 nmol/animal/día). Magnificación 10x. Tinción: Hematoxilina-Eosina (H/E).

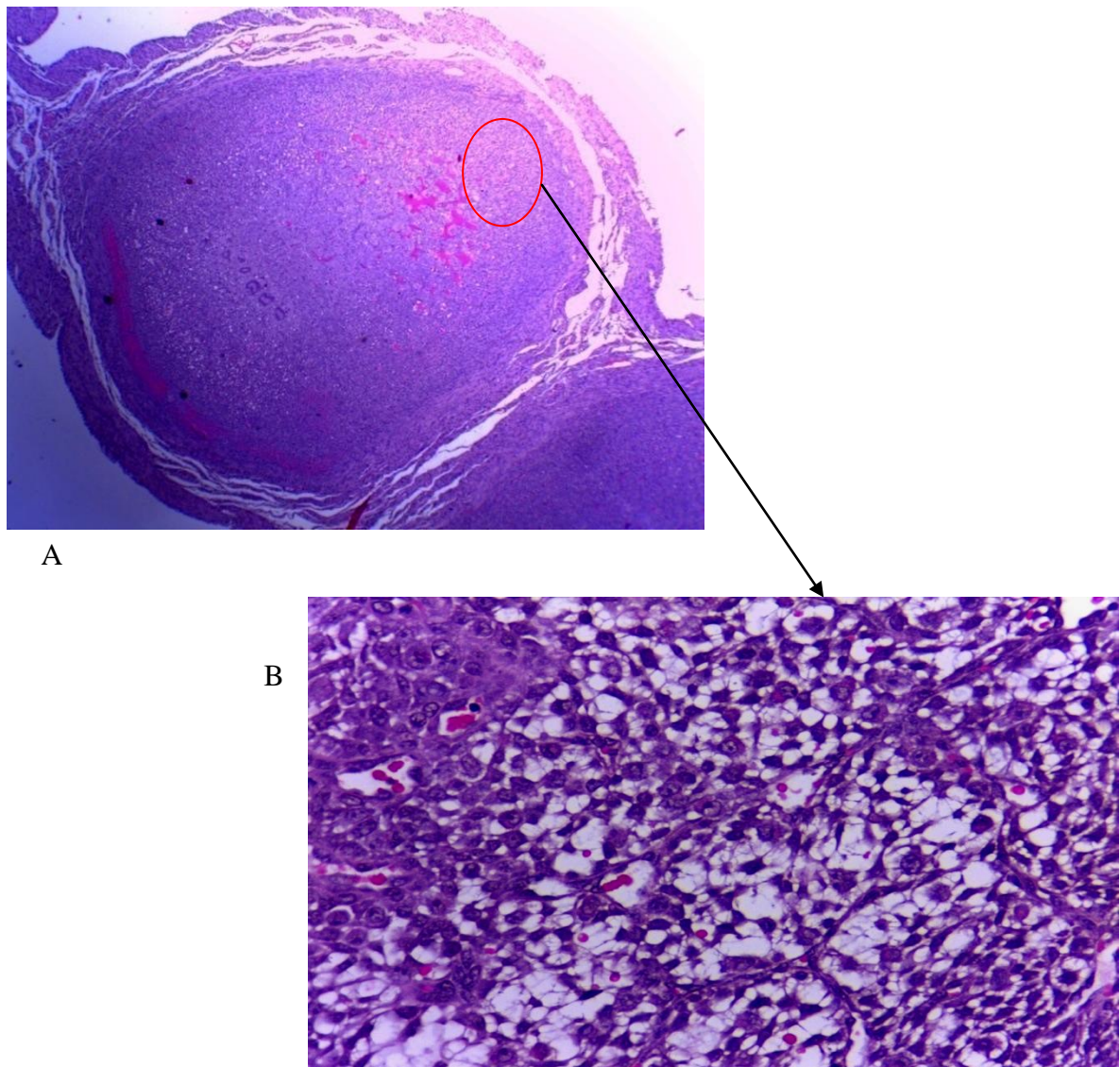


Figura 21: Microfotografías digitales tomadas mediante el software Axiovision 3.0.6 de una muestra de cortes uterinos de 5 μ m perteneciente a una hembra tratada desde el día 3 al 7 de preñez con ghrelina (4 nmol/animal/día). Magnificación: 10x en A y 40x en B. Tinción: H/E. Se observan múltiples células vacuoladas, ubicadas en el polo embrionario.

Cuando se realizó una tinción con PAS, para verificar si el contenido de estas vacuolas era glucógeno, observamos que solo algunas de ellas eran PAS positivo (Figura 22).

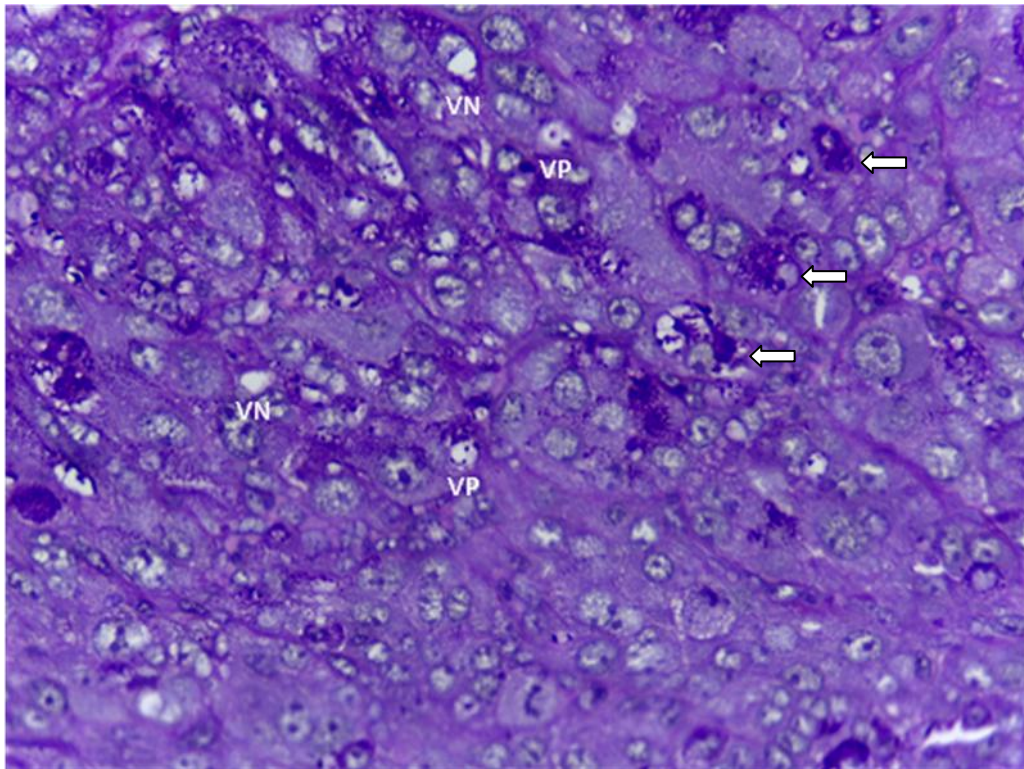
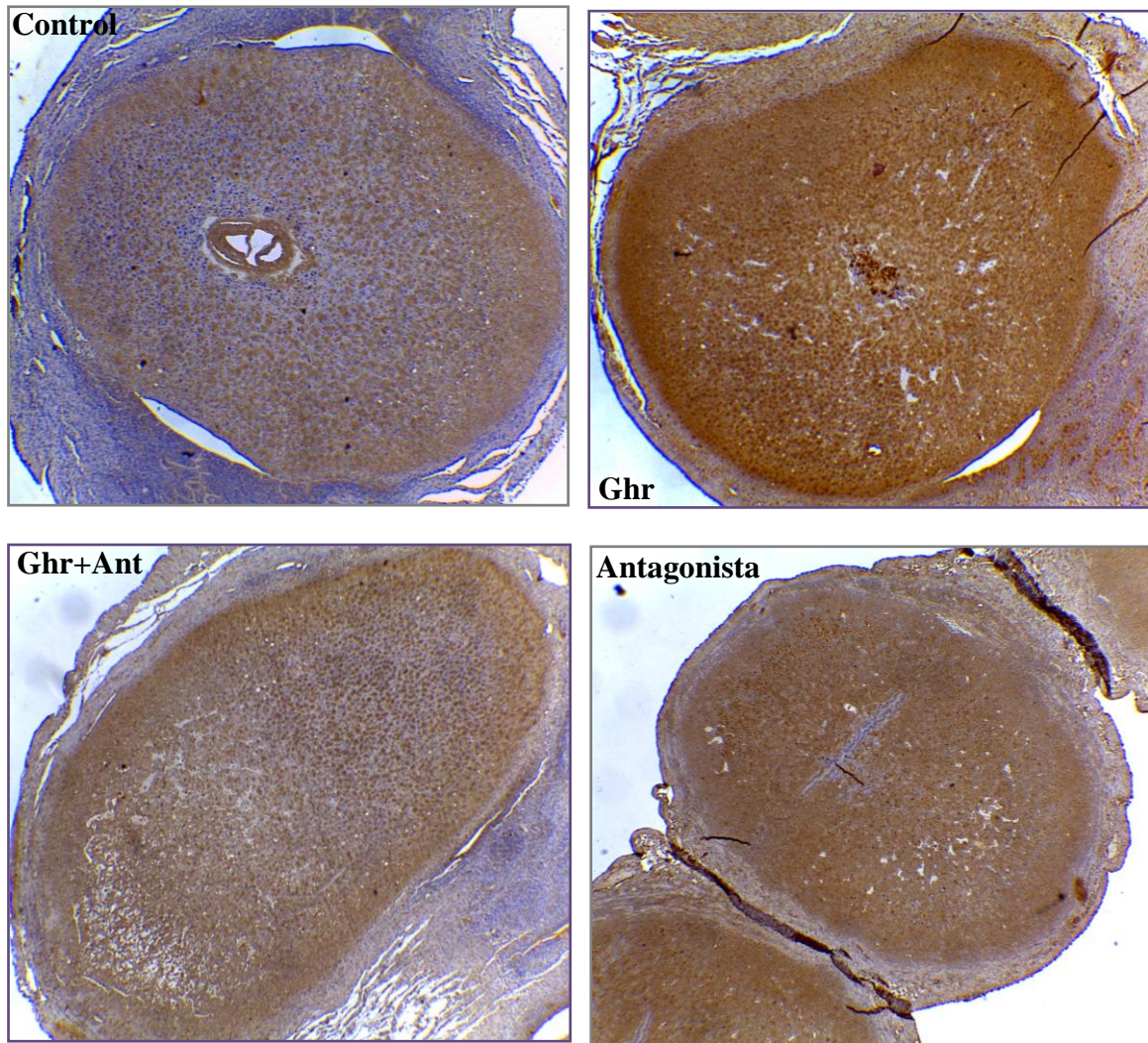


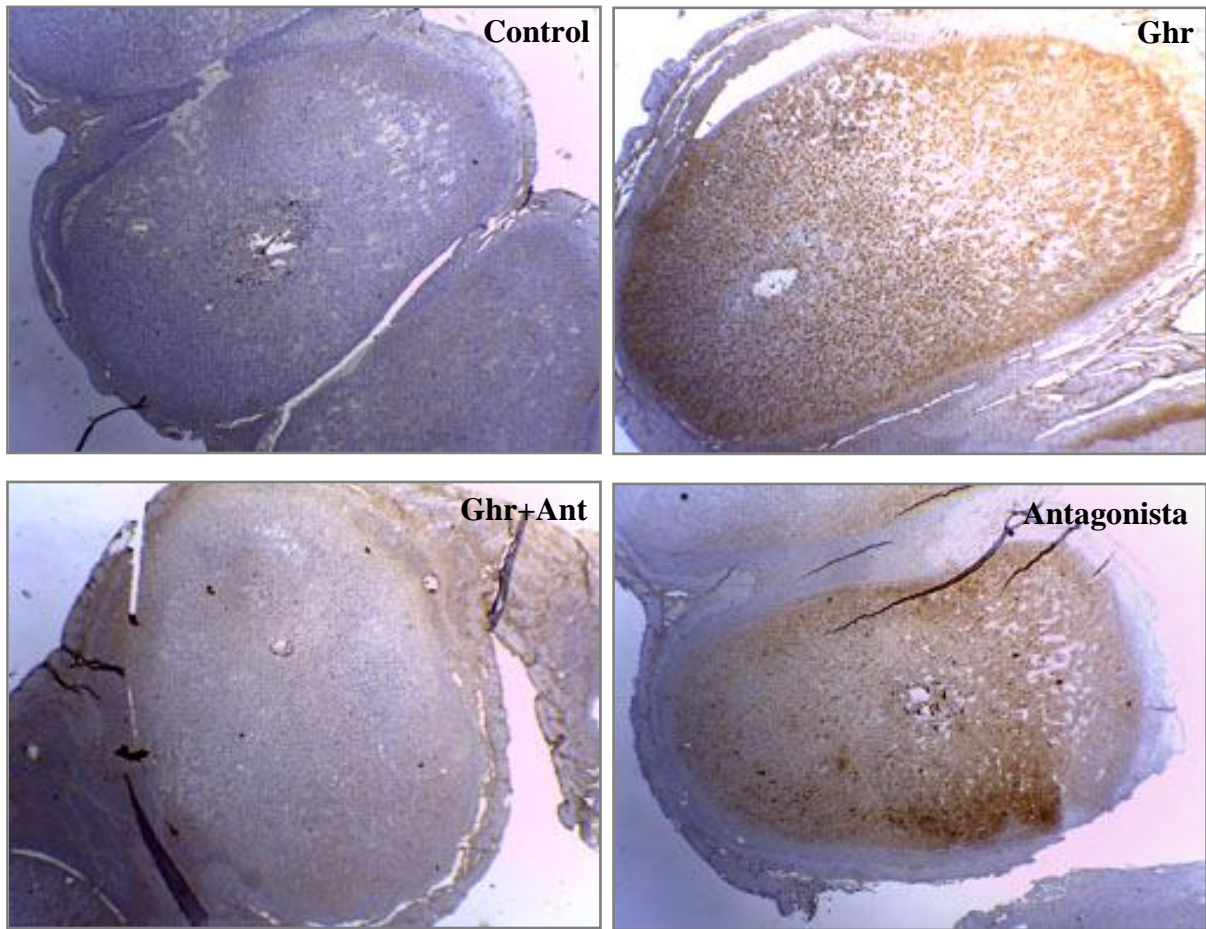
Figura 22: Microfotografía digital tomada mediante el software Axiovision 3.0.6 de una muestra de cortes uterinos de 5 μ m de una hembra tratada desde el día 3 al 7 de preñez con ghrelina (4 nmol/animal/día). Magnificación 40x. Tinción: PAS (reacción del ácido periódico de Schiff). Se observa célula vacuolada con PAS positivo (VP) y célula vacuolada PAS negativo (VN). Las flechas indican células natural killer uterinas, ya que la tinción con PAS es una técnica indirecta de marcación de estas células inmunológicas.

En cuanto al efecto de los tratamientos sobre la marcación de eNOS uterina, determinamos luego de un análisis semicuantitativo que, tanto Ghr como el antagonista solo, mostraron una marcación mayor que el control o que Ghr+antagonista (Figura 23). Cuando se realizó este mismo análisis para iNOS, se observaron resultados muy similares (Figura 24).



Tratamiento	Control (n=4)	Ghr (4nmol/animal/día) (n=5)	Ghr + Ant (n=4)	Antagonista 6nmol/animal/día) (n=4)
semi-cuantificación de la marcación de eNOS	+	+++	++	+++

Figura 23: Microfotografías digitales tomadas mediante el software Axiovision 3.0.6 de muestras de cortes uterinos de 5µm pertenecientes a hembras tratadas del día 3 al 7 de preñez con ghrelina (Ghr: 4 nmol/animal/día) y/o su antagonista (Ant: 6 nmol/animal/día). eNOS=óxido nítrico sintasa endotelial. Magnificación: 10X. Anticuerpo Abcam eNOS (ab66127) Rabbit. Dilución 1/500. Sistema de detección Kit ABC Vectastin Pk 6101- IgG de conejo. En la tabla se expresan las lecturas semicuantitativas de marcación inmunohistoquímica.



Tratamiento	Control (n=4)	Ghr (4nmol/animal/día) (n=5)	Ghr + Ant (n=4)	Antagonista 6nmol/animal/día) (n=4)
semi-cuantificación de la marcación de iNOS	+	+++	++	+++

Figura 24: Microfotografías digitales tomadas mediante el software Axiovision 3.0.6 de muestras de cortes uterinos de 5µm pertenecientes a hembras tratadas del día 3 al 7 de preñez con ghrelina (Ghr: 4 nmol/animal/día) y/o su antagonista (Ant: 6 nmol/animal/día). iNOS=óxido nítrico sintasa inducible. Magnificación 10X. Anticuerpo IgG policlonal anti iNOS (H-174) humana obtenida en conejo (Santa Cruz Biotechnology, Inc, sc8310) en una concentración de 1:200, se utilizó el sistema de detección ABC (Abidina-Biotina conjugada) Vectastin pk 6101- IgG de conejo. En la tabla se expresan las lecturas semicuantitativas de marcación inmunohistoquímica.

Cabe destacar, que al realizar la tinción de PAS (Figura 23) y ya que ésta es una tinción indirecta para células “natural killer” uterinas (uNK), observamos un aumento de estas células inmunológicas con predominio en el polo implantatorio, en aquellos úteros

pertenecientes a hembras tratadas con Ghr o el antagonista. En base a ello realizamos estudios iniciales con marcaciones específicas para macrófagos (CD 68) y linfocitos (CD 3), en los cuales observamos el mismo patrón (resultados no mostrados).

Estos resultados, si bien muy preliminares, abren nuevas perspectivas de estudio en cuanto al papel de Ghr intragestacional como modulador inmunológico de la preñez temprana.

4. DISCUSIÓN:

4a. EXPERIMENTOS *IN VITRO*:

Efectos de Ghr sobre la actividad funcional de los espermatozoides, su activación para la fertilización y sobre la fertilización en sí misma:

Como se mencionó en el capítulo de introducción, numerosos autores han informado sobre la síntesis de Ghr y sus receptores específicos (GHS-R1) en tejido gonadal de mamíferos (incluida la especie humana), tanto de machos como de hembras (11, 17, 23, 65). Asimismo, Gaytán y col. (21, 30), empleando técnicas inmunológicas, han reportado la presencia del GHS-R1 en ovocitos humanos, así como en células germinales de testículo de rata y humanos. La existencia de estos receptores en las gametas, en concordancia con la capacidad de sintetizar Ghr de los tejidos gonadales circundantes, sugiere que este péptido ejerce una regulación parácrina en el crecimiento y/o la maduración de las mismas. En base a estos antecedentes, en el presente trabajo se realizaron experimentos *in vitro* con el fin de evaluar los efectos de Ghr (10^{-7} y 10^{-9} M), con o sin la adición previa de un antagonista ((D-Lys₃)GHRP-6), sobre la calidad de las gametas, los eventos de activación de las mismas previos a la fertilización y la fertilización en sí misma.

Cuando incubamos espermatozoides epididimarios de ratón durante 3 min en presencia de Ghr (con o sin su antagonista), observamos una disminución significativa de la motilidad espermática con respecto al grupo control. La adición del antagonista solo, no modificó este parámetro. El hecho de que la co-incubación de Ghr con su antagonista no revirtiera el efecto deletéreo de Ghr sobre la motilidad, sugiere que la concentración del antagonista utilizada (10^{-5} M) no fue suficiente para contrarrestar dicho efecto. Se procedió por lo tanto a utilizar una concentración mayor de (D-Lys₃)GHRP-6 (10^{-4} M), tras lo cual observamos una atenuación del efecto deletéreo de Ghr. Luego de 40 min de incubación, ninguno de los tratamientos modificó la motilidad de los espermatozoides.

La capacidad de traslación del espermatozoide es adquirida a lo largo de su tránsito por el epidídimo (maduración epididimaria). Sin embargo, dentro del tracto reproductor masculino (en el epidídimo caudal), los espermatozoides se encuentran quiescentes y se “activan”, es decir exhiben su motilidad, en el plasma seminal o cuando son expuestos a un medio de incubación adecuado. Para que esta activación ocurra se requiere del aumento de

la concentración de Ca^{++} intracelular (vía proteína Gq, adenilato-ciclasa, AMPc) y la fosforilación de proteínas específicas del axonema que permiten la curvatura de la cola del espermatozoide. Una vez que las proteínas del axonema han sido fosforiladas, la síntesis de AMPc no es necesaria para que ocurra el movimiento flagelar y la sola presencia de ATP es suficiente para que esta motilidad se mantenga. Es por ello que una vez ocurrida la activación espermática, el Ca^{++} intracelular es secuestrado dentro de las organelas espermáticas (básicamente mitocondrias) y/o liberado hacia el medio extracelular mediante diversas bombas de Ca^{++} , manteniéndose así bajas concentraciones intracelulares libres de este catión (42, 43).

Por otro lado, se conoce que la activación de los GHS-R1a por Ghr provoca, al menos por uno de sus mecanismos de acción, un aumento intracelular de Ca^{++} (21, 54, 55, 89). Al respecto Falls y col. (54), trabajando en una línea celular derivada de hipófisis de rata que expresaba receptores para Ghr, detectaron que la adición *in vitro* de este péptido (en concentraciones finales de 10^{-4} a 10^{-12} M) aumentó significativamente las concentraciones intracelulares del catión. Este incremento era debido a la liberación del Ca^{++} almacenado en compartimientos intracelulares, seguido por un influjo extracelular del ión. Este efecto fue inhibido por el mismo antagonista de Ghr utilizado en nuestro trabajo y el efecto máximo de Ghr (con las concentraciones de 10^{-8} y 10^{-7} M) se observó entre el 1° y el 5° minuto de incubación.

Es posible que en el espermatozoide, una vez que el mismo ha adquirido motilidad, un aumento intracelular de Ca^{++} genere perturbaciones en la fisiología de la gameta que alteren esta propiedad. El hecho de que a los 40 min de incubación con Ghr no hayamos detectado efectos deletéreos sobre este parámetro, podría deberse a la ocurrencia de mecanismos compensadores por parte del espermatozoide, tales como el eflujo del Ca^{++} a través de diferentes bombas (ATPasa de Ca^{++} , antiportador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ y sistema de intercambio $\text{Ca}^{++}/\text{H}^+$) y/o el secuestro del mismo dentro de mitocondrias o por su unión a proteínas específicas (42). No se puede descartar sin embargo, una disminución en la actividad de Ghr o una acción de “down regulation” de receptores específicos en el plasmalema espermático. Este comportamiento de los receptores (GHS-R1a) fue observado por Camiña y col. (89), en un trabajo sobre células renales de embrión humano transfectadas con el receptor. En el mismo, los autores demostraron que existe una internalización de los GHS-R1a en vesículas después de la exposición durante 15 minutos

a Ghr marcada. No obstante, estas hipótesis deberán ser puestas a prueba en futuros ensayos.

Resultados similares a los detectados en este trabajo, fueron informados previamente por nuestro equipo. En dichos experimentos se utilizó un análogo de Ghr, hexarelina, el cual fue adicionado al medio de incubación en concentraciones equivalentes a las empleadas en este estudio. El análogo provocó una disminución inmediata (3 min de incubación) y significativa en la motilidad espermática, pero este efecto desapareció a los 20 min de incubación (56). Asimismo la concentración de 10^{-9} M ejerció efectos más marcados (significativos) que la de 10^{-7} M.

Con respecto a la vitalidad espermática, ninguno de los tratamientos ni lapsos de incubación (3 o 40 min) analizados modificó significativamente esta variable. En cuanto a la reacción acrosomal espontánea, observamos que la menor concentración del péptido (Ghr $^{-9}$ M), con o sin la co-incubación del antagonista (10^{-5} M), aumentó el porcentaje de espermatozoides reaccionados. Nuevamente, cuando se co-incubó Ghr con la mayor dosis del antagonista (10^{-4} M), el incremento en la reacción acrosomal se vio atenuado. Considerando que la reacción acrosomal es un evento Ca^{++} dependiente, puede postularse que modificaciones en el influjo inmediato de este catión (3 min) en el espermatozoide, induzcan/favorezcan la reacción acrosomal espontánea.

Cuando se evaluó motilidad y vitalidad espermática luego de 120 min de incubación con Ghr (10^{-9} M ó 10^{-7} M) y/o (D-Lys3)GHRP-6, utilizando ahora la mayor dosis del antagonista (10^{-4} M), no se observaron diferencias significativas en estos parámetros. Si bien los porcentajes de motilidad encontrados luego de 2 h de incubación fueron menores a los correspondientes a los 3 o 40 min, es importante aclarar, que el patrón de motilidad observado en dichos espermatozoides, en todos los grupos experimentales, se correspondía mayoritariamente al de motilidad hiperactivada. El hecho de que no se observaran diferencias en los porcentajes de vitalidad de los espermatozoides entre los 3-40 min de incubación y los 120 min, sugieren que la disminución en los porcentajes de la motilidad a los 120 min se debe a la ocurrencia de hiperactivación y no, a una alteración en la calidad espermática.

Es conocido que cuando se incuban *in vitro* espermatozoides, luego de ocurrida la activación y un período de motilidad normal, sigue una etapa de quiescencia en la que se observa un patrón de aglutinación de estas gametas por la cabeza (roseta); este

comportamiento *in vitro* simula lo que ocurre *in vivo* en la zona del *istmus* del tracto genital femenino, donde los espermatozoides se encuentran en vías de capacitación. Finalizado este proceso, estas gametas exhiben una motilidad vigorosa (“hiperactivación”) que les permite desprenderse de las cilias del *istmus* y dirigirse hasta la ampolla para fertilizar a los ovocitos (42). Para la ocurrencia de la hiperactivación es condición necesaria que en los espermatozoides haya ocurrido la capacitación. Por lo tanto el patrón de motilidad observado en nuestros experimentos a los 120 min, sugiere que al menos una subpoblación de las gametas ha finalizado el período de capacitación. Estas observaciones concuerdan con lo informado por otros autores (47-49, 74).

En cuanto a los porcentajes de reacción acrosomal a los 120 min de incubación, no se evidenciaron diferencias entre los tratamientos. En cambio sí se produjo un aumento significativo, de alrededor del 40%, en el porcentaje de espermatozoides reaccionados (en todos los grupos experimentales) cuando se indujo este proceso con P₄. Esto concuerda con la bibliografía específica, ya que es conocido que este esteroide induce reacción acrosomal solo en espermatozoides capacitados (42). Estos resultados sugieren además, que los tratamientos *in vitro* aplicados en este estudio no modificaron la capacitación de los espermatozoides.

Dado que la fertilización es un fenómeno calcio-dependiente, la adición de Ghr al medio de cultivo podría afectarlo. Sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales, ninguno de los tratamientos modificó el porcentaje de ovocitos fertilizados (con o sin cúmulus), ni el de partenogénesis; de hecho estos porcentajes fueron similares a los observados habitualmente en nuestro laboratorio. Si bien un estudio reciente indica que la adición de Ghr al medio de cultivo acelera la maduración de los complejos cúmulus-ovocitos (90), el péptido no parece modificar la tasa de fertilización *in vitro* (91). Ya que la mayoría de los estudios relacionados han agregado el péptido al medio de incubación una vez que la fertilización ha ocurrido (70, 71, 90), resulta difícil realizar comparaciones razonablemente valederas.

Posiblemente, el efecto “efímero” de Ghr sobre la concentración intracelular de Ca⁺⁺ o la hipótesis de la desensibilización de los GHS-R1a, comentado en los experimentos con espermatozoides, puedan explicar esta ausencia de efectos. Esta posibilidad deberá ser puesta a prueba en futuros ensayos. Al presente, consideramos la posibilidad de evaluar, mediante la aplicación de una sonda fluorescente y mediante

citometría de flujo, la movilización de calcio en las gametas en respuesta a la adición inmediata o mediata de Ghr (92).

4b. EXPERIMENTOS IN VIVO:

Otro de los objetivos propuestos para el presente estudio fue explorar el papel fisiológico de Ghr sobre la gestación temprana, por medio de un modelo *in vivo* de administración exógena de Ghr o inhibición del péptido endógeno. La hipótesis de que el péptido podría afectar los procesos de fertilización, implantación y/o el desarrollo embrionario temprano, surgió a partir de evidencias obtenidas en otras líneas experimentales de nuestro laboratorio. En las mismas, el tratamiento crónico de hembras adultas con hexarelina durante 30 días previos a la cópula más los primeros 6 días de la preñez, provocó una disminución significativa en la relación embriones/cuerpos lúteos (“pérdida embrionaria”) con respecto a hembras tratadas con solución isotónica, sugiriendo un papel deletéreo del hexapéptido durante el primer tercio de la gestación (41, 93). Es por ello que postulamos que Ghr podría modular uno o más procesos gestacionales tempranos, incluyendo fertilización, desarrollo embrionario pre-implantatorio y/o la implantación. Los posibles efectos negativos de altas concentraciones de Ghr podrían explicarse porque el péptido funcionaría como una señal de escasez de nutrientes. Sin embargo, dado que durante la gestación aumentan los niveles fisiológicos de esta sustancia en todas las especies de mamíferos en las que ha sido estudiado (18, 57, 58), es de esperar que Ghr cumpla algún papel importante en el normal desarrollo de la preñez (y por lo tanto su disminución endógena, también podría tener consecuencias negativas). Es por esto que realizamos tres experimentos *in vivo* en los que tratamos a las hembras durante diferentes períodos (pre-gestacionales o gestacionales) a fin de esclarecer estos aspectos.

Como primera medida determinamos la dosis de Ghr a administrar a nuestros animales y para ello realizamos una curva dosis-respuesta Ghr-GH; mediante la misma determinamos que, a partir de 2 nmol/animal aumentan significativamente los niveles de GH plasmáticos (30 min después de la inyección).

Papel de Ghr en la fertilización *in vivo*:

Elegidas las dosis a inyectar, administramos a las hembras, desde una semana previa a la cópula y hasta confirmada la misma (período que cubre el proceso de

fertilización), Ghr (2 ó 4 nmol/animal/día) con o sin la co-administración de su antagonista ((D-Lys₃)-GHRP6; 6 nmol/animal/día). Determinamos así que ninguno de los tratamientos aplicados modificó el número de cuerpos lúteos o el tamaño y peso de la camada, cuando las hembras fueron sacrificadas en el día 18 de gestación; esto sugiere que los tratamientos no afectaron la tasa de ovulación. Sí se observaron modificaciones en el porcentaje de hembras que perdieron embriones y/o que presentaron atrofia fetal en cada tratamiento, así como en los porcentajes de pérdida o atrofia sufridos por cada hembra. Estos parámetros aumentaron, en todos los grupos experimentales (Ghr 2 nmol y 4 nmol, Ghr+antagonista y antagonista solo), entre 100 y 1405%, registrándose los valores más cercanos al control en el grupo Ghr+antagonista. Las diferencias mencionadas sin embargo, solo alcanzaron significancia estadística en el porcentaje de hembras con pérdida embrionaria del grupo Ghr 4 nmol y el porcentaje de hembras con atrofia fetal y porcentaje de atrofia fetal/hembra en el grupo antagonista.

De acuerdo a estos resultados, es razonable postular que existe una concentración de Ghr “ideal”, por encima o por debajo de la cual se observan efectos adversos. Asimismo, teniendo en cuenta el período de aplicación de los tratamientos, es posible que estos efectos deletéreos ocurran sobre la calidad de los ovocitos y/o sobre el proceso de fertilización en sí mismo, modificando de esta forma, a largo plazo, el desarrollo embrionario y/o la implantación, procesos que se reflejan en los parámetros anteriormente mencionados. En la actualidad nos encontramos diseñando experimentos que exploren estos aspectos.

Otra hipótesis a considerar, es que los desbalances en la concentración de Ghr modifiquen la secreción de P₄ por parte del cuerpo lúteo (94, 95). Respecto a este tema, ha sido informado que esta estructura ovárica secreta Ghr, especialmente en la fase lútea y que este péptido inhibe la actividad de la 3β-hidroxiesteroide-deshidrogenasa y, por lo tanto, de la secreción de P₄ (95). En concordancia con esto, en un trabajo clínico realizado en mujeres tratadas con procedimientos de fertilización asistida de alta complejidad, se informó que las concentraciones de Ghr plasmáticas y del fluido folicular se correlacionaban negativamente con los valores de P₄, con la tasa de división y el número de embriones viables al tercer día de desarrollo (94). Sin embargo, en un trabajo similar realizado entre nuestro laboratorio y el Centro Integral de Ginecología, Obstetricia y Reproducción de Córdoba (CIGOR), observamos que el aumento en los niveles plasmáticos de Ghr (vinculados a la obesidad) no se asociaban a las tasas de ovulación,

fertilización o implantación, ni a la calidad ovocitaria o embrionaria; tampoco presentaban asociación alguna con los niveles séricos de P₄ (96). Cabe destacar además, que tal como se detallará más adelante, los tratamientos con Ghr y/o el antagonista aplicados en este estudio no modificaron las concentraciones plasmáticas de P₄ en etapas más avanzadas de la gestación.

Papel de Ghr en el desarrollo embrionario temprano y la implantación:

Cuando los tratamientos se aplicaron desde la inducción farmacológica de la ovulación y hasta las 80 h de la misma, observamos que la administración del antagonista solo, disminuyó significativamente el índice de fertilización con respecto a los demás grupos (~10-25 %). Este parámetro fue calculado a partir de la relación embriones/ovocitos no fertilizados obtenidos del lavado uterino y oviductal al tercer día de gestación.

Por otro lado, observamos que todos los tratamientos (Ghr 2 ó 4 nmol, Ghr+antagonista y antagonista solo) retrasaron significativamente el desarrollo embrionario pre-implantatorio con respecto al control, lo que se vio reflejado en un aumento en el porcentaje de desarrollo hasta mórula en detrimento del porcentaje de blastocitos. Coincidentemente, en un estudio *in vitro* realizado por Kawamura y col. (69), observaron que Ghr disminuye significativamente la progresión de embriones de dos células a blastocistos y, que la co-incubación de Ghr con el mismo antagonista utilizado en nuestro trabajo revirtió estos efectos deletéreos. Asimismo, en un estudio reciente realizado por Wang y col. (91), en el cual estudiaron los efectos *in vitro* de diferentes dosis de Ghr sobre la maduración de ovocitos ovinos y el desarrollo embrionario, determinaron que la menor dosis de Ghr (50 ng/ml) aumentó las tasas de blastocistos y el número total de células por blastocisto, mientras que una dosis más alta de este péptido (250 ng/ml) disminuyó estos parámetros. En este trabajo los autores sugieren que existe una concentración “adecuada” de Ghr que promueve la formación a blastocisto.

Esto es consistente con los resultados obtenidos en nuestro estudio, en el que no solo la adición de Ghr, sino también la de su antagonista, retrasaron el desarrollo embrionario. Hasta donde sabemos, nuestro estudio es el primero que evalúa los efectos *in vivo* de la administración de Ghr y/o su antagonista en el desarrollo de los embriones.

Es importante remarcar que nuestros resultados fueron obtenidos a partir de hembras inducidas farmacológicamente a superovular. Al respecto, se ha informado que la inducción de la ovulación puede alterar la calidad de los ovocitos y por consiguiente el

desarrollo embrionario temprano (97). Es por ello que los efectos “reales” de Ghr y/o el antagonista durante el desarrollo embrionario temprano en hembras con ovulación natural aún se desconocen. En la actualidad nos encontramos desarrollando nuevos estudios con el fin de elucidar estos aspectos.

Para estudiar una etapa posterior del proceso reproductivo, aplicamos Ghr y/o el antagonista durante la ventana peri-implantatoria (día 3 al 7 de gestación). Observamos que los tratamientos aplicados no modificaron significativamente el número de cuerpos lúteos ni el tamaño de la camada (aunque este último parámetro fue menor en el grupo Ghr 4 nmol). Sí se registró una disminución significativa en el peso de la camada completa de las hembras tratadas con Ghr 4 nmol vs el control y en el peso inicial de cada feto (viable) con las dos dosis de Ghr ensayadas y con el antagonista solo, con respecto al control. El grupo Ghr+antagonista presentó valores similares al control. Esta disminución del peso corporal inicial de las crías podría explicar la reducción en la ganancia de peso corporal durante la gestación que se observa en las hembras tratadas con la mayor dosis de Ghr y el antagonista solo (en días 7, 14 y/o 18), ya que esta diferencia de ganancia de peso desaparece cuando se considera el peso corporal de la hembra excluyendo los fetos, al día 18.

Asimismo, estos tratamientos incrementaron los porcentajes de pérdida embrionaria y atrofia fetal. Concretamente, la mayor dosis de Ghr, Ghr+antagonista y el antagonista aumentaron en forma significativa los porcentajes de hembras que presentaron algún grado de pérdida embrionaria o de atrofia fetal. Cabe destacar que si bien la co-administración de Ghr con el antagonista no logró disminuir los porcentajes de hembras que presentaron algún grado de pérdida embrionaria, sí disminuyeron los porcentajes de pérdida de cada hembra.

Se ha propuesto a Ghr como una de las múltiples señales que intervienen en el diálogo entre el trofoblasto y el endometrio (19, 98). Tanaka y col. (19), sugirieron que la Ghr podría estar implicada en la receptividad del endometrio y en el desarrollo del embrión pre-implantatorio, actuando como un factor parácrino/autócrino regulador de dichos procesos. Estos autores realizaron un análisis inmunohistoquímico demostrando que la mayor marcación para el péptido se encontró en células trofoblásticas extravelosas (citotrofoblasto), que constituyen la frontera de invasión al endometrio materno (19).

Además, informaron que la adición de Ghr al medio de cultivo estimula la deciduización de células endometriales humanas obtenidas en fase lútea (19).

Del mismo modo, otros autores han informado que el cultivo *in vitro* de células de placenta JEG-3 con Ghr (100-1000 pg/ml), durante 48 h, estimuló significativamente la proliferación celular y disminuyó la apoptosis (95). Estas evidencias son consistentes con un aumento dramático en la expresión del ARNm para Ghr en el endometrio durante el embarazo temprano y con la expresión endometrial de los GHS-R1a durante todo el ciclo menstrual normal y la preñez temprana (19).

Por otro lado, se ha informado que Ghr puede atravesar fácilmente la placenta hacia la circulación fetal y el líquido amniótico y que la misma podría funcionar como una señal que indica al organismo acerca de la escasez de nutrientes, regulando de este modo la continuación de la preñez (18). De hecho, es conocido que altas concentraciones séricas de este péptido, secundarias a la hiponutrición, ejercen efectos inhibitorios sobre la gestación (1, 3, 18). En nuestro laboratorio hemos comprobado además, que la hiperghrelinemia crónica o aguda producto de la restricción alimentaria/ayuno o de la administración exógena del péptido, inhibe la conducta sexual de las hembras de ratón (37); el valor adaptativo de este comportamiento es probablemente evitar una preñez en situaciones nutricionales adversas.

Todas estas evidencias refuerzan la hipótesis de que determinados niveles de Ghr intragestacionales son necesarios para que la implantación/gestación temprana transcurran normalmente; sin embargo, altas concentraciones del péptido, compatibles con la restricción alimentaria y/o el ayuno, ejercen efectos deletéreos.

Evaluación histológica y de la expresión inmunohistoquímica para NOS en úteros de hembras tratadas con Ghr y/o su antagonista. Cuantificación de la concentración de P₄ plasmática:

En cuanto a las bases fisiopatológicas que explican el efecto negativo de los desbalances de Ghr durante el período peri-implantatorio, es muy poco lo que se conoce. Es por ello que agregamos un cuarto objetivo mediante el cual intentamos profundizar en estos aspectos. En primera instancia, evaluamos los niveles sistémicos de P₄ en nuestras hembras tratadas (al 8° día de gestación). La racionalidad de este dosaje se basa en que P₄ participa, entre otros procesos, en la deciduización endometrial, la nutrición trofoblástica temprana y la inmunomodulación materna, con lo cual induce tolerancia al aloinjerto fetal

(99, 100). Sin embargo, no detectamos diferencias en los niveles plasmáticos de este esteroide en ninguno de los grupos experimentales.

Estudios exploratorios acerca de la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal frente a la administración exógena de Ghr o la adición de la misma al medio de cultivo, desarrollados en hembras no gestantes de diferentes especies (incluyendo la humana), registraron una disminución significativa en la secreción de este esteroide. El mecanismo subyacente a estos efectos se atribuye a una inhibición directa de la actividad de diversas enzimas esteroideogénicas que responden a gonadotrofinas (94, 95, 101-103). Por el contrario, Sirotkin y col. (104) demostraron en hembras de conejo, que Ghr no modifica significativamente la secreción de P₄ plasmática el día de la ovulación, luego de un tratamiento continuo con el péptido (10 µg/animal/día) durante la semana previa a la misma. Cabe destacar sin embargo, que todas estas evidencias fueron obtenidas en modelos animales no gestantes, en los que un aumento en la concentración sérica de Ghr se asocia a restricción calórica (34). En nuestro estudio por el contrario, se emplearon hembras gestantes, en las que el aumento de la Ghr plasmática constituye un estímulo fisiológico necesario para la normal progresión de la preñez. Solo hemos detectado un estudio (*in vitro*) que explora los efectos de Ghr sobre la secreción de P₄ durante la gestación, el de Rak-Mardyła y col. (95); estos autores describen que la adición de Ghr (100, 250, 500, 1000 pg/ml) a cultivos de células placentarias humanas disminuyó la secreción de P₄. Resta por evaluar si este efecto se repite *in vivo*.

Mediante el estudio histológico de los úteros de hembras tratadas desde el día 3 al 7 de preñez con Ghr (4 nmol) y/o su antagonista, observamos que las hembras tratadas con (D-Lys₃)GHRP-6 presentaron un aumento significativo en el número de resorciones y un mayor porcentaje de embriones atrofiados que el grupo control. Los animales tratados con Ghr mostraron un perfil similar, aunque las diferencias no alcanzaron valores estadísticamente significativos. Estos resultados, aparentan ser solo en parte compatibles con los obtenidos en nuestro estudio inicial (objetivo 3b), en el cual los efectos inhibitorios de Ghr alcanzaban valores de *p* con significancia estadística. Es probable que exista una diferencia temporal entre los efectos de Ghr y del antagonista; es decir, que el antagonista ejerza sus efectos deletéreos en forma previa a Ghr. Esto podría explicar el por qué, a los 18 de días de gestación, los efectos de Ghr son evidentes mientras que al octavo día, son todavía una tendencia. Apoya este postulado una observación adicional: los úteros de las

hembras tratadas con el antagonista al 8° día de gestación presentaban una mayor frecuencia de resorciones tempranas que en los demás grupos, mientras que las resorciones del grupo Ghr eran predominantemente tardías.

Observamos asimismo, que si bien el área de implantación en el tratamiento con antagonista era un 25% menor (aunque no significativo) que en los demás grupos, esta diferencia se debía a que el área uterina total también era menor; es por esto que el porcentaje del útero ocupado por el área de implantación no presenta diferencias importantes entre los grupos.

Por otro lado, teniendo en cuenta la importancia del NO en el desarrollo y funcionamiento placentario y que, Ghr estimula la actividad de la NOS, el aumento o la inhibición endógena del péptido podría a través de variaciones en la síntesis de NO provocar modificaciones en la implantación (67, 105). Específicamente, se conoce que la actividad NOS aumenta durante el período peri-implantatorio y que su producto, el NO, se encuentra vinculado no solo a la regulación de la angiogénesis, sino también, a la embriogénesis y a la relajación del músculo liso uterino (68).

Luego de un análisis semicuantitativo de la inmunohistoquímica para la actividad eNOS e iNOS uterina, pudimos determinar que, los úteros de hembras tratadas con Ghr, presentaron mayor marcación que los de las hembras controles. Asimismo, el tratamiento con antagonista también mostró una marcación mayor que el control. El tratamiento Ghr+antagonista exhibió marcaciones similares al control.

Es notable que los grupos experimentales que mostraron alteraciones en el proceso implantatorio sean, justamente, aquellos que presentan la mayor marcación para eNOS e iNOS, teniendo en cuenta la ya mencionada importancia del NO en este proceso. No obstante, también se conoce que un exceso en la síntesis de NO puede ejercer efectos tisulares deletéreos mediante un aumento en la concentración de radicales libres (106). La producción de anión superóxido y NO ha sido asociada al desarrollo de muchas patologías durante el embarazo, ya que la interacción de estas dos moléculas genera el ión peroxinitrito, que constituye un importante agente oxidante con efectos deletéreos sobre la barrera placentaria (107, 108). Resta por explorar por lo tanto si los efectos negativos de Ghr o el antagonista sobre la implantación se asocian a un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, secundario al incremento en la concentración de NO.

Otro hallazgo a destacar, es que mediante la evaluación histológica de los úteros de hembras tratadas con Ghr y/o el antagonista en el período peri-implantatorio, detectamos que fundamentalmente en el polo embrionario, se observaba una importante cantidad de células vacuoladas. Este fenómeno era particularmente intenso en los úteros de hembras tratadas con antagonista o Ghr. Con el fin de determinar, si el contenido de estas vacuolas era glucógeno, se realizó una tinción con PAS; pudimos determinar que solo algunas de ellas eran PAS positivas.

Dado que esta tinción es utilizada para la marcación indirecta de células uNK (que predominan normalmente en el polo implantatorio) (109, 110), observamos mayor marcación para éstas en los tejidos de hembras tratadas con Ghr y con antagonista. Esta observación resulta interesante puesto que estudios recientes han informado que la tolerancia inmunológica materna al embrión, es producto de una serie de mecanismos que incluyen, entre otros, la inhibición de la respuesta citotóxica de las uNK. Estas células inmunocompetentes, tal como ocurre con las células T helper, presentan diferentes fenotipos; de acuerdo a ellos, los efectos predominantes son los citotóxicos o los inflamatorios. Estos últimos resultan beneficiosos para la implantación. Se ha informado por ejemplo, que las uNK sintetizan interleuquina 18 y otras citoquinas que, al unirse a receptores específicos expresados por células del trofoblasto, promueven su invasión y la formación de las arterias espirales. Las uNK además, sintetizan factores angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial y el factor de crecimiento placentario (110) y poseen receptores que reconocen moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad del citotrofoblasto (HLA-G); su reconocimiento inhibe la citotoxicidad de las uNK (111).

Llama la atención sin embargo, que los tratamientos en los que se evidencia mayor densidad de uNK son justamente aquéllos en los que la implantación está alterada. Sería importante evaluar en dichas muestras, mediante marcadores específicos, si esas uNK pertenecen al fenotipo que favorece la implantación ($CD\ 56^{bright}/CD16^{dim}$) o al que presenta mayor actividad citotóxica ($CD\ 56^{dim}/CD16^{bright}$) (109, 112).

En base a estos resultados, decidimos continuar con un estudio exploratorio mediante el cual evaluáramos el patrón de marcación para macrófagos (CD 68) o linfocitos (CD 3) en estos mismos tejidos. Observamos que tal como ocurría para las uNK, los úteros de hembras tratadas con Ghr o con el antagonista presentaban mayor marcación para estos dos tipos de células inmunológicas. Al igual que para las uNK, será necesario determinar el fenotipo (citotóxico o inflamatorio) de estos linfocitos. Si bien estos resultados exceden a

los objetivos de esta Tesis, sugieren que la Ghr intragestacional podría tener un efecto modulador de la inmunidad materna y/o la interfase materno-fetal y abren nuevas líneas de investigación. De hecho, existen numerosos estudios que postulan firmemente a Ghr como una sustancia que inhibe la respuesta inflamatoria en diversos modelos experimentales (113, 114); no hemos encontrado hasta el presente bibliografía específica respecto al período peri-implantatorio.

En resumen, los resultados detectados en este Trabajo de Tesis sugieren que no solo las altas concentraciones de Ghr secundarias a la hiponutrición ejercen acciones inhibitorias sobre la fertilización *in vivo* y la gestación temprana (desarrollo embrionario pre-implantatorio e implantación), sino también, que la inhibición de los niveles endógenos del péptido ejercen efectos negativos. *A priori* tales efectos no parecen ser atribuibles a alteraciones en la calidad o funcionalidad de las gametas, tal como se evidencia en los experimentos *in vitro*. Es aparente por lo tanto que existiría una concentración intragestacional “ideal” de Ghr, por encima o por debajo de la cual se observan efectos deletéreos.

A partir de este estudio no podemos descartar que los efectos negativos observados en las hembras tratadas con el antagonista solo, se deban a acciones deletéreas de este péptido *per se*. Sin embargo, consideramos a esta hipótesis poco probable ya que: a) la dosis de (D-Lys₃)GHRP-6 empleada en estos ensayos es sustancialmente menor a las utilizadas por otros autores (100 nmol/animal/día) en tratamientos crónicos, quienes no informan efectos deletéreos (95); b) en los experimentos *in vitro* realizados en este Trabajo de Tesis el antagonista no ejerció efectos adversos directos sobre la calidad de las gametas y c) en estudios realizados previamente en nuestro laboratorio, en los que se administraron en forma aguda o crónica estas mismas dosis de antagonista a hembras de esta misma cepa, no detectamos efecto nocivo alguno (37). Comprobamos en cambio, que esta dosis del (D-Lys₃)GHRP-6 es capaz de contrarrestar los efectos adversos de la hiperghrelinemia, ya sea inducida por restricción calórica o por inyección exógena, sobre la receptividad sexual (37). Es por esto que consideramos que en este estudio, los resultados *in vivo* encontrados en las hembras tratadas con el antagonista, son atribuibles a una inhibición de la Ghr endógena (cuyos niveles aumentan durante la gestación) y no por efectos del antagonista *per se*.

Finalmente cabe destacar, que este estudio abre líneas de investigación atractivas y relevantes que contribuirán al esclarecimiento del papel de la Ghr en la reproducción de mamíferos.

4c. CONCLUSIONES:

A partir de los resultados discutidos anteriormente, es posible inferir que:

EXPERIMENTOS IN VITRO:

- ✚ La aplicación *in vitro* de Ghr, con o sin su antagonista, disminuyó significativamente la motilidad espermática y aumentó la reacción acrosomal espontánea a los 3 min de incubación; este efecto probablemente sea adjudicable a modificaciones en la concentración intracelular de Ca^{++} . Este perfil no se observó a los 40 o 120 min de incubación, posiblemente debido a la puesta en marcha de mecanismos compensadores (internalización de GHS-R y/o eflujo del calcio).
- ✚ El patrón de motilidad hiperactivada y la respuesta a P_4 observada en todos los tratamientos a los 120 min de incubación, sugieren que el fenómeno de capacitación espermática ocurrió sin diferencias entre los grupos.
- ✚ Bajo nuestras condiciones experimentales, ninguno de los tratamientos alteraron las tasas de fertilización *in vitro* de ovocitos homólogos (con o sin cúmulus) ni ejercieron modificaciones en los porcentajes de partenogénesis.

EXPERIMENTOS IN VIVO:

- ✚ La administración *in vivo* de Ghr, con o sin su antagonista, desde una semana previa a la cópula y hasta confirmada la misma, aumentó el porcentaje de hembras que presentaron pérdida embrionaria, alcanzando significancia estadística solo con la mayor dosis de Ghr. Cuando analizamos la atrofia fetal observamos este mismo patrón; sin embargo, ésta alcanzó diferencias significativas con respecto al control solo en el grupo antagonista. Como era de esperar, la co-administración de ambas sustancias (Ghr+antagonista) suavizó estos efectos deletéreos, acercando los valores al control.

Teniendo en cuenta el período de aplicación de estos tratamientos es posible que los efectos negativos de los mismos se expliquen por alteraciones en la calidad de los ovocitos y/o en el proceso de fertilización en sí mismo.

- ✚ En cuanto al efecto de Ghr, con o sin la co-administración de su antagonista, sobre la fertilización y el desarrollo embrionario temprano (tratando a las hembras desde la inducción de ovulación hasta las 80 h de la misma), determinamos que el antagonista disminuyó significativamente el porcentaje de fertilización con respecto al control. Asimismo, todos los tratamientos aplicados retrasaron significativamente el desarrollo embrionario.
- ✚ Cuando se evaluó el efecto de los tratamientos sobre el período peri-implantatorio (días 3 a 7 de gestación), observamos que éstos modificaron el peso fetal: la mayor dosis de Ghr disminuyó el peso de la camada completa al día 18 y, ambas dosis de Ghr y el antagonista, disminuyeron significativamente el peso inicial de cada feto con respecto al control.
- ✚ La ganancia de peso durante la gestación de las hembras tratadas con Ghr (4 nmol) o el antagonista fue significativamente menor que la de las hembras controles (a los días 7, 14 y/o 18 de gestación). Sin embargo ya que el peso de las madres sin sus fetos (al día 18 de gestación) no mostró diferencias entre los tratamientos, es posible que el menor peso inicial de los fetos de Ghr o antagonista expliquen estos resultados. Nuevamente el tratamiento con ambas sustancias (Ghr+antagonista) suavizó significativamente estos efectos.
- ✚ Los tres tratamientos aplicados aumentaron el porcentaje de hembras con pérdida embrionaria y/o atrofia fetal. No obstante, no se presentaron diferencias significativas en el grado de pérdida embrionaria o atrofia que presentaba cada hembra.
- ✚ Los estudios histológicos de los úteros en el día 8 de gestación, corroboran estos hallazgos. Sin embargo, sugieren que los efectos negativos del antagonista ocurren en forma más temprana que los de Ghr.
- ✚ Asimismo, estos efectos negativos no parecen explicarse por alteraciones en los niveles de P_4 , ya que los tratamientos peri-implantatorios con Ghr y/o el antagonista no modificaron las concentraciones plasmáticas de este esteroide.
- ✚ No solo el tratamiento peri-implantatorio con Ghr sino también con el antagonista, aumentaron la inmunomarcación uterina para eNOS e iNOS. Dado que el NO es fundamental para el desarrollo y la función placentaria, resulta llamativo que esta respuesta haya sido mayor justamente en los tratamientos en que se observaban alteraciones en la implantación. Resta por evaluar si este aumento en la eNOS/iNOS se

traduce en un incremento de las especies reactivas del oxígeno y, consecuentemente, de estrés oxidativo tisular.

- ✚ Como un hallazgo casual, observamos que tanto en las hembras tratadas con Ghr como en las inyectadas con antagonista, aumentaba la densidad de células uNK en el sitio implantatorio. Un perfil similar se observó para otras células inmunológicas (linfocitos y macrófagos). Resta por dilucidar si el fenotipo predominante de estas células es el inflamatorio o el citotóxico.

En resumen, es aparente que los desbalances en las concentraciones fisiológicas intragestacionales de Ghr son capaces de alterar la gestación temprana, otorgando al péptido un papel fundamental en el normal desarrollo de la preñez. Algunas evidencias iniciales apuntan al NO y a la respuesta inmunológica materna como posibles causas de estas alteraciones.

5. BIBLIOGRAFÍA:

1. Wade GN. Energy balance: effects on reproduction. *Encyclopedia of Reproduction* Academic Press, San Diego, CA. 1998:1091-100.
2. Mircea CN, Lujan ME, Pierson RA. Metabolic fuel and clinical implications for female reproduction. *JOGC-TORONTO*. 2007;29(11):887.
3. Schneider JE. Energy balance and reproduction. *Physiol Behav*. 2004;81(2):289-317.
4. Cameron JL. Nutritional determinants of puberty. *Nutr Rev*. 1996;54(s1):S17-S22.
5. Remer T, Manz F. Role of Nutritional Status in the Regulation of Adrenarche 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1999;84(11):3936-44.
6. Castellano J, Roa J, Luque R, Dieguez C, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M. Kiss-1/kisspeptins and the metabolic control of reproduction: physiologic roles and putative physiopathological implications. *Peptides*. 2009;30(1):139-45.
7. Léonhardt M, Lesage J, Croix D, Dutriez-Casteloot I, Beauvillain JC, Dupouy JP. Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis and plasma leptin level in rat pup at birth and weaning and on timing of puberty. *Biol Reprod*. 2003;68(2):390-400.
8. Young KA, Zirkin BR, Nelson RJ. Testicular regression in response to food restriction and short photoperiod in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) is mediated by apoptosis. *Biol Reprod*. 2000;62(2):347-54.
9. Schneider JE, Wade GN. Decreased availability of metabolic fuels induces anestrus in golden hamsters. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 1990;258(3):R750-R5.
10. Ariyasu H, Takaya K, Hosoda H, Iwakura H, Ebihara K, Mori K, Ogawara Y, Hosoda K, Akamizu T, Kojima M. Delayed short-term secretory regulation of ghrelin in obese animals: evidenced by a specific RIA for the active form of ghrelin. *Endocrinology*. 2002;143(9):3341-50.
11. Barreiro M, Tena-Sempere M. Ghrelin and reproduction: a novel signal linking energy status and fertility? *Mol Cell Endocrinol*. 2004;226(1):1-9.
12. Tena-Sempere M. Ghrelin: novel regulator of gonadal function. *J Endocrinol Invest*. 2004;28(5 Suppl):26-9.

13. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999;402(6762):656-60.
14. Ghigo E, Broglio F, Arvat E, Maccario M, Papotti M, Muccioli G. Ghrelin: more than a natural GH secretagogue and/or an orexigenic factor. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005;62(1):1-17.
15. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev*. 2005;85(2):495-522.
16. De Ambrogi M, Volpe S, Tamanini C. Ghrelin: central and peripheral effects of a novel peptidyl hormone. *Medical Science Review*. 2003;9(9):RA217-RA24.
17. García MC, Lopez M, Alvarez CV, Casanueva F, Tena-Sempere M, Diéguez C. Role of ghrelin in reproduction. *Reproduction*. 2007;133(3):531-40.
18. Nakahara K, Nakagawa M, Baba Y, Sato M, Toshinai K, Date Y, Nakazato M, Kojima M, Miyazato M, Kaiya H. Maternal ghrelin plays an important role in rat fetal development during pregnancy. *Endocrinology*. 2006;147(3):1333-42.
19. Tanaka K, Minoura H, Isobe T, Yonaha H, Kawato H, Wang DF, yoshida T, Kojima M, Kangawa K, Toyoda N. Ghrelin is involved in the decidualization of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(5):2335-40.
20. Meier U, Gressner AM. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem*. 2004;50(9):1511-25.
21. Gaytan F, Barreiro ML, Chopin LK, Herington AC, Morales C, Pinilla L, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C, Tena-Sempere M. Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(2):879-87.
22. Halem HA, Taylor JE, Dong JZ, Shen Y, Datta R, Abizaid A, Dianos S, Horavath T, zizzari P, Bluet-Pajot M. Novel analogs of ghrelin: physiological and clinical implications. *European Journal of Endocrinology*. 2004;151(Suppl 1):S71-S5.
23. Gaytan F, Barreiro ML, Caminos JE, Chopin LK, Herington AC, Morales C, Pinilla L, Paniagua R, Nistal M, Casanueva FF. Expression of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in normal human testis and testicular tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(1):400-9.

24. Metz G, Schwab M. Behavioral characterization in a comprehensive mouse test battery reveals motor and sensory impairments in growth-associated protein-43 null mutant mice. *Neuroscience*. 2004;129(3):563-74.
25. Muccioli G, Baragli A, Granata R, Papotti M, Ghigo E. Heterogeneity of ghrelin/growth hormone secretagogue receptors. Toward the understanding of the molecular identity of novel ghrelin/GHS receptors. *Neuroendocrinology*. 2006;86(3):147-64.
26. Rak A, Szczepankiewicz D, Gregoraszczyk EŁ. Expression of ghrelin receptor, GHSR-1a, and its functional role in the porcine ovarian follicles. *Growth Horm IGF Res*. 2009;19(1):68-76.
27. Mendez-Sanchez N, Chavez-Tapia N, Uribe-Esquivel M. Ghrelin and the gastro-hypothalamic axis. *Gac Med Mex*. 2006;142(1):49.
28. Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. Ghrelin and the regulation of food intake and energy balance. *Mol Interventions*. 2002;2(8):494.
29. Barreiro M, Gaytan F, Caminos J, Pinilla L, Casanueva F, Aguilar E, Dieguez C, Tena-Sempere M. Cellular location and hormonal regulation of ghrelin expression in rat testis. *Biol Reprod*. 2002;67(6):1768-76.
30. Barreiro M, Suominen J, Gaytan F, Pinilla L, Chopin L, Casanueva F, Dieguez C, Aguilar E, Toppari J, Tena-Sempere M. Developmental, stage-specific, and hormonally regulated expression of growth hormone secretagogue receptor messenger RNA in rat testis. *Biol Reprod*. 2003;68(5):1631-40.
31. Caminos J, Tena-Sempere M, Gaytan F, Sanchez-Criado J, Barreiro M, Nogueiras R, Casanuevas FF, Aguilar E, Dieguez C. Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology*. 2003;144(4):1594-602.
32. Gaytan F, Barreiro ML, Caminos JE, Chopin LK, Herington AC, Morales C, Pinilla L, Paniagua R, Nistal M, Casanueva FF. Expression of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in normal human testis and testicular tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(1):400-9.
33. Gaytan F, Morales C, Barreiro M, Jeffery P, Chopin L, Herington A, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C, Tena-Sempere M. Expression of growth hormone secretagogue receptor type 1a, the functional ghrelin receptor, in human ovarian surface epithelium, mullerian duct derivatives, and ovarian tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(3):1798-804.

34. Fernandez-Fernandez R, Navarro V, Barreiro M, Vigo E, Tovar S, Sirotkin A, Sirotkin A, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L. Effects of chronic hyperghrelinemia on puberty onset and pregnancy outcome in the rat. *Endocrinology*. 2005;146(7):3018-25.
35. Fernández-Fernández R, Tena-Sempere M, Aguilar E, Pinilla L. Ghrelin effects on gonadotropin secretion in male and female rats. *Neurosci Lett*. 2004;362(2):103-7.
36. Martini A, Fernandez-Fernandez R, Tovar S, Navarro V, Vigo E, Vazquez M, Davies JS, Thompson NM, Aguilar E, Pinilla L. Comparative analysis of the effects of ghrelin and unacylated ghrelin on luteinizing hormone secretion in male rats. *Endocrinology*. 2006;147(5):2374-82.
37. Bertoldi M, Luque E, Carlini V, Vincenti L, Stutz G, Santillan M, Ruiz RD, Fiol de Cuneo M, Martini AC. Inhibitory effects of ghrelin on sexual behavior: role of the peptide in the receptivity reduction induced by food restriction in mice. *Horm Metab Res*. 2011;43(7):494-9.
38. Wade GN, Schneider JE, Li H. Control of fertility by metabolic cues. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. 1996;270(1):E1-E19.
39. Muccioli G, Lorenzi T, Lorenzi M, Ghè C, Arnoletti E, Raso GM, Castellucci M, Gualillo O, Meli R. Beyond the metabolic role of ghrelin: a new player in the regulation of reproductive function. *Peptides*. 2011;32(12):2514-21.
40. Luque EM TP, de Loredó N, Vincenti LM, Fiol de Cuneo M y Martini AC. Papel de ghrelina intragestacional en el desarrollo posnatal y la función reproductiva de ratones: ¿otro ejemplo de programación fetal?. *Physiological mini-reviews*. 2014;7:33.
41. Puechagut P, Martini A, Stutz G, Santillan M, Luque E, Fiol de Cuneo M, Ruiz RD, Vincenti LM. Reproductive performance and fertility in male and female adult mice chronically treated with hexarelin. *Reprod Fertil Dev*. 2012;24(3):451-60.
42. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. *The physiology of reproduction*. 1994;1:189-317.
43. Florman HM, Ducibella T. Fertilization in mammals. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 2006;3:55-112.
44. Abou-Haila A, Tulsiani DR. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch Biochem Biophys*. 2000;379(2):173-82.
45. Abou-haila A, Tulsiani DR. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Arch Biochem Biophys*. 2009;485(1):72-81.

46. Austin C. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust J Biol Sci.* 1951;4(4):581-96.
47. Toyoda Y. Studies on fertilization of mouse eggs in vitro. I. In vitro fertilization of eggs by fresh epididymal sperm. *Jpn J Anim Reprod.* 1971;16:147-51.
48. Yanagimachi R. In vitro acrosome reaction and capacitation of golden hamster spermatozoa by bovine follicular fluid and its fractions. *J Exp Zool.* 1969;170(3):269-80.
49. Niwa K, Chang M. Optimal sperm concentration and minimal number of spermatozoa for fertilization in vitro of rat eggs. *J Reprod Fertil.* 1974;40(2):471-4.
50. Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development.* 1995;121(4):1129-37.
51. Corselli J, Talbot P. In vitro penetration of hamster oocyte-cumulus complexes using physiological numbers of sperm. *Dev Biol.* 1987;122(1):227-42.
52. Hernández A, Treviño C, Félix R. Canales iónicos y su papel funcional en el espermatozoide. *Avance y Perspectiva.* 2002;21:89-95.
53. Smith G, Roberts R, Hall C, Nuki G. Reversible ovulatory failure associated with the development of luteinized unruptured follicles in women with inflammatory arthritis taking non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Rheumatology.* 1996;35(5):458-62.
54. Falls HD, Dayton BD, Fry DG, Ogiela CA, Schaefer VG, Brodjian S, Reilly RM, Collins CA, Kaszubska W. Characterization of ghrelin receptor activity in a rat pituitary cell line RC-4B/C. *J Mol Endocrinol.* 2006;37(1):51-62.
55. Camiña JP, Lodeiro M, Ischenko O, Martini AC, Casanueva FF. Stimulation by ghrelin of p42/p44 mitogen-activated protein kinase through the GHS-R1a receptor: Role of G-proteins and β -arrestins. *J Cell Physiol.* 2007;213(1):187-200.
56. Luque EM BM, Vincenti LM, Desimone MF, Ruiz RD, Fiol de Cuneo M y Martini AC. In vitro effects of ghrelin and hexarelin on mouse sperm functional activity. *Revista de la Facultad de Cs Médicas* 2010;67:61.
57. Steculorum SM, Bouret SG. Developmental effects of ghrelin. *Peptides.* 2011;32(11):2362-6.
58. Shibata K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Makino Y, Makino I, Kawarabayashi T, Futagami K, Gomita Y. Regulation of ghrelin secretion during pregnancy and

- lactation in the rat: possible involvement of hypothalamus. *Peptides*. 2004;25(2):279-87.
59. Govoni N, Parmeggiani A, Galeati G, Penazzi P, De Iasio R, Pagotto U, Pasquali R, Tamanini C, Seren E. Acyl ghrelin and metabolic hormones in pregnant and lactating sows. *Reproduction in domestic animals*. 2007;42(1):39-43.
60. Gualillo O, Caminos JE, Blanco M, Garcia-Caballero T, Kojima M, Kangawa K, Dieguez C, Casanueva FF. Ghrelin, A Novel Placental-Derived Hormone 1. *Endocrinology*. 2001;142(2):788-94.
61. Fuglsang J, Skjaerbaek C, Espelund U, Frystyk J, Fisker S, Flyvbjerg A, Ovesen P. Ghrelin and its relationship to growth hormones during normal pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005;62(5):554-9.
62. Palik E, Baranyi E, Melczer Z, Audikovszky M, Szöcs A, Winkler G, Cseh K. Elevated serum acylated (biologically active) ghrelin and resistin levels associate with pregnancy-induced weight gain and insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007;76(3):351-7.
63. Harrison JL, Adam CL, Brown YA, Wallace JM, Aitken RP, Lea RG, Miller D. An immunohistochemical study of the localization and developmental expression of ghrelin and its functional receptor in the ovine placenta. *Reprod Biol Endocrinol*. 2007;5:25.
64. Chanoine J-P, Wong AC, Barrios V. Obestatin, acylated and total ghrelin concentrations in the perinatal rat pancreas. *Horm Res Paediatr*. 2006;66(2):81-8.
65. Gaytan F, Morales C, Barreiro ML, Jeffery P, Chopin LK, Herington AC, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C, Tena-Sempere M. Expression of growth hormone secretagogue receptor type 1a, the functional ghrelin receptor, in human ovarian surface epithelium, mullerian duct derivatives, and ovarian tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(3):1798-804.
66. Inoue Y, Nakahara K, Kangawa K, Murakami N. Transitional change in rat fetal cell proliferation in response to ghrelin and des-acyl ghrelin during the last stage of pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;393(3):455-60.
67. Kabil NN, Seddiek HA, Yassin NA, Gamal-Eldin MM. Effect of ghrelin on chronic liver injury and fibrogenesis in male rats: Possible role of nitric oxide. *Peptides*. 2014;52:90-7.

68. Khan H, Kusakabe KT, Wakitani S, Hiyama M, Takeshita A, Kiso Y. Expression and localization of NO synthase isoenzymes (iNOS and eNOS) in development of the rabbit placenta. *Journal of Reproduction and Development*. 2012;58(2):231-6.
69. Kawamura K, Sato N, Fukuda J, Kodama H, Kumagai J, Tanikawa H, Nakamura A, Honda Y, Sato T, Tanaka T. Ghrelin inhibits the development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Endocrinology*. 2003;144(6):2623-33.
70. Zhang K, Wei H, Zhang Y, Wang S, Li Y, Dai Y, Li N. Effects of ghrelin on in vitro development of porcine in vitro fertilized and parthenogenetic embryos. *Journal of Reproduction and Development*. 2007;53(3):647.
71. Du C, Li H, Cao G, Wang C, Li C. Expression of the Orexigenic Peptide Ghrelin and the Type 1a Growth Hormone Secretagogue Receptor in Sheep Oocytes and Pre-implantation Embryos Produced In Vitro. *Reproduction in domestic animals*. 2010;45(1):92-8.
72. Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG. Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2005;288(1):R91-R6.
73. Wang X, Liang L, Du L. The effects of intrauterine undernutrition on pancreas ghrelin and insulin expression in neonate rats. *J Endocrinol*. 2007;194(1):121-9.
74. Ponzio MF, Busso JM, Ruiz RD, de Cuneo MF. Time-related changes in functional activity and capacitation of chinchilla *Chinchilla laniger* spermatozoa during in vitro incubation. *Anim Reprod Sci*. 2007;102(3):343-9.
75. Fiol de Cuneo M, Vincenti LMa, Martini AC, Ponce AA, Ruiz RD. Effects of PDC-109 on bovine sperm functional activity in presence or absence of heparin. *Theriogenology*. 2004;62(1):207-16.
76. Fraser LR. Calcium channels play a pivotal role in the sequence of ionic changes involved in initiation of mouse sperm acrosomal exocytosis. *Mol Reprod Dev*. 1993;36(3):368-76.
77. Fiol dCM, Ruiz R, Ponce A, Maldonado X, Lacuara J. Time-related changes in functional activity of mouse spermatozoa during in vitro or in vivo incubation. *J Exp Anim Sci*. 1994;36(6):189-200.

78. Stutz G, Martini A, Ruiz R, De Cuneo MF, Munoz L, Lacuara J. Functional activity of mouse sperm was not affected by low doses of aspirin-like drugs. *Syst Biol Reprod Med.* 2000;44(2):117-28.
79. Makler A. The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation. *Fertil Steril.* 1980;33(3):337.
80. Kovács A, Foote R. Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biotech Histochem.* 1992;67(3):119-24.
81. Larson JL, Miller DJ. Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Mol Reprod Dev.* 1999;52(4):445-9.
82. Yelian F, Dukelow W. Effects of a DNA-specific fluorochrome, Hoechst 33258, on mouse sperm motility and fertilizing capacity. *Andrologia.* 1992;24(3):167-70.
83. Martini A, Fiol de Cuneo M, Ruiz R, Ponce A, Lacuara J. In vitro parthenogenesis of mouse oocytes under several experimental conditions. *Zygote.* 1999;8(01):45-9.
84. Luque EM, Vincenti L, Stutz G, Santillan M, Ruiz R, Fiol de Cuneo M, Martini AC. Ghrelin modulates fertilization, early embryo development and implantation. *Endocrine Abstracts* 2012;29.
85. Fernández-Fernández R, Tena-Sempere M, Navarro VM, Barreiro ML, Castellano JM, Aguilar E, Pinilla L. Effects of ghrelin upon gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin secretion in adult female rats: in vivo and in vitro studies. *Neuroendocrinology.* 2006;82(5-6):245-55.
86. Luján CD, Triquell M, Sembaj A, Guerrero C, Fretes R. Trypanosoma cruzi: productive infection is not allowed by chorionic villous explant from normal human placenta in vitro. *Exp Parasitol.* 2004;108(3):176-81.
87. Munro C, Lasley B. Non-radiometric methods for immunoassay of steroid hormones. *Prog Clin Biol Res.* 1988;285:289.
88. Luque EM, Carlini VP, Vincenti LM, Puechagut P, Stutz G, Santillán ME, Ruiz RD, Martini AC, Fiol de Cuneo M. Effects of hexarelin (a ghrelin analogue) on fertilisation and the pre-and postnatal development of mice. *Reprod Fertil Dev.* 2010;22(6):926-38.
89. Camiña JP, Carreira MC, El Messari S, Llorens-Cortes C, Smith RG, Casanueva FF. Desensitization and endocytosis mechanisms of ghrelin-activated growth hormone secretagogue receptor 1a. *Endocrinology.* 2004;145(2):930-40.

90. Dovolou E, Periqueta E, Messinis IE, Tsiligianni T, Dafopoulos K, Gutierrez-Adan A, Amiridis G. Daily supplementation with ghrelin improves in vitro bovine blastocysts formation rate and alters gene expression related to embryo quality. *Theriogenology*. 2014;81(4):565-71.
91. Wang Z, Lin P, Yu S. Effects of ghrelin on developmental competence and gene expression of in vitro fertilized ovine embryos. *Theriogenology*. 2013;79(4):695-701.
92. Giojalas LC, Iribarren P, Molina R, Rovasio RA, Estofán D. Determination of human sperm calcium uptake mediated by progesterone may be useful for evaluating unexplained sterility. *Fertil Steril*. 2004;82(3):738-40.
93. Puechagut P, Luque, EM. , Martini, AC. , Stutz, G. , Santillán, ME. , Fiol de Cuneo, M. , Ruiz RD. , Vincenti L. Efectos de la administración crónica de un análogo de ghrelina sobre la fisiología reproductiva de ratones machos y hembras. *Medicina*. 2008;68:196.
94. Li L, Ferin M, Sauer MV, Lobo RA. Dehydroepiandrosterone in follicular fluid is produced locally, and levels correlate negatively with in vitro fertilization outcomes. *Fertil Steril*. 2011;95(5):1830-2.
95. Rak-Mardyła A, Gregoraszczyk E, Karpeta A, Duda M. Expression of ghrelin and the ghrelin receptor in different stages of porcine corpus luteum development and the inhibitory effects of ghrelin on progesterone secretion, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) activity and protein expression. *Theriogenology*. 2012;77(8):1505-12.
96. Novillo JM HM, Estofán P, Estofán D, Molina R, Luque EM, Vincenti L, Martini AC. Obesidad y disminución del éxito reproductivo femenino: posible asociación con los niveles plasmáticos de ghrelina. XVIII Jornada Internacional Anual de Actualización en Medicina Nutricional y Obesidad de la Fundación Diquecito 2015.
97. Ertzeid G, Storeng R. The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Hum Reprod*. 2001;16(2):221-5.
98. Tawadros N, Salamonsen L, Dimitriadis E, Chen C. Facilitation of decidualization by locally produced ghrelin in the human endometrium. *Mol Human Reprod*. 2007;13(7):483-9.
99. Di Renzo GC, Mattei A, Gojnic M, Gerli S. Progesterone and pregnancy. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2005;17(6):598-600.

100. Roura LC, Rodriguez DS. *Obstetricia y medicina materno-fetal*: Ed. Médica Panamericana; 2007.
101. Rak-Mardyla A, Wróbel A, Gregoraszczyk EL. Ghrelin Negatively Affects the Function of Ovarian Follicles in Mature Pigs by Direct Action on Basal and Gonadotropin-Stimulated Steroidogenesis. *Reprod Sci*. 2014;1933719114549854.
102. Fang F, Wang L, Zhang Y, Li Y, Su S, Zhang X. Role of ghrelin on estrogen and progesterone secretion in the adult rat ovary during estrous cycle. *Syst Biol Reprod Med*. 2012;58(2):116-9.
103. Viani I, Vottero A, Tassi F, Cremonini G, Sartori C, Bernasconi S, Ferrari B, Ghizzoni L. Ghrelin inhibits steroid biosynthesis by cultured granulosa-lutein cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2008;93(4):1476-81.
104. Sirotkin AV, Rafay J, Kotwica J, Darlak K, Valenzuela F. Role of ghrelin in regulating rabbit ovarian function and the response to LH and IGF-I. *Domest Anim Endocrinol*. 2009;36(3):162-72.
105. Wang D, Wang H, Luo P, Hwang A, Sun D, Wang Y, Li C. Effects of ghrelin on homocysteine-induced dysfunction and inflammatory response in rat cardiac microvascular endothelial cells. *Cell Biol Int*. 2012;36(6):511-7.
106. Poderoso JJ, Carreras MaC, Lisdero C, Riobó N, Schöpfer F, Boveris A. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys*. 1996;328(1):85-92.
107. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 2007;87(1):315-424.
108. Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101(12):4003-8.
109. Croy BA, He H, Esadeg S, Wei Q, McCartney D, Zhang J, Borzychowski A, Ashkar AA, Black GP, Evans S. Uterine natural killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modelling. *Reproduction*. 2003;126(2):149-60.
110. Xie X, He H, Colonna M, Seya T, Takai T, Croy BA. Pathways participating in activation of mouse uterine natural killer cells during pregnancy. *Biol Reprod*. 2005;73(3):510-8.
111. Van Nieuwenhoven AV, Heineman M, Faas M. The immunology of successful pregnancy. *Hum Reprod Update*. 2003;9(4):347-57.

112. Fainboim L, Geffner J. *Introducción a la inmunología humana*: Ed. Médica Panamericana; 2005.
113. Ohta K, Laborde N, Kajiya M, Shin J, Zhu T, Thondukulam A, Min C, Kamata N, Karimbux NY, Stashenko P. Expression and possible immune-regulatory function of ghrelin in oral epithelium. *J Dent Res*. 2011;90(11):1286-92.
114. Dixit VD, Schaffer EM, Pyle RS, Collins GD, Sakthivel SK, Palaniappan R, Lillard N, Taub DD. Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *J Clin Invest*. 2004;114(1):57-66.

ANEXO I