



Unidad Académica de
Histología y Embriología



Tesis de maestría

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)

Área Biología, subárea Ciencias Fisiológicas

Evaluación de los efectos de la vincristina sobre el ovario y el potencial rol protector del dicloroacetato

Dra. Agustina Toledo Romero

Director de tesis

Dr. Gabriel Anesetti

UA. Histología y Embriología

2025

Agradecimientos

Mi principal agradecimiento es para la Universidad de la República y la Facultad de Medicina, que me permitieron formarme como doctora, como docente, y que hoy me brindan la oportunidad de desarrollar mis estudios de maestría.

A la Unidad Académica de Histología y Embriología, y a todas las compañeras y compañeros que la integran, por su apoyo constante y generoso durante la realización de los experimentos aquí descritos.

Al Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular, en particular a Soledad Marton la paciencia y el compromiso para con mi formación y a Ricardo Escobar, por todas las horas compartidas dentro y fuera del ámbito académico.

A PEDECIBA, por hacer posible mi formación de posgrado, y al apoyo económico brindado a través de alícuotas. Agradezco también a CSIC por el financiamiento otorgado mediante un proyecto de Iniciación.

A mis compañeras y compañeros de laboratorio, Clara Fernández, Paulina Simoes, Lorena Bonjeur, Santiago Vidal, Belén Suarez, Lucia Borra, Karina Hernandez, Dana Kimelman, por toda su colaboración y cariño.

A la directora del laboratorio Biología de la Reproducción y mi amiga Rebeca Chávez por todos los conocimientos transmitidos, las experiencias, y los viajes compartidos.

A mi familia —la de origen y la construida—, y a mis amigas y amigos, por estar conmigo en cada paso, sostenerme en los momentos difíciles y celebrar conmigo cada logro.

Por último, pero no menos importante a mi director de tesis, mi mentor docente, mi compañero del team invierno el Dr. Gabriel Anesetti, gracias por tu confianza, tu paciencia y tu compromiso con mi formación.

ÍNDICE

Contenido

RESUMEN	5
ANTECEDENTES	7
Ovario – anatomía e histología.....	7
Desarrollo del ovario	8
Crecimiento folicular.....	11
Caspasas y apoptosis	19
Mitocondria	21
Ácido dicloracético	23
Quimioterápicos	24
Vincristina	28
HIPÓTESIS	30
OBJETIVOS	31
Objetivo general	31
Objetivos específicos	31
MATERIALES Y MÉTODOS	32
Animales.....	32
Control del ciclo estral por colpocitología vaginal exfoliativa	33
Obtención de muestras biológicas	35
Análisis morfológico.....	35
Inmunohistoquímica.....	37
Inmunoblotting	41
Cuantificación de colágeno.....	42
Inducción de la ovulación y análisis del huso meiótico.....	42
Análisis estadístico	43
RESULTADOS	43
Comprobación de la presencia de la enzima PDH y su modulación por DCA	44
Efectos del tratamiento sobre el peso corporal	45
Efectos del tratamiento sobre el ciclo estral	45
Efectos sobre el ovario	47
Volumen ovárico	47
Población folicular.....	47

Atresia folicular – caspasa 3 activada	49
Expresión de proteínas proapoptóticas	49
Evaluación de indicadores de estrés oxidativo.....	49
Cuantificación de colágeno.....	49
Activación de folículos primordiales	53
Detección de AMH.....	53
Efectos del tratamiento sobre los ovocitos ovulados	57
DISCUSIÓN	59
Efectos de la vincristina y DCA sobre los parámetros fisiológicos y conductuales	60
Efectos de la vincristina y DCA sobre la fibrosis en ovario.....	60
Efectos de la vincristina y DCA sobre indicadores de estrés oxidativo	61
Efectos de la vincristina y DCA sobre los folículos primordiales.....	62
Efectos de la vincristina y DCA sobre la población de folículos en crecimiento....	64
Efectos de la vincristina y DCA en la ovulación.....	64
CONCLUSIONES.....	66
PERSPECTIVAS.....	67
PUBLICACIONES	68
REFERENCIAS.....	69

RESUMEN

La preservación de la fertilidad en pacientes con cáncer ha cobrado creciente importancia debido al aumento de las tasas de supervivencia luego del tratamiento. En los mamíferos, la competencia reproductiva de las hembras depende de la producción de ovocitos maduros, proceso que ocurre dentro de folículos ováricos. Estos son altamente susceptibles a sustancias gonadotóxicas como los quimioterápicos. La vincristina, ampliamente utilizada en patologías hemato-oncológicas, actúa desestabilizando los microtúbulos y deteniendo la proliferación celular, y se ha demostrado recientemente que también induce daño mitocondrial favoreciendo la producción de especies reactivas del oxígeno. Dado que las mitocondrias del ovocito son esenciales para la maduración, la fertilización y el desarrollo embrionario temprano, la vincristina podría comprometer la calidad ovocitaria a pesar de considerarse hasta el momento, una droga quimioterápica de baja gonadotoxicidad.

En este contexto, se evaluó el posible efecto protector del dicloroacetato (DCA), un modulador del metabolismo mitocondrial que favorece la entrada de piruvato al ciclo de Krebs y promueve el metabolismo oxidativo. Se utilizó un modelo murino con cuatro grupos experimentales: 1) control, 2) vincristina, 3) DCA y 4) DCA y vincristina. Se realizaron análisis de los ovarios y ovocitos empleando aproximaciones histológicas, inmunohistoquímicas, moleculares y funcionales, evaluando tanto efectos a corto como a largo plazo.

La vincristina alteró la ciclicidad, disminuyó el número de folículos en crecimiento, aumentó la atresia folicular y elevó los marcadores apoptóticos. Además, se observó un aumento en la activación de los folículos primordiales, aunque no se encontraron modificaciones en el número total de estos folículos. A largo plazo se evidenció, reducción del número de ovocitos ovulados, alteración en el diámetro de los ovocitos y en la morfología del huso meiótico, lo que indica un impacto negativo sobre la calidad ovocitaria.

El tratamiento simultáneo con DCA no logró revertir completamente el daño folicular inducido por la vincristina. En algunos casos incluso exacerbó ciertas alteraciones, aunque mostró efectos beneficiosos como la reducción de la

fibrosis ovárica y la normalización parcial del huso meiótico, lo que sugiere un papel dual sobre la función ovárica.

Estos resultados resaltan la complejidad de las terapias combinadas y la necesidad de comprender los mecanismos por los cuales la vincristina aumenta la activación del pool primordial, así como de considerar la posible persistencia de efectos posteriores al tratamiento.

ANTECEDENTES

Ovario – anatomía e histología

Los ovarios forman parte de los genitales internos del aparato reproductor femenino, son órganos que en humanos miden aproximadamente 3 cm de longitud por 1,5 cm de ancho y 1 cm de espesor, mientras que en los roedores de laboratorio el volumen ronda los $2,50 \pm 0,32 \text{ mm}^3$ (Zheng et al., 2021).

Histológicamente se describen cubiertos por un tejido epitelial cúbico o cilíndrico bajo simple, el “epitelio germinativo”, debajo del cual se encuentra el tejido conjuntivo denso de la túnica albugínea. Se organiza en dos sectores no bien delimitados, la corteza y la médula. La corteza es un sector de tejido conjuntivo laxo con mucha celularidad, donde se localizan los folículos ováricos que constituyen la reserva reproductiva de las hembras de las distintas especies. En la región central del órgano se localiza la médula, formada por tejido conjuntivo más denso y vasos sanguíneos de mayor calibre y nervios que llegan a este sector a través del hilio (Bloom & Fawcett, 1995). Sin embargo, las características morfológicas, histológicas y fisiológicas de este órgano varían según la especie y la etapa del ciclo de la vida del animal. En los roedores se reconocen diferentes etapas a lo largo de la vida, que corresponden a los períodos del desarrollo embrionario-fetal, prepupal (neonatal, infantil y juvenil), puberal y adulto (Richards & Pangas, 2010). En el caso de los primates se reconoce además la etapa postmenopásica del ovario.

Desarrollo del ovario

El ovario fetal se origina a partir de una protuberancia del mesodermo intermedio, recubierta por el epitelio celómico, formando la gónada indiferente bipotencial, ya que hasta este momento no puede distinguirse morfológicamente como ovario o testículo. En los ratones se forma aproximadamente en el día 10 del desarrollo embrionario (Byskov. A.G, 1986), momento en el que las células germinales primordiales originadas tempranamente en el epiblasto y que migran transitoriamente a la pared del saco vitelino pasan a colonizar dicha protuberancia (Eddy & Clark, 1975; Fujimoto et al., 1977). El número de células germinales primordiales aumenta entre 40 a 250 en este periodo (Cummings & Kavlock, 2004; Saitou, 2021) y continúan proliferando por mitosis, lo que permite aumentar enormemente su número, llegando a contar con alrededor de 25000 células germinales para el día 13 de gestación (Dolci et al., 2015). Múltiples factores de crecimiento modulan la mitosis de las células germinales primordiales, tales como los miembros de la familia TGF- β (Transforming Growth Factor Beta): activina, BMP (proteína morfogenética ósea) y TGF- β 1 (De Felici et al., 2004). En embriones humanos la activina aumenta la proliferación de las células germinales primordiales, mientras que en ratones la activina y el TGF- β inhiben su proliferación y es el BMP el que induce el aumento de las células germinales primordiales en cultivo, por lo que esto implica que podría existir una regulación específica por especie (De Felici et al., 2004; Richards & Pangas, 2010). Las células germinales primordiales se diferencian posteriormente en ovogonias, células de la línea germinal que darán origen a los gametos femeninos. Como se esquematiza en la Fig. 1 las divisiones mitóticas de las ovogonias están acompañadas por una citocinesis incompleta, generando de esa forma que todas las células hermanas formen nidos o “cordones ovígeros”, donde las células quedan conectadas entre sí por puentes citoplasmáticos y rodeadas por células del estroma. Estos puentes citoplasmáticos permiten que el desarrollo y diferenciación ocurra de forma sincrónica dentro de los cordones (Pepling & Spradling, 1998). Los ovarios fetales en los ratones se pueden distinguir como tal alrededor del día 13,5 por la presencia de estos cordones o nidos ovígeros (Ódor & Blandau, 1969). Para el día gestacional 13,5 las

ovogonias comienzan a entrar en meiosis y se denominan ovocitos primarios. Los ovocitos en desarrollo se detienen en la etapa del diploteno de la profase de la primera división meiótica. Este arresto meiótico es sostenido por los niveles altos de AMPc que se mantienen dentro del ovocito, gracias a la interacción con las células prefoliculares circundantes (Conti et al., 2002). En los roedores, posteriormente al nacimiento, los cordones ovígeros atraviesan una ruptura programada para originar los folículos primordiales individuales. Esto se debe a la deprivación de la fuente de hormonas maternas que desencadena una disminución brusca de los niveles de estrógenos y progesterona circulantes en la cría. En los humanos y otros mamíferos, este evento ocurre alrededor de las semanas 14-15 de la gestación, cuando aparecen los primeros folículos primordiales con ovocitos en diploteno (Høyer et al., 2005). Este evento se encuentra señalizado por la presencia de estradiol, en contraposición con lo que sucede en los roedores. El estradiol favorece la formación de los folículos primordiales. El ovario fetal humano tiene la capacidad de convertir andrógenos en estrógenos a la vez que aumenta la presencia de receptores de estrógenos. Además, las enzimas CYP11A1, CYP17A1 y HSD3B2, necesarias para la síntesis de esteroides sexuales muestran localización en el citoplasma de los ovocitos, así como en las células somáticas, mientras que CYP19A1 coincide con los patrones de expresión en adultos. Por otra parte, también aumentan los niveles de la transcripción de estas enzimas durante el segundo trimestre de gestación (Fowler et al., 2011).

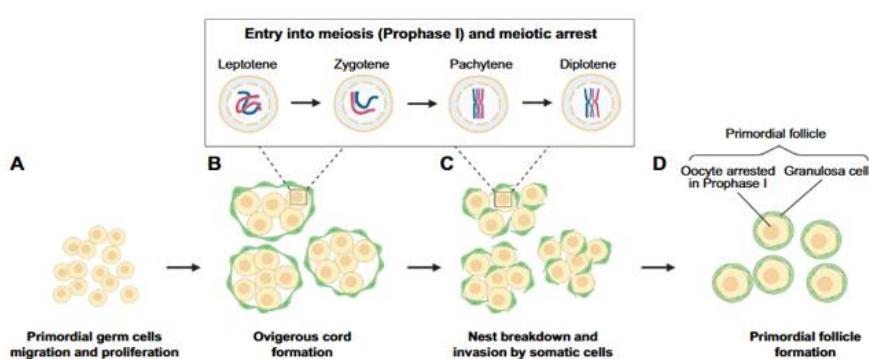


Fig. 1- Proceso de formación de los folículos primordiales. En A se representa la migración y proliferación de las células germinales primordiales. En B se muestra la formación de los cordones ovígeros. En C el progreso de la meiosis hasta el arresto de la profase I en diploteno, se establece el contacto con las células somáticas (células foliculares). En D folículos primordiales individuales. Tomado de (Telfer et al., 2023).

De esta manera se forman los folículos primordiales, que consisten en un único ovocito con un citoplasma abundante, el núcleo eucromático y un nucleolo evidente, similar a un núcleo interfásico pero que ya comenzó la profase de la primera división meiótica. Cada ovocito se encuentra rodeado por una única capa de células somáticas planas que llamamos células foliculares. Aquellos ovocitos que, durante este proceso de separación, no logran quedar rodeados completamente por células foliculares mueren por apoptosis. De esta forma se genera el número máximo de folículos primordiales existentes en el ovario, capaces de permanecer en reposo, ingresar al pool de crecimiento o degenerar en el correr de la vida de la hembra. A este conjunto de folículos primordiales se le denomina reserva folicular ovárica (Pepling & Spradling, 2001).

En ovarios de ratonas se reporta que la reserva folicular es de aproximadamente once mil folículos en el día 1 post natal y hacia el día 7 post natal disminuye aproximadamente a la mitad. A los 200 días el número se reduce a solo unos doscientos cincuenta folículos (Kerr et al., 2006). En humanos si bien los números absolutos son distintos, se mantiene el patrón de disminución presente en los roedores, con un número máximo cercano a los 7 millones a la mitad de la gestación, y que rápidamente disminuyen a aproximadamente un millón de folículos al nacimiento y menos de la mitad de estos al llegar a la pubertad (Fig.2) (Kaur & Kurokawa, 2023).

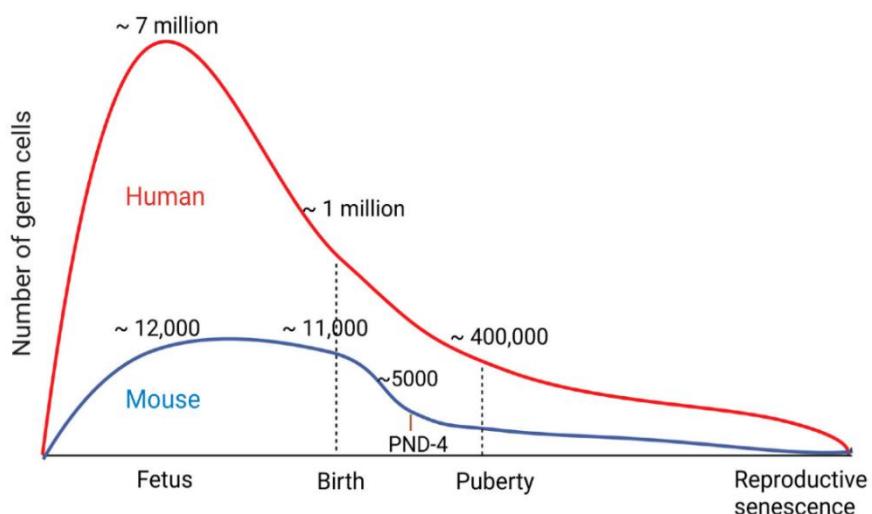


Fig. 2 - Representación de la cantidad de células germinales en los ovarios de ratones y humanos en las distintas etapas de la vida reproductiva. Tomado de (Kaur & Kurokawa, 2023).

Crecimiento folicular

El pasaje del folículo primordial al pool de crecimiento es un proceso independiente de las gonadotrofinas que puede ocurrir en cualquier momento de la vida del animal (Dierich et al., 1998; Kumar et al., 1997). Se encuentra controlado por factores de señalización producidos localmente, así como también por las propiedades físicas que surgen de la interacción entre el ovocito, las células foliculares circundantes y la matriz extracelular. El diálogo de estos procesos de señalización resulta en la inhibición o promoción del reclutamiento de los folículos primordiales, procesos que hoy en día continúan caracterizándose, pero que se sabe están mediados por factores intraováricos (Gershon & Dekel, 2020).

Algunas vías de señalización involucradas en la activación de los folículos primordiales son la vía PI3K (proteína quinasa dependiente de fosfoinositidos), el complejo mTOR (mammalian target of rapamycin; la diana de rapamicina en mamíferos), y la PKB (proteína quinasa B, también conocida como Akt) (Hannon & Curry, 2018). Las vías conocidas de inhibición de esta señalización son la vía del FoxO3a (Forkhead box O3) y PTEN (Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome 10) (Jinno, 2025).

Como se muestra en la Fig. 3 dentro de los factores involucrados en esta vía de señalización, PTEN es una fosfatasa que cataliza la conversión de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) en fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2), lo que conduce a una inhibición de la activación de la vía de señalización de Akt, una vía importante para el crecimiento, la supervivencia y la proliferación celular.

Por su parte, la proteinkinasa Akt pertenece a la familia de proteínas serina/treonina quinasa que se activan en respuesta a factores de crecimiento y supervivencia celular, y tienen por sustrato nuclear a los factores de transcripción de la familia Forkhead. El factor de transcripción FoxO3a pertenece a esta familia, compuesta además por el Foxo1(FKHR) y Foxo4(AFX), efectores de la vía PTEN/PI3K/AKT (Castrillon et al., 2003). La activación de esta proteinkinasa Akt fosforila a FoxO3a, promoviendo su salida del núcleo al citoplasma y la desinhibición de la transcripción dependiente de FoxO3a (Brunet et al., 2001).

FoxO3a se localiza habitualmente en el núcleo de las células que lo expresan, y en este caso en el núcleo de los ovocitos en reposo de los folículos primordiales. Cuando es traslocado al citoplasma, deja de ejercer su función como factor de transcripción y es finalmente degradado. Este es uno de los fenómenos fácilmente demostrable en el proceso de reclutamiento del folículo primordial para continuar su crecimiento a folículo primario. La inmunolocalización del factor de transcripción FoxO3a, cuando muestra una marca nuclear es indicadora de folículos primordiales en reposo mientras que su localización en el citoplasma del ovocito (aunque el folículo aún muestre características morfológicas de folículo primordial) indica activación de este y marca el inicio de su pasaje al pool de folículos en crecimiento (Albamonte et al., 2023).

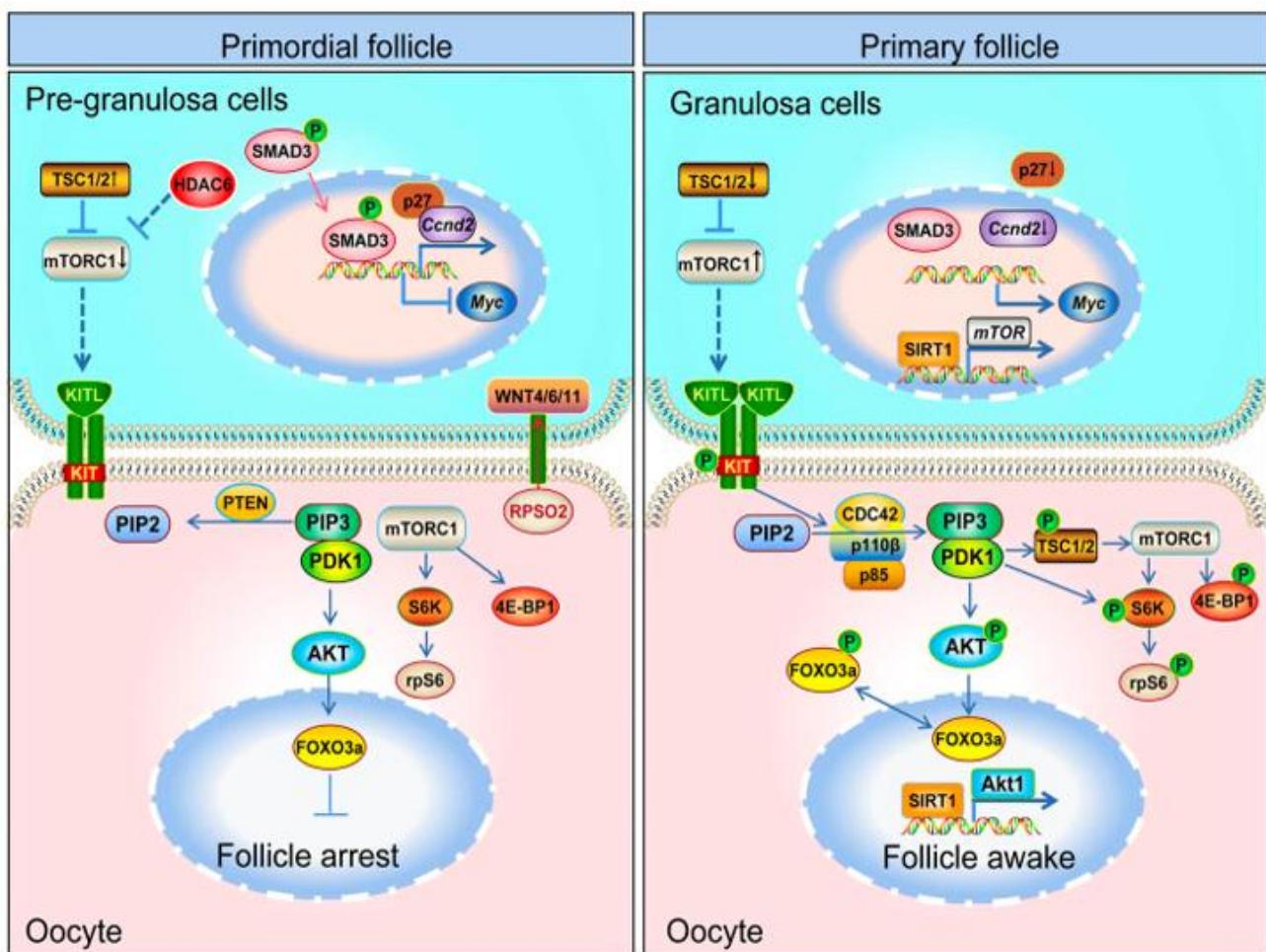


Fig. 3. Vías implicadas en el mantenimiento del estado de reposo o activación del folículo.
Interacción entre el ovocito y las células pregranulosas asociadas, y los cambios moleculares que permiten el mantenimiento del estado de reposo (izquierda) o que llevan a la activación del folículo y su ingreso al pool de crecimiento (derecha). Tomado de (Zhang et al., 2023)

Diferentes estudios han mostrado que la eliminación condicional de FoxO3a, PTEN, y otros factores como TSC1 Y TSC2 (complejo heterodimérico 1 de esclerosis tuberosa y complejo heterodimérico 2 de tuberina respectivamente) de los ovocitos de ratón dan como resultado una activación global de todos los folículos primordiales conduciendo a insuficiencia ovárica (Castrillon et al., 2003). En ratones la delección del gen PTEN estimula el crecimiento de los folículos primordiales por un mecanismo que aumenta la fosforilación de Akt que lleva a la fosforilación e inactivación de FoxO3a, generando así la activación folicular (Albamonte et al., 2023). Por su parte, los factores TSC1 y TSC2, actúan como sensores involucrados en la vía de mTOR. La eliminación de estos reguladores junto con la del PTEN genera una sinergia en el crecimiento de los ovocitos de ratón, no así cuando solo se elimina uno de los dos, evidenciando que la vía de PTEN/PI3K y mTOR regulan la activación folicular de forma paralela y colaborativa (Sun et al., 2015).

Se ha demostrado además la acción de algunas hormonas como la hormona antimülleriana (AMH) involucrada en la inhibición del reclutamiento inicial de los folículos primordiales. Es una proteína dimérica perteneciente a la superfamilia de glicoproteínas del factor de crecimiento transformante β (TGF β) (La Marca et al., 2009) y su receptor específico es el AMHR2 (di Clemente et al., 2021). La AMH es producida en las células de Sertoli fetales durante la diferenciación sexual masculina e induce la regresión del conducto de Müller. En el sexo femenino esta hormona no se expresa durante la diferenciación sexual, sino que aparece por primera vez en el ovario neonatal, en las células de la granulosa de los folículos recientemente reclutados y continúa expresándose en las células de la granulosa de los folículos preantrales y antrales pequeños del ovario. Desempeña un papel inhibidor en el proceso cíclico de reclutamiento folicular al determinar los niveles umbral de la hormona folículo estimulante (Hannon & Curry, 2018). Estudios en ratones homocigotos para una mutación nula de la AMH revelaron que esta hormona participa en la regulación de la tasa de reclutamiento inicial de folículos primordiales en la reserva de crecimiento. En estos ratones deficientes, se reclutan más folículos primordiales y, como consecuencia, la reserva de folículos primordiales disminuye rápidamente (Durlinger et al., 1999). Hoy en día la medición de la hormona circulante puede

proporcionar información valiosa sobre la reserva folicular funcional de la población general, lo que facilita la planificación de la vida reproductiva en mujeres (di Clemente et al., 2021).

El reclutamiento de un folículo primordial en estado inactivo para comenzar su crecimiento lleva a éste a la etapa de folículo primario. Esta transición se denomina reclutamiento inicial. Una vez comenzado se pueden observar cambios en su estructura, donde el ovocito crece en tamaño y las células foliculares van cambiando su forma de planas a cúbicas o cilíndricas bajas. Mientras conforman una única capa de células foliculares cuboideas, se denomina folículo primario unilaminar. Cuando la proliferación aumenta el número de capas, pasan a denominarse folículos primarios multilaminares, y las células foliculares ahora se reconocen como células de la granulosa (Ross & Pawlina, 2016). Al mismo tiempo aumenta la síntesis de ARNm, se van organizando las células de la granulosa, y se inicia la formación de la zona pelúcida, compuesta por glicoproteínas, nombradas ZP de la 1 a la 4, formando una capa acelular que se localiza entre la membrana del ovocito y las células de la granulosa. Sin embargo, ambos tipos celulares se mantienen comunicados a través de estructuras membranosas tipo filopodio, compuestos por un eje de filamentos de actina o tubulina que cruzan la zona pelúcida y contactan con las microvellosidades de la membrana superficial del ovocito (Orozco-Galindo et al., 2025). La conexión de estas prolongaciones de membrana con la superficie del ovocito está mediada a través de uniones gap (Fig.4), compuestas por proteínas transmembrana, las conexinas, que se ensamblan para formar conexiones o hemicanales. Tienen un tamaño de poro que les permite la transferencia directa de moléculas de hasta 1 kDa, a su través se da el pasaje de iones, piruvato, lactato, aminoácidos, AMPc , GMPc y señales electroquímicas (Marchais et al., 2022). Las uniones gap entre las células de la granulosa involucran a la conexina 43 (Cx43), mientras que las que conectan el ovocito con las células granulosas circundantes están compuestas por conexina 37 (Cx37) (Teilmann, 2005).

El ovocito también participa en la regulación de la foliculogénesis, modificando su propio microambiente mediante la secreción de factores de crecimiento parácrinos. Estos factores ejercen un papel esencial en el desarrollo folicular y la maduración del ovocito. El factor de diferenciación de crecimiento 9 (GDF9) y

la proteína BMP15 son los más conocidos, y actúan como factores parácrinos secretados por el ovocito para regular la función de las células de la granulosa vecinas dentro del compartimento folicular. El GDF9 se expresa en ovocitos durante todas las etapas de crecimiento folicular, influyendo en la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa, mientras que el BMP15 se expresa en ovocitos desde la etapa multilaminar temprana en forma creciente durante el desarrollo folicular ejerciendo un papel importante en la regulación de la función de las células de la granulosa y proporcionando soporte y señalización esenciales durante la maduración del ovocito (Fountas et al., 2024; Kristensen et al., 2022).

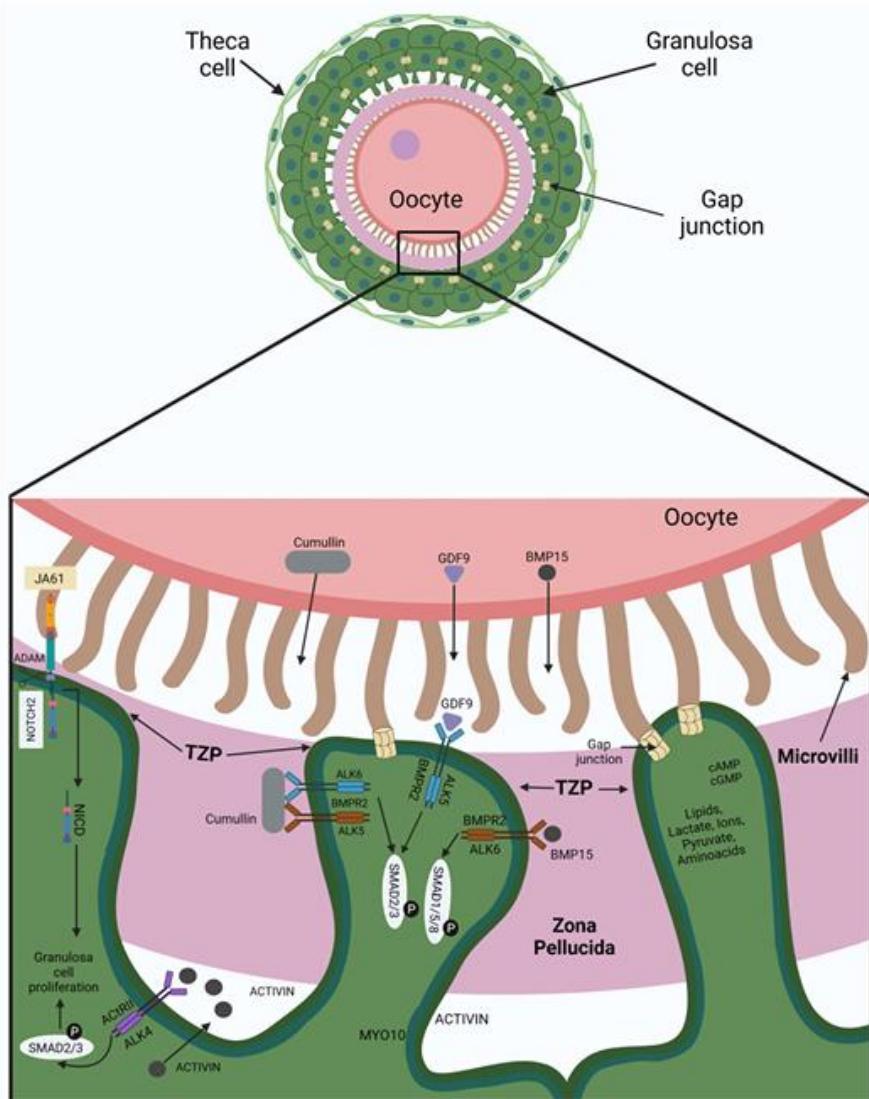


Fig. 4 – Contactos celulares de un folículo primario multilaminar. Se representa al ovocito en interacción con la zona pelúcida y las células de la granulosa, mediada esta conexión por uniones gap presentes en las microvellosidades, además de moléculas como el BMP 15, GDF9 y calmodulinas. Tomado de (Orozco-Galindo et al., 2025)

El aumento rápido en el número de células granulosas que lleva a una estructura multilaminar va acompañado de la síntesis de varios factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y la AMH (Orozco-Galindo et al., 2025). Las células estromales circundantes se diferencian durante este proceso y forman la teca folicular, generando una capa de células que rodea a las células de la granulosa por fuera de la lámina basal. Esta teca folicular se diferencia posteriormente en dos capas, la teca interna, capa muy vascularizada, donde las células adquieren características de células productoras de esteroides, como lo son la presencia de abundante retículo endoplasmático liso, complejo de Golgi abundante sin muchos gránulos asociados, numerosas mitocondrias con crestas tubulares características y gotitas lipídicas, con gran presencia de receptores para hormona luteinizante. La teca externa por su parte tiene mayor presencia de fibroblastos, células musculares lisas y fibras de colágeno (Ross & Pawlina, 2016).

Una vez completados estos cambios en el folículo primario multilaminar, se comienzan a formar pequeñas cavidades entre las células de la capa granulosa, que contienen líquido folicular compuesto por proteínas, metabolitos, iones, hormonas, lípidos, especies reactivas del oxígeno y vesículas extracelulares. A medida que estas cavidades aumentan de tamaño van confluyendo para formar una única cavidad llamada antro por lo que pasa a denominarse folículo antral (Rodgers & Irving-Rodgers, 2010). Durante este proceso también quedan delimitadas diferentes poblaciones de células de la granulosa, las que permanecerán en estrecho contacto con el ovocito y que lo acompañará en la ovulación, denominadas células de la corona radiada, y las pertenecientes al cumulo de células de la granulosa y que mantiene el contacto entre el ovocito y el resto del folículo, el cúmulo ovígero. El resto de las células de la capa granulosa conforman la población de células granulosas murales. Si bien las células de la granulosa de los distintos sectores se originan de la proliferación de las células pregranulosas que rodean al folículo primordial, su morfología presenta características particulares (Marchais et al., 2022).

Esta etapa de folículo antral y su crecimiento posterior pasa a ser dependiente de las gonadotrofinas hipofisarias y de diversos factores moduladores de

producción local (IGF-1, activina, inhibina, GDF-9, etc) por lo que solo se produce después de la pubertad (Fig.5) (Belli & Shimasaki, 2018; Erickson & Shimasaki, 2000; Litichever et al., 2009).

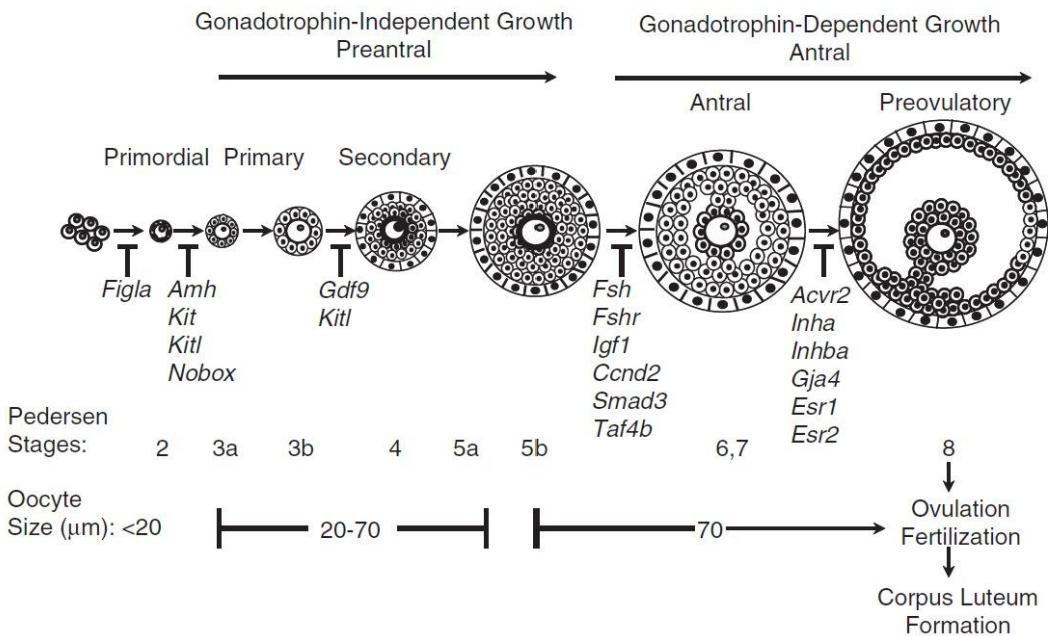


Fig. 5 – Etapas de la foliculogénesis. En esta imagen se esquematiza la foliculogénesis, etapa no dependiente y dependiente de gonadotrofinas y tamaño en μm del ovocito en un modelo de ratón. Tomado de (Neill, 2006)

Esta etapa sigue un ciclo de retroalimentación que inicia cuando el hipotálamo comienza a secretar hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), que regula la liberación en la hipófisis de hormona foliculoestimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH). Estas hormonas viajan por el torrente sanguíneo hasta encontrar sus receptores. La hormona LH se une a su receptor presente mayormente en las células de la teca interna y estimula la producción de andrógenos, mientras que la FSH se une a su receptor en las células de la granulosa mural para convertir estos andrógenos en estrógenos mediante la acción de la enzima aromatasa, siendo este mismo estrógeno el que genera una retroalimentación a nivel central (Millier et al., 1994). Esta retroalimentación negativa sobre el hipotálamo y la hipófisis ocurre durante la mayor parte del ciclo, inhibiendo la liberación de GnRH y de gonadotropinas.

El folículo antral sano continuará su crecimiento y maduración hasta alcanzar el estadio preovulatorio con un ovocito capaz de llegar a ser fecundado (Hirshfield,

1991). Mientras transcurren todos estos cambios, el ovocito se mantiene detenido en profase I. Los niveles elevados y sostenidos de estradiol que se alcanzan hacia el final del crecimiento folicular desencadenan una retroalimentación positiva que provoca un aumento repentino de GnRH y LH que culmina en la ovulación (Lenert et al., 2021). En las horas previas, el pico de LH desencadena la reactivación meiótica, dándose la finalización de la primera división, la expulsión del primer cuerpo polar, y el avance de la meiosis II hasta la etapa de metafase, momento en el que vuelve a detenerse (Jinno, 2025). Este proceso se acompaña por la síntesis de ácido hialurónico por parte de las células del cúmulo, con la consiguiente separación de las células granulosas por la acumulación de agua entre las células llevando a la expansión del antró. Este es otro indicador de maduración de los distintos componentes del folículo previo a la ovulación. El pico de LH también induce un cambio en la síntesis de esteroides en el folículo periovulatorio, que lo lleva desde el predominio de secreción de estradiol- 17β alrededor del pico de LH hacia el predominio de síntesis de progesterona alrededor de la ovulación, requisitos para la maduración citoplasmática y nuclear óptima en el ovocito y la competencia de su desarrollo (Aardema et al., 2025).

Si el crecimiento del folículo no es óptimo, se inician mecanismos de degeneración (apoptosis y atresia folicular) que le impiden una adecuada secreción de hormonas y la formación de un ovocito sano (Hutt, 2015; Yadav et al., 2018). La atresia se puede dar en cualquiera de las etapas del crecimiento. Este proceso está relacionado con cambios morfológicos e histológicos que se pueden reconocer al microscopio por la presencia de conexiones laxas entre las células de la granulosa, células picnóticas y cuerpos apoptóticos, así como células desprendidas en el antró folicular (W. Wang et al., 2010). Además de los cambios morfológicos e histológicos se genera un incremento en la expresión de moléculas pro-apoptóticas como el Bax, Bclx, Bad, etc (Singh et al., 2019) y la activación de moléculas efectoras de la muerte celular apoptótica como las pertenecientes a la familia de las caspasas. Muchos de estos cambios de expresión se pueden demostrar por técnicas inmunohistoquímicas, cuantificación de proteínas y ARNm previo a que se reconozcan los cambios morfológicos mencionados anteriormente.

Caspasas y apoptosis

Las caspasas se pueden clasificar en dos grandes grupos, caspasas apoptóticas y caspasas inflamatorias. A su vez las caspasas apoptóticas se pueden subdividir en iniciadoras o efectoras. La caspasa 3 se encuentra en este último subgrupo (Liu et al., 2005). Inicialmente se sintetiza en estado inactivo (pro-caspasa 3), y es activada dentro de la célula por diferentes vías. La activación por la vía intrínseca se da desde la membrana mitocondrial externa por la liberación al citosol del citocromo C (Fig.6). Estas señales proapoptóticas desencadenan la dimerización de la caspasa 9 llamada iniciadora, que activa a la pro-caspasa 3 entre otras (Asadi et al., 2022a). La vía extrínseca de activación es mediada por receptores de muerte (Fas, receptores Trail y TNF entre otros), pertenecientes todos a la superfamilia del receptor de necrosis tumoral que activan a la caspasa 8 la que posteriormente activa a la pro-caspasa 3 (Guicciardi & Gores, 2009). La caspasa 3 activada escinde y degrada múltiples proteínas cruciales para la célula. Por su importante papel en la vía de apoptosis, ser una proteína común a ambas vías y por su amplia distribución en los distintos tipos celulares, se utiliza como molécula blanco para determinar la apoptosis celular. En el caso del ovario, la detección y cuantificación de la forma activada de la caspasa 3 se utiliza como estimador del grado de atresia folicular (Moffatt-Blue et al., 2006).

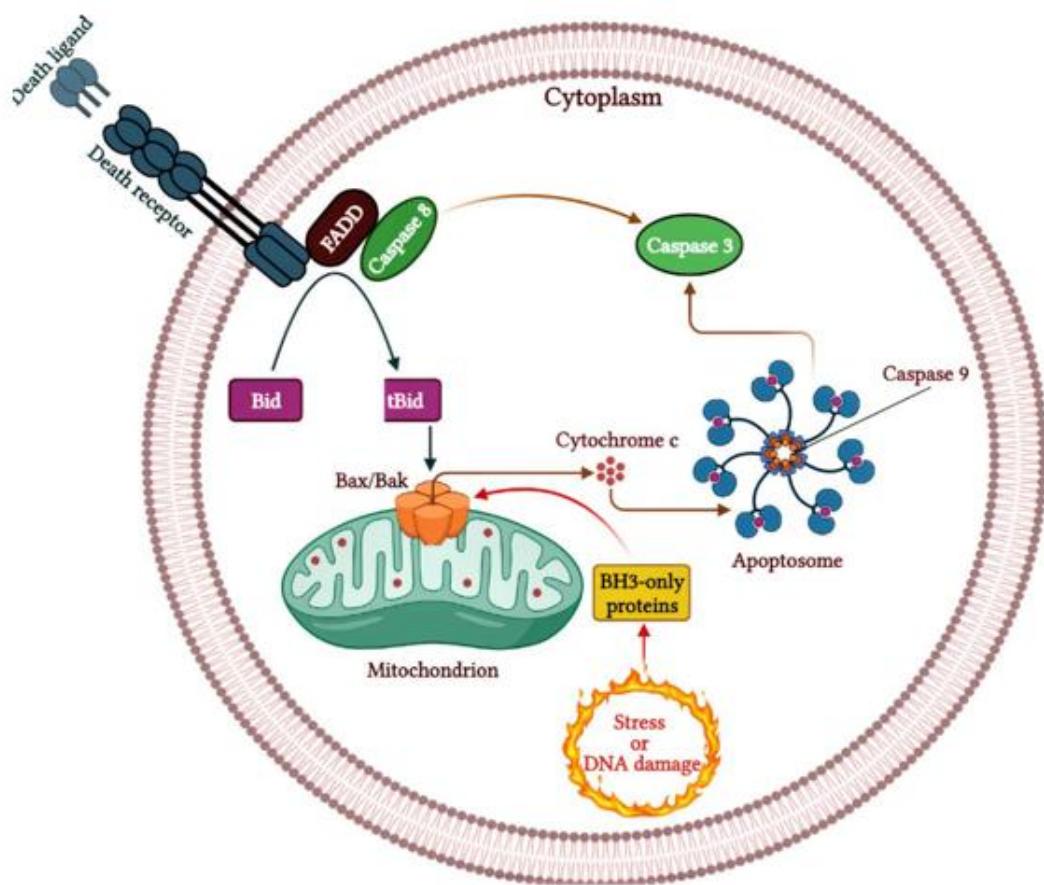


Fig. 6 – Representación de las vías extrínseca e intrínseca de muerte celular. Se observa la cascada que atraviesa una célula luego de recibir un ligando de muerte celular (vía extrínseca) y la activación de la vía de las caspasas 8 y 3. En la vía intrínseca (mitocondrial), el estrés une las proteínas citoplasmáticas BID y BAX a la membrana mitocondrial externa. Por otro lado, una proteína mitocondrial llamada BAK se une a estas dos proteínas y provoca la liberación de citocromo C en el citosol. La unión de este citocromo a Apaf activa la procaspasa 9, que finalmente inicia la cascada de caspasas y la muerte celular. Tomado de (Asadi et al., 2022).

Mitocondria

Las mitocondrias son organelos altamente dinámicos que se mueven, fusionan y dividen continuamente en respuesta a las variaciones en la demanda energética celular. La dinámica mitocondrial está mediada por las grandes GTPasas de dinamina (DRP1, OPA1, MFN1 y MFN2) incrustadas en las membranas mitocondriales. La fisión mitocondrial genera nuevos organelos necesarios para el crecimiento y la proliferación celular, a la vez que facilita la eliminación de las mitocondrias dañadas mediante mitofagia. La fusión mitocondrial garantiza una estrecha complementación entre organelos para satisfacer las necesidades energéticas a nivel celular (Dumollard et al., 2007).

Las mitocondrias son especialmente sensibles a las agresiones tóxicas, ya que son una fuente importante de especies reactivas de oxígeno. En los tejidos ováricos, la función fisiológica de las especies reactivas del oxígeno (ROS) está garantizada por un delicado equilibrio entre estas y las defensas antioxidantes. Estas se encuentran presentes en los ovocitos y las células de la granulosa, así como el líquido folicular. La superóxido dismutasa de cobre-zinc citosólica (SOD1) y la SOD-manganeso mitocondrial (SOD2) reducen el anión superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. La eliminación del peróxido de hidrógeno es catalizada por la catalasa, que lo reduce a agua. Por lo tanto, las SOD y catalasa actúan conjuntamente como defensas antioxidantes (Tatone et al., 2006). Las ROS llevan a la mutación del ADN mitocondrial (ADNmmt) carente de la protección brindada por las histonas, y con mecanismos limitados de reparación. (Babayev et al., 2016; van der Reest et al., 2021).

En el ovocito, las mitocondrias apoyan numerosos procesos durante la maduración, la fertilización y el desarrollo embrionario temprano por lo que se encuentran en estrecha relación con la calidad de los ovocitos y el envejecimiento ovárico (Babayev et al., 2016; Boucret et al., 2015; van der Reest et al., 2021). Representan una alta proporción del citoplasma y la arquitectura mitocondrial es diferente en los ovocitos que en las células somáticas, caracterizada por su apariencia más redondeada y por formar una red fragmentada. Son típicamente elementos esféricos con pocas crestas que rodean una matriz de alta densidad electrónica (Motta et al., 2000). A pesar de

este estado aparentemente primitivo, son una fuente esencial de suministro de ATP (Dumollard et al., 2007; Van Blerkom et al., 1995). Las mitocondrias pueden distribuirse y localizarse en áreas del citoplasma ovocitario con mayores requerimientos de ATP para eventos que consumen energía, como ser la maduración citoplasmática y nuclear del ovocito, incluyendo la ruptura de la vesícula germinal y el ensamblaje y desensamblaje de microtúbulos para la formación del huso meiótico (May-Panloup et al., 2016).

En los ovocitos maduros la producción de nuevas mitocondrias se detiene hasta que el embrión alcanza el estadio de blastocisto, por lo que cualquier alteración en la función, cantidad, distribución y ultraestructura mitocondrial podrían resultar en alteraciones del desarrollo embrionario preimplantacionales (Hao et al., 2024).

Aunque el número de mitocondrias por ovocito es mayor que en cualquier otra célula de mamífero, su número y actividad disminuyen con la edad y en respuesta a diferentes tipos de factores estresantes, como el estrés oxidativo o el daño del ADN. Cuando estos factores superan la capacidad adaptativa de las mitocondrias para restaurar la homeostasis, conducen a una disfunción mitocondrial (Hu et al., 2024; Motta et al., 2000). Varios estudios muestran además que las mujeres con disminución de la reserva ovárica presentan un menor número de copias de ADNmt, asociándose este efecto con alteraciones en la competencia del ovocito (Boucret et al., 2015; Hou et al., 2019; Urs et al., 2020).

Todas estas evidencias muestran a la mitocondria como un factor clave en los procesos de reproducción femeninos y permiten sugerir que las terapias que mejoren la actividad mitocondrial podrían dar como resultado mejoras en la competencia de los ovocitos.

Ácido dicloracético

El ácido dicloroacético (DCA) es un ácido haloacético capaz de inhibir a la enzima piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK) y aumentar la actividad de la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH) evitando su fosforilación y manteniéndola en su forma activa (Miquel et al., 2012). Al promover la entrada de piruvato en el ciclo de Krebs y la formación de acetil-CoA y citrato, mejora el metabolismo oxidativo. Esto conduce a un aumento de la producción de ROS en células con un metabolismo predominantemente anaerobio, pero no en células con metabolismo aeróbico. Esto lleva además a una diminución de la producción de lactato (de Mey et al., 2020; Michelakis et al., 2008). El DCA aumenta la oxidación periférica de lactato y alanina y previene la acidosis láctica al estimular la PDH, inhibiendo la síntesis hepática de glucosa y estimulando su utilización por los tejidos periféricos, mejorando así el estado funcional de las mitocondrias (Pala et al., 2021).

En el ovario el crecimiento folicular va acompañado de un aumento del gasto energético. Diferentes estudios han demostrado que los niveles de piruvato de folículos en etapa primaria y fases previas a la ovulación aumentan 2 y 9 veces respectivamente (Harris et al., 2009; Sugiura et al., 2007).

El DCA se genera como subproducto durante la cloración del agua y puede estar presente en el agua potable y en piscinas (Jahnke et al., 2018; Kankotia & Stacpoole, 2014). Existen algunos informes sobre su actividad en las funciones reproductivas, cuyos resultados son contradictorios. El DCA mejoró la fibrosis y la degeneración, así como la reserva ovárica en los ovarios de ratas diabéticas (Pala et al., 2021). Además, la exposición *in vitro* de ovocitos bovinos al DCA activa las vías metabólicas durante el proceso de maduración *in vitro* (Da Silva et al., 2023). Varios estudios también han demostrado el efecto anti-fibrótico del DCA en diversos modelos, como la enfermedad renal crónica (Wei et al., 2019), la hipertensión arterial pulmonar (Tian et al., 2020) o el daño endometrial inducido por la hiperglucemia (Pala et al., 2021). Por otro lado, se propone que el DCA es un disruptor endocrino reproductivo, ya que induce una reducción significativa de la expresión de los receptores de estrógeno (alfa y beta) en el ovario de ratón, un aumento de la FSH y una disminución de las concentraciones séricas de

estradiol y progesterona (Chen et al., 2024). Asimismo, Deng et al han demostrado que el contenido urinario de DCA se asoció negativamente con el recuento de folículos antrales en mujeres (Deng et al., 2022). Se describe en la literatura su posible aplicación en el tratamiento de enfermedades oncológicas, lo que aún se encuentra en fase de ensayo clínico (Stacpoole, 2017), si bien está caracterizado para el tratamiento de la acidosis láctica tanto aguda como crónica (Tataranni & Piccoli, 2019).

Por lo expuesto resulta relevante conocer si al introducir al modelo un agente que estimule el ingreso del piruvato al ciclo de Krebs y por consiguiente favorezca la función mitocondrial se puede mejorar la función ovárica y finalmente la calidad ovocitaria.

Quimioterápicos

Las primeras fases de desarrollo de quimioterápicos se localizan en la década del 40, con el uso de antagonistas del ácido fólico y mostazas nitrogenadas para el tratamiento de la leucemia aguda en niños, siendo esto el comienzo del constante avance en los fármacos quimioterápicos (Galmarini et al., 2012). Años después se utilizó el metrotexato en tratamiento de tumores sólidos, siendo una de las primeras veces que se observó regresión tumoral y se estableció el concepto de que las enfermedades oncológicas son sensibles a fármacos específicos (Buckle, 1959). También en la década del 40 se inició el tratamiento empírico de mustina (agente alquilante) a pacientes con linfoma no Hodgkin, consiguiendo una reducción de la masa tumoral, impulsándose así el desarrollo de otros agentes alquilantes como el clorombucilo y la ciclofosfamida, conocidos por su inhibición a la replicación del ADN (Galmarini et al., 2012). Luego de 1970 y con el avance en el entendimiento de los procesos biológicos se conocen otras familias de fármacos antitumorales, como algunos antibióticos (actinomicina D, bleomicina, antraciclinas), antimitóticos (alcaloides de la vinca), el cisplatino entre otros, desarrollando tres pilares fundamentales de los tratamientos oncológicos, la administración intermitente de los fármacos, la combinación de fármacos con distintos mecanismos de acción y el tratamiento del cáncer como

enfermedad sistémica. Hacia los años 90 los tratamientos quimioterápicos fueron avanzando hacia una terapia dirigida, acompañado del conocimiento de oncogenes, genes supresores y vías de señalización (Edith A. Perez et al., 2005; Rian et al., 2001). Los avances de los tratamientos dirigidos a las enfermedades oncológicas trajeron consigo repercusiones sobre otros órganos sensibles a estas drogas. El aumento de la aparición de enfermedades oncológicas en edades tempranas hace que sea inevitable pensar en la repercusión de los tratamientos en la salud sexual y reproductiva de las mujeres. El cáncer de mama, cáncer más frecuente en mujeres aumentó su casuística en mujeres premenopáusicas en la última década, reportándose un incremento del 10% de incidencia en mujeres menores de 40 años (Bardia & Hurvitz, 2018). Sin embargo, gracias a los avances en los tratamientos, el número de pacientes que sobreviven a la enfermedad se ha visto incrementado. Por lo tanto, es de particular interés en este trabajo el estudio de los efectos de las drogas quimioterápicas sobre el ovario y la reserva ovárica dado que la tasa de supervivencia relativa a 5 años aumento del 49% en la década de los 70 al 69% entre el 2013 y 2019 (Siegel et al., 2025). Además, las mujeres con diagnóstico de cáncer tienen un 38% menos de probabilidad de quedar embarazadas (Spears et al., 2019) por lo que surge así la necesidad de un abordaje específico que considere las necesidades de las mujeres en etapa reproductiva con diagnóstico oncológico, ofreciendo mejorar la calidad de vida, respetando los derechos sexuales y reproductivos, a través de la preservación de la fertilidad y la planificación familiar. Esta disciplina llamada “Oncofertilidad” desde 2005, conjuga los aspectos reproductivos y oncológicos necesarios para lograr el tratamiento más adecuado considerando el deseo reproductivo (Woodruff, 2015).

Los efectos de la quimioterapia sobre la fertilidad varían desde la reducción de la concentración de AMH circulante, la reducción o pérdida de la fertilidad hasta una menopausia precoz (Romito et al., 2021). Estos factores pueden ser causados por el aumento del estrés oxidativo generado durante el periodo de tratamiento (Luderer, 2014), provocando oxidación del ADN y proteínas, con disfunción de membranas, organelos, y la aparición de apoptosis y necrosis entre otros (Aboutalebi et al., 2025). Además de inducir directamente la apoptosis folicular, los agentes quimioterápicos pueden afectar indirectamente la función

ovárica al dañar el microambiente ovárico. La supervivencia folicular y la foliculogénesis dependen también de las propiedades mecánicas de la matriz extracelular (MEC) ovárica, y cualquier alteración de estas propiedades mecánicas puede conducir a la disfunción ovárica y, eventualmente, acelerará el envejecimiento ovárico (Guo et al., 2024), mecanismos que se ejemplifican en la Fig. 7.

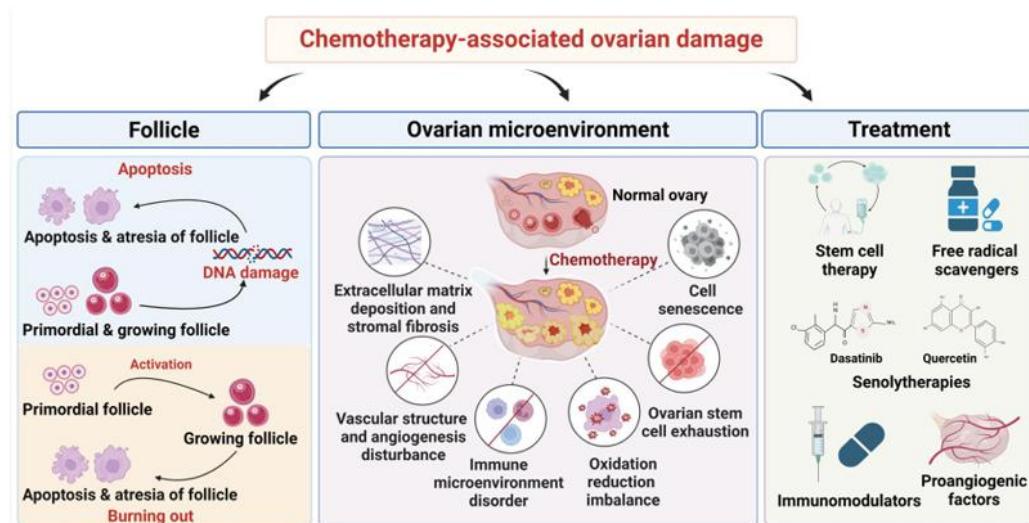


Fig. 7 – Daños ováricos asociados a la quimioterapia. La imagen muestra el desbalance del microambiente ovárico inducido por los tratamientos quimioterápicos y sus posibles intervenciones. Tomado de (Guo et al., 2024).

El efecto gonadotóxico de los quimioterápicos depende del tipo de fármaco administrado, la dosis utilizada y el plan administrado. Las enfermedades oncológicas se dividen en tres categorías con relación al riesgo de infertilidad, riesgo bajo, riesgo medio y riesgo alto. Estas categorías están determinadas por el tipo de protocolo utilizado para el tratamiento por lo que esta clasificación permite determinar el riesgo reproductivo al que se enfrenta cada paciente teniendo en cuenta además del tratamiento, la edad y la reserva ovárica previa (Feldberg & Purandare, 2025). El grado de insuficiencia ovárica varía según la toxicidad de las drogas quimioterápicas. Los agentes alquilantes pertenecen al grupo de riesgo alto en la generación de insuficiencia ovárica; los agentes en base a platino son de riesgo intermedio y los antimetabolitos y los taxanos se clasifican como de riesgo bajo (Feldberg & Purandare, 2025). En muchos casos para aumentar la eficacia de los tratamientos, éstos se realizan con

combinaciones de fármacos específicos. Algunos de los planes más conocidos son el MOPP (mecloretamina, vincristina, pracaibozina y prednisona) y ABVD (adriamicina, bleomicina, vincristina y dacarbazina) para el tratamiento del linfoma de Hodgkin y CHOP (ciclofosfamida, doxirubicina, vincristina y prednisona) para el linfoma no Hodgkin (Bhardwaj et al., 2023).

Un resumen de la clasificación de estas drogas se puede ver en la Fig. 8, sin embargo, es importante considerar que a medida que las investigaciones en el área avanzan, los fármacos pueden presentar variabilidad en su clasificación.

	High Risk (>80%)	Intermediate Risk (20–80%)	Low/Very Low Risk (<20%)	Unknown Risk
Alkylating Agents				
Cyclophosphamide	✓			
Carmustine	✓			
Ifosfamide	✓			
Busulfan	✓			
Chlorambucil	✓			
Melphalan	✓			
Procarbazine	✓			
Nitrogen mustard	✓			
Antimetabolites				
Cytarabine		✓	✓	
Methotrexate			✓	
Mercaptopurine			✓	
Fluorouracil			✓	
Gemcitabine			✓	
Antimitotic Cytostatics				
Vinblastine		✓	✓	
Vincristine			✓	
Taxanes		✓		✓
Anti-tumor Antibiotics				
Bleomycin			✓	✓
Dactinomycin			✓	
Daunorubicin			✓	
Doxorubicin		✓	✓	
Epirubicin			✓	
Mitomycin			✓	
Topo-isomerase Inhibitors				
Etoposide		✓		
Irinotecan				✓

Fig. 8 – Agentes quimioterápicos y riesgo gonadotóxico asociado. Tomado de (Himpe et al., 2023).

Vincristina

La vincristina y otros alcaloides de la Vinca como vinblastina, vinorelbina, y vindesina son utilizados como agentes quimioterápicos. Se obtienen a partir de la planta *Vinca rosae* y forman parte de los compuestos anti-tubulina como el paclitaxel. La vincristina tiene como mecanismo de acción más caracterizado la desestabilización de los microtúbulos, en particular los que forman parte del huso mitótico, generando la detención de la metafase e inhibiendo así la proliferación celular (Moudi et al., 2013). La mitosis es fundamental para el crecimiento folicular por lo que su afectación durante los tratamientos con vincristina es esperable. Se ha demostrado la efectividad de esta droga en el tratamiento de enfermedades hematológicas que se presentan en poblaciones pediátricas, así como adultas-jóvenes como son los linfomas, leucemia linfooblástica, neuroblastoma, sarcoma y tumores del sistema nervioso central entre otros. El plan terapéutico en estas patologías oncológicas se plantea en conjunción con más de un grupo de drogas quimioterápicas, es por esta razón que resulta difícil comprender el efecto individual que cada grupo farmacológico tiene sobre los distintos órganos diana y los efectos no deseados en otros órganos y sistemas (Triarico et al., 2021). Uno de los efectos adversos bien caracterizados del uso de la vincristina es la neuropatía periférica, caracterizado por alteraciones en la funcionalidad de los nervios periféricos, con manifestaciones de hormigueo, entumecimiento, debilidad y dolor. Su mecanismo de acción es causado por la alteración del transporte axonal inducido por la disrupción de la estructura de los microtúbulos y disfunción axonal. La aparición de estos síntomas es un criterio de suspensión del tratamiento al generar severa neurotoxicidad (Triarico et al., 2021).

Aunque la vincristina es un fármaco que se encuentra catalogado dentro de los grupos de bajo riesgo de gonadotoxicidad, un estudio reciente en un modelo murino ha reportado que su administración provoca disminución de los folículos en crecimiento (primarios y secundarios) y aumento en los índices de atresia folicular, pero poco se describe sobre el efecto de este tratamiento en los folículos primordiales (Winship et al., 2019). Recientemente también se ha descrito que su administración induce daño mitocondrial. Se reporta que el daño

mitocondrial se produce por un aumento del proceso de la fisión, evidenciado por un aumento de la expresión de la forma fosforilada de Drp1 (dynamin related protein 1) y de la Fis1 (mitochondrial fission protein 1) mientras que la fusión mitocondrial se inhibe (Wang & Hutt, 2021). Estas proteínas aseguran que las mitocondrias dañadas se separen (fisión) y se eliminen para mantener la salud general de la red mitocondrial. Las mitocondrias disfuncionales sufren despolarización de su membrana y son degradadas a través del proceso de mitofagia (Picca et al., 2018). Sumado a este efecto se identificó que la vincristina influye en la homeostasis del calcio (Ca^{2+}) reduciendo su absorción y disminuyendo su salida, con la consecuente liberación de ROS, conduciendo al incremento de la excitabilidad neuronal y glial y activación de la apoptosis.

HIPÓTESIS

Los efectos de la vincristina han sido ampliamente caracterizados en modelos de neuropatía periférica; sin embargo, su impacto sobre el ovario permanece poco explorado, especialmente en lo que respecta a la población de folículos primordiales. Hasta el momento, no se han reportado estudios que evalúen si el DCA sería capaz de mitigar o revertir los posibles efectos negativos inducidos por el tratamiento con vincristina.

Teniendo en cuenta los antecedentes presentados, se plantea como hipótesis del trabajo que **la administración de vincristina provoca efectos deletéreos sobre el ovario, en particular sobre la reserva de folículos primordiales, destacando a la mitocondria como posible blanco, por lo que al modular su función por la administración de DCA, disminuiría dicho efecto.**

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar si la modulación mitocondrial inducida por DCA resulta protectora frente a los efectos generados por la vincristina en ovarios murinos adultos.

Objetivos específicos

- 1) Evaluar el efecto gonadotóxico de la vincristina en ratonas adultas jóvenes.
- 2) Caracterizar y comparar el efecto del DCA sobre el ovario y en particular la población folicular en hembras expuestas y no expuestas a vincristina.
- 3) Caracterizar los patrones de atresia y activación folicular, frente a la exposición a las distintas drogas.
- 4) Evaluar los posibles efectos del tratamiento sobre los ovocitos luego de 4 semanas de finalizado el mismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Todas las aproximaciones experimentales utilizadas en este trabajo de tesis fueron realizadas sobre ratones hembra de la cepa C57BL/6 de 8 semanas de edad (19 ± 1 g), provenientes de la colonia de la Unidad de Reactivos para Biomodelos de Experimentación (URBE) de la Facultad de Medicina-UdelaR. Los animales fueron alojados en cajas plásticas con cama de viruta estéril, proporcionándoles alimentos y agua *ad libitum* y mantenidos bajo condiciones constantes de temperatura (21-22°C) e iluminación (12 h. luz/12 h. oscuridad). Dos grupos de animales fueron tratados con sulfato de vincristina (disuelto en solución salina) a dosis de 100 µg/kg/día por vía intraperitoneal, o solución salina por vía intraperitoneal, por un total de 10 días repartidos en dos ciclos de 5 días cada uno y con 48 horas de descanso en la mitad del tratamiento (Fig.9). La dosis de vincristina fue elegida de acuerdo con reportes previos en la literatura (Höke & Ray, 2014). El DCA se administró en el agua de beber a razón de 500 mg/L *ad libitum* protegido de la luz y con un recambio cada 48 horas (Miquel et al., 2012). Se estima una dosis diaria aproximada de 125 mg/kg (basado en un consumo diario promedio de 5 ml de agua). Dos grupos recibieron DCA en la semana previa y durante todo el tratamiento con vincristina. Para asegurar resultados representativos, cada experimento fue repetido al menos 4 veces.

Los animales fueron asignados a uno de los siguientes grupos experimentales:

- **Grupo VH** - se le administro sulfato de vincristina (ip) y recibió agua de beber sin aditivos.
- **Grupo VD** - recibió el mismo tratamiento con sulfato de vincristina (ip) y simultáneamente DCA a en el agua de beber.
- **Grupo SD** - recibió solución salina (ip) y DCA en el agua de beber.
- **Grupo SH** - recibió solución salina (ip), sin ningún agregado en el agua de beber (control).

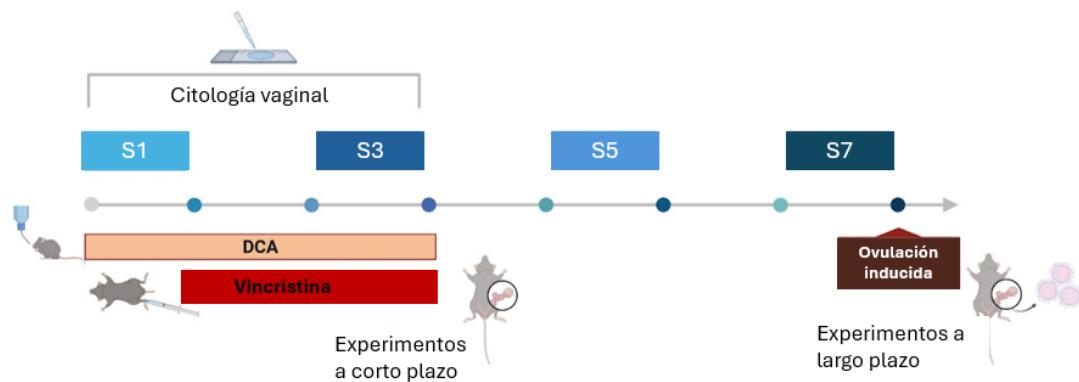


Fig. 9 – Modelo experimental: se muestra la estrategia utilizada para los experimentos tanto a corto como largo plazo. S1-S7: Semana 1- Semana 7

El protocolo experimental fue evaluado y aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la Universidad de la República (Nº 070151-500140-21) garantizando el cumplimiento de las normativas de la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA) sobre aspectos éticos en investigación. Durante todo el periodo experimental se controló el peso corporal, la ingesta de agua y se monitoreo el ciclo estral mediante la realización diaria de frotis vaginales.

Control del ciclo estral por colpocitología vaginal exfoliativa

Normalmente las ratonas presentan ciclos estrales con una duración aproximada de 4-5 días. Esta secuencia se ve interrumpida en situaciones de gestación, lactación o vejez. Para verificar el correcto funcionamiento del eje hormonal que permite la ciclicidad, se controló el ciclo estral mediante frotis vaginales diarios en la semana previa al inicio y durante la exposición a vincristina. Clásicamente en los frotis vaginales se pueden reconocer hasta cuatro etapas del ciclo estral, proestro, estro, metaestro y diestro (Fig. 10). Cada fase se reconoce al microscopio con las siguientes características celulares (Saldaña & Chávez-Genaro, 2023).

- En proestro observaremos una mezcla de células, algunas pocas basales, muchas parabasales e intermedias y algunas poligonales queratinizadas.
- En el estro se observan, casi en su totalidad, grandes células poligonales superficiales queratinizadas.
- En metaestro o diestro se observan gran cantidad células epiteliales pequeñas o medianas, a las que les distingue el núcleo y se observan además abundantes leucocitos.

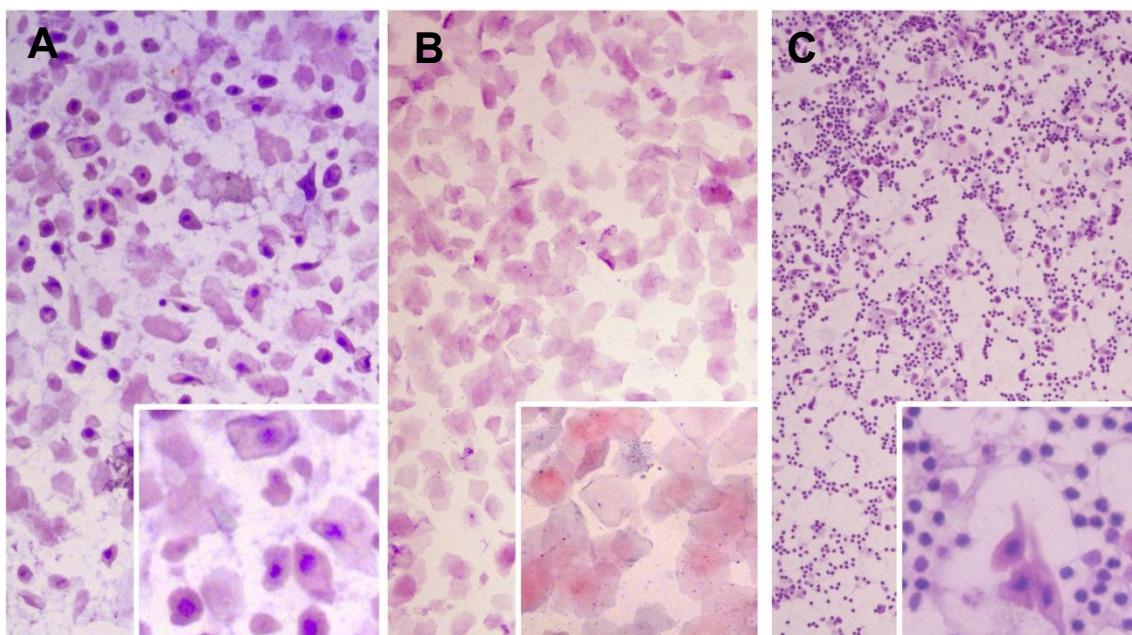


Fig. 10 - Imágenes representativas del proestro (A), estro (B) y diestro (C), luego de la tinción con hematoxilina-eosina. Las imágenes fueron obtenidas a mediano aumento (10x), y las de los recuadros a 40X

Para llevar a cabo esta técnica se utilizó solución fisiológica estéril (15 µl), que se introdujo con pipeta por el orificio vaginal de la ratona realizando un pequeño lavado vaginal. La muestra obtenida se depositó sobre un portaobjetos, se secó al aire y se coloreó con hematoxilina y eosina obteniéndose un extendido vaginal coloreado que favorece su observación al microscopio y clasificación de acuerdo con las características celulares.

Las muestras fueron obtenidas diariamente a una hora constante en la mañana (entre las 9 y las 10 AM). Con el registro se confeccionaron gráficas que permitieron analizar los pasajes por los distintos estadios. Dadas las similitudes

entre las etapas de metaestro y diestro se clasificaron ambas como diestro (Saldaña & Chávez-Genaro, 2023).

Obtención de muestras biológicas

Veinticuatro horas luego de culminado el tratamiento los animales fueron anestesiados profundamente con una mezcla de ketamina (Ketonal 50®, Richmond Veterinaria S.A. Buenos Aires-Argentina) y xilacina (Xilacina 20®, Richmond Veterinaria S.A. Buenos Aires-Argentina) en dosis de 100 mg/kg y 5 mg/kg respectivamente, y sacrificados mediante dislocación cervical o perfundidos con solución fijadora (paraformaldehído al 4% en PBS - PFA). Los ovarios fueron disecados rápidamente y mantenidos en fijador durante 24 h para luego ser transferidas a etanol 70% en el que se mantuvieron hasta su procesamiento.

Análisis morfológico

Al menos 6 ovarios por grupo (de animales y repeticiones diferentes) fueron procesados para histología clásica y coloración con Hematoxilina y Eosina. Las muestras ya fijadas y mantenidas en etanol 70% fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de alcohol (95 y 100%) mediante pasajes sucesivos durante al menos 40 minutos en cada uno. Luego de finalizada la deshidratación se realizó el aclaramiento sustituyendo el deshidratante por un agente miscible con el medio de inclusión, en nuestro laboratorio se utiliza cloroformo como agente aclarante (20 min). Posteriormente se realizó la impregnación en parafina, donde se colocaron las muestras en parafina fundida en estufa de 60°C por un periodo de 20 minutos, para finalmente incluir el material biológico en un bloque de parafina. Luego de enfriada la parafina, quedo confeccionado el bloque.

El bloque fue tallado y llevado al micrótomo donde se obtuvieron cortes seriados de 6 µm de espesor, posteriormente se colorearon con Hematoxilina – Eosina.

Los cortes obtenidos fueron utilizados para el análisis de los distintos parámetros que se detallan a continuación:

- 1) **Determinación del volumen ovárico.** Se utilizó una aproximación estereológica basada en el principio de Cavalieri para determinar el volumen del ovario a partir de cortes seriados del mismo. En forma sistemática, a cada décimo corte se le tomó una fotografía en lupa a un aumento de 5X y se le aplicó una grilla de puntos ubicados a una distancia fija que delimita un área correspondiente a $20.000 \mu\text{m}^2$ ($0,02 \text{ mm}^2$) y se contaron los puntos que se ubicaron sobre la imagen del órgano. El número total de puntos a lo largo de todos los cortes analizados se utilizan para determinar el volumen que se calcula aplicando una fórmula que considera el espesor de los cortes y el área entre los puntos (Mühlfeld et al., 2010)

$$\text{Vol ovárico (mm}^3\text{)} = \Sigma (\text{Nº de puntos}) \times \text{distancia entre cortes (mm)} \times \text{area}^2 \text{ de la grilla (mm}^2\text{)}$$

Esta estimación nos permitió evaluar de forma rápida el volumen del ovario e inferir de acuerdo con este parámetro, posibles cambios en la estructura interna del mismo como pueden ser folículos antrales con cavidades grandes o cambios en el número de cuerpos lúteos.

- 2) **Recuento de la población folicular.** Se obtuvieron cortes seriados de ovario de los diferentes grupos experimentales ($n=6$) que fueron coloreados con Hematoxilina-Eosina y examinados a un aumento de 40X cada quinto corte. Se clasificaron y registraron el número de folículos primordiales, preantrales y antrales tanto sanos como atrésicos en los que se pudiera evidenciar la presencia del núcleo y nucleolo del ovocito, evitando de esta manera conteos dobles (Anesetti & Chávez-Genaro, 2016).

El recuento folicular se realizó adaptando los criterios de clasificación folicular de (Mazaud et al., 2002)

- **Folículo primordial:** ovocito completamente rodeado por células pregranulosas planas.
- **Folículo primario unilaminar:** ovocito con una capa de células cúbicas o la aparición de éstas entre células planas
- **Folículo preantral o primario multilaminar:** ovocito rodeado por al menos dos capas de células de la granulosa sin formación de antro.
- **Folículo antral:** ovocito rodeado por más de dos capas de células de la granulosa con antro presente.
- **Folículo atrésico preantral:** ovocito en degeneración o al menos dos células de la granulosa picnóticas.
- **Folículo atrésico antral:** picnosis en células de la granulosa, picnosis en células de la granulosa con ovocito en degeneración, ovocitos degenerados con pocas células de la granulosa picnóticas y teca interna hipertrofiada.

Inmunohistoquímica

Todas las técnicas de inmunohistoquímica realizadas en el presente trabajo siguieron los protocolos habituales utilizados en el laboratorio (Chávez-Genaro & Anesetti, 2018). Para realizar esta técnica se utilizaron cortes en parafina de ovarios montados sobre portaobjetos silanizados lo que permite una mejor adherencia del material al portaobjetos evitando desprendimientos con los procesos posteriores. Los cortes fueron desparafinados en xilol e hidratados en soluciones de concentraciones decrecientes de etanol hasta su hidratación completa en agua destilada. Luego se realizó la reactivación antigénica en buffer citrato 10 mM pH 6 en microondas por 10 minutos con posterior enfriado durante 20 minutos y se inactivaron las peroxidases endógenas con H₂O₂ en PBS por 30 minutos. Los cortes fueron lavados con PBS, permeabilizados y bloqueados con una solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 2% y Tritón al 0,2% diluidos en PBS durante una hora. Luego los cortes fueron incubados durante toda la noche a temperatura ambiente con el anticuerpo primario en PBS en las diluciones especificadas en la Tabla 1.

Al día siguiente se realizaron lavados sucesivos con PBS, los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente diluido en PBS por una hora, seguido de los lavados se incubaron con el complejo streptavidina-peroxidasa por 30 minutos, y revelados utilizando diaminobencidina como cromógeno. La reacción se detuvo con la inmersión de los portaobjetos en agua corriente. Los cortes fueron contracoloreados con hematoxilina, y luego deshidratados en concentraciones crecientes de etanol, clarificados en xilol y montados con DPX. En todos los casos se incluyeron controles negativos que se realizaron reemplazando el anticuerpo primario por solución bloqueante. Cada inmuno-reacción se realizó por triplicado, donde cada portaobjetos contenía entre 3-4 cortes representativos de toda la extensión del ovario.

Anticuerpos	Origen	Proveedor	Tiempo de incubación	Dilución	Técnica
Primarios					
Ki-67	Monoclonal, Conejo.	Cell Signaling Technology	Toda la noche	1:800	IHQ
Caspasa 3 activada	Monoclonal, Conejo.	Cell Signaling Technology	Toda la noche	1:2000	IHQ
FoxO3a	Monoclonal, Conejo.	Cell Signaling Technology	Toda la noche	1:1600	IHQ
Hormona anti-mulleriana	Policlonal, Cabra.	Santa Cruz biotechnology	Toda la noche	1:200	IHQ
PDH1	Monoclonal, Ratón.	Abcam	Toda la noche	1:800	WB
PDH fosforilada (fosfo S293)	Policlonal, Conejo.	Abcam	Toda la noche	1:2000	WB
Catalasa	Monoclonal, Conejo.	Cell Signaling Technology	Toda la noche	1:1000	WB
SOD2	Monoclonal, Conejo.	Cell Signaling Technology	Toda la noche	1:1000	WB
GAPDH	Monoclonal, Conejo.	Abcam	Toda la noche	1:10000	WB
Actina	Monoclonal, Ratón.	Cell Signaling Technology	Toda la noche	1:1000	WB
anti α/β tubulina	Monoclonal, Conejo	Cell Signaling Technology,	Toda la noche	1:100	IF
Secundarios					
anti- IgG ratón	Policlonal, cabra. Marcador verde.	Li-Cor	1 hora	1:5000	WB
anti- IgG conejo	Policlonal, cabra. Marcador rojo.	Li-Cor	1 hora	1:5000	WB
anti-IgG cabra biotinilado	Policlonal, burro.	Invitrogen	1 hora	1:400	WB/IHQ
anti-IgG conejo biotinilado	Policlonal, cabra	Jackson Immunoresearch	1 hora	1:500	IHQ
anti-IgG ratón biotinilado	Policlonal, cabra	Jackson Immunoresearch	1 hora	1:500	IHQ
anti-IgG conejo Alexa Fluor 488	Policlonal, cabra	Thermo-Fisher	1 hora	1:500	IF

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en el desarrollo de esta tesis.

IHQ (Inmunohistoquímica); IF (inmunofluorescencia); WB (Inmunoblotting)

Los anticuerpos primarios utilizados fueron seleccionados para evaluar:

- **Atresia folicular:**

La estimación del índice de atresia folicular se realizó mediante la inmunodetección de la caspasa 3 clivada, estado en el que la enzima se encuentra activa. Se considera que un folículo en crecimiento con al menos 5 células de la granulosa marcadas con este anticuerpo se encuentra en vías de atresia. El índice de atresia fue expresado como el porcentaje de folículos atrésicos frente al total de folículos en crecimiento contados (Hussein, 2005).

- **Activación de folículos primordiales:**

El estado de reposo o de activación de los folículos primordiales fue determinado mediante la detección de la localización del factor de transcripción FoxO3a. Se consideraron en reposo aquellos folículos en que la marca estaba presente en el núcleo del ovocito y como folículos activados aquellos en los que la marca estaba desplazada al citoplasma. El índice de activación fue expresado como el porcentaje de folículos con marca citoplasmática frente al total de folículos contados (Hardy, K., et al. 2018). En el conteo se incluyeron folículos primordiales, en transición y primarios.

El marcador Ki-67 que es una proteína nuclear no histónica que se expresa en las células proliferantes (fases G1, S, G2 y M del ciclo celular) y está ausente en las células quiescentes (G0) por lo que se considera un excelente indicador de proliferación celular (Weigel & Dowsett, 2010). Para estimar el grado de activación folicular, se analizó la proporción de células foliculares inmunomarcadas con respecto al total de células foliculares de cada folículo primordial y primario de los distintos grupos y se expresó como promedio (Kashi et al., 2023).

- **Presencia de la hormona AMH:**

Se utilizó la inmunoreacción a AMH con el objetivo de identificar folículos en las primeras etapas del crecimiento. Se calculó el área ocupada por folículos positivos para AMH sobre el área total del ovario utilizando el plugin “threshold” del software FIJI (ImageJ 1.51w) (Pascuali et al., 2018).

Inmunoblotting

Todas las técnicas de inmunoblotting realizada en el presente trabajo siguieron los protocolos habituales en el laboratorio de Biología de la Reproducción (Anesetti & Chávez-Genaro, 2016). Muestras frescas de ovario fueron homogeneizadas en tampón de lisis (RIPA) conteniendo detergente y cóctel de xinhibidores de proteasas y sonicadas hasta su homogeneización. Se determinó la concentración de proteína en cada muestra mediante un ensayo de curva colorimétrica, ensayo de ácido bicinconínico (BCA). Una vez determinada la concentración de proteínas de cada muestra, las mismas fueron preparadas para su separación por electroforesis. Para ello, se ajustó el volumen de la muestra para que cada una tuviera la misma concentración (30 µg de proteína cada 40 µl de solución) conteniendo además buffer Laemmli, beta-mercaptopetanol y agua. Treinta microgramos de proteínas de tejido se separaron en geles de electroforesis de SDS-poliacrilamida al 12%, durante 30 minutos a 80V y luego a 110V por una hora más. Finalizada esta etapa se realizó la transferencia de las proteínas contenidas en el gel a membranas de nitrocelulosa o de PVDF por 1 hora a 100V constantes. Una vez finalizada la transferencia se corroboró el éxito de ésta mediante la tinción de la membrana con el colorante rojo Ponceau. Las membranas fueron lavadas con agua destilada y luego PBS o TBS (dependiendo del anticuerpo a utilizar) para eliminar el colorante. Las membranas fueron bloqueadas en solución de BSA al 5% en PBS o TBS durante una hora y posteriormente incubada con el anticuerpo primario de interés según la descripción del fabricante (Tabla 1) durante toda la noche a 4°C y en agitación continua. Posteriormente las membranas fueron lavadas y luego incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con un marcador infrarrojo y detectado utilizando el Odyssey infrared imaging system (LiCor, Nebraska USA). A partir de estas imágenes se determinó la intensidad de la señal, cuantificada y comparada utilizando el programa FIJI (ImageJ 1.51w).

Cuantificación de colágeno

Cortes de ovario fueron desparafinados, rehidratados y coloreados con el kit de tinción con Picro Sirius Red (Abcam, Cambridge, UK) siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego los cortes fueron deshidratados y montados. Para cada muestra se tomaron al menos 5 áreas aleatorias utilizando una cámara digital Nikon conectada a un microscopio Nikon Eclipse e600 con un objetivo de 20X. Se analizaron las imágenes para cuantificar el porcentaje promedio de área ocupada por colágeno, utilizando el software FIJI (ImageJ 1.51w). En cada grupo experimental se incluyeron muestras de al menos 5 animales.

Inducción de la ovulación y análisis del huso meiótico

Cuatro semanas después de finalizado el tratamiento, los animales se sometieron a una prueba de ovulación inducida. Este tiempo de espera (definido como largo plazo para esta tesis) se consideró para asegurar que los ovocitos obtenidos estuviesen en el estadio de folículo primordial durante el tratamiento (Kano et al., 2017). Para ello, se inyectaron 4-5 ratonas de cada grupo experimental con 5 UI de PMSG (Novormon, Zoetis SRL, Argentina) y, 48 h después, 5 UI de hCG (Chorulon, MSD Salud Animal, Argentina). Veinte horas después de terminada la administración hormonal, los animales fueron anestesiados profundamente con una solución de ketamina/xilazina a dosis de 100 mg/kg de peso corporal y 5 mg/kg, respectivamente, y seguida por eutanasia mediante dislocación cervical. Se realizó la disección de ovarios y trompas y los ovocitos ovulados se recuperaron del sector de la ampolla. Se contaron y colectaron en medio de lavado Ferticult™ (FertiPro, Bélgica) a 37 °C y se trataron con 1 mg/ml de hialuronidasa (Sigma-Aldrich, USA) en el mismo medio para separar las células del cúmulo de los ovocitos. Los ovocitos denudados se separaron y fijaron inmediatamente en una solución fresca de PFA durante 1 h. Una vez fijados fueron observados al microscopio y fotografiados a 40X para medir el diámetro de los ovocitos utilizando el software FIJI (ImageJ 1.51w). Posteriormente, los ovocitos fijados se lavaron en PBS, se permeabilizaron en

una solución conteniendo Triton X-100 al 0,25 % y BSA al 2% en PBS durante 2 h y se incubaron durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo anti- α/β tubulina según la descripción del fabricante (Tabla 1). Tras varios lavados en PBS de 10 min cada uno, los ovocitos se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 488 durante 1 h a temperatura ambiente. La cromatina se tiñó con DAPI durante 10 min, se lavó en PBS y se montó en portaobjetos de vidrio con una gota de medio antifade (Vectashield, Burlingame, USA.). Todos los ovocitos se examinaron y fotografiaron con un microscopio epifluorescente Nikon Eclipse e600. La longitud del huso se determinó utilizando el software FIJI (ImageJ 1.51w) solo cuando era evidente una clara organización del huso.

Análisis estadístico

Los datos provenientes de los distintos grupos se compararon estadísticamente utilizando el software GraphPad Prism 8 mediante la prueba de ANOVA para determinar si existían diferencias significativas entre los grupos. Para aislar el o los grupos que presentaron diferencias significativas se realizó la prueba de Tukey. En caso de que los datos no cumplieran con alguno de los supuestos de la estadística paramétrica, se procedió a comparar los datos utilizando la prueba de Kruskal–Wallis no paramétrico (ANOVA en rangos) seguido por la prueba de Dunn. Las comparaciones de proporciones se analizaron mediante la prueba de chi-cuadrado. En todos los casos se consideraron estadísticamente significativos valores de $p<0,05$.

RESULTADOS

Durante el período de tratamiento los animales tuvieron un consumo hídrico normal y no presentaron signos evidentes de dolor o malestar físico. No se registraron muertes asociadas al protocolo experimental.

Comprobación de la presencia de la enzima PDH y su modulación por DCA

Se detectó la presencia de la enzima PDH en las muestras de ovario, tanto en su forma fosforilada como no fosforilada. La relación entre ambas señales mostró disminución de la marca de PDH-P en los animales expuestos a DCA, lo que indicaría una mayor proporción de la forma activa de la enzima en este grupo en respuesta al DCA (Fig.11).

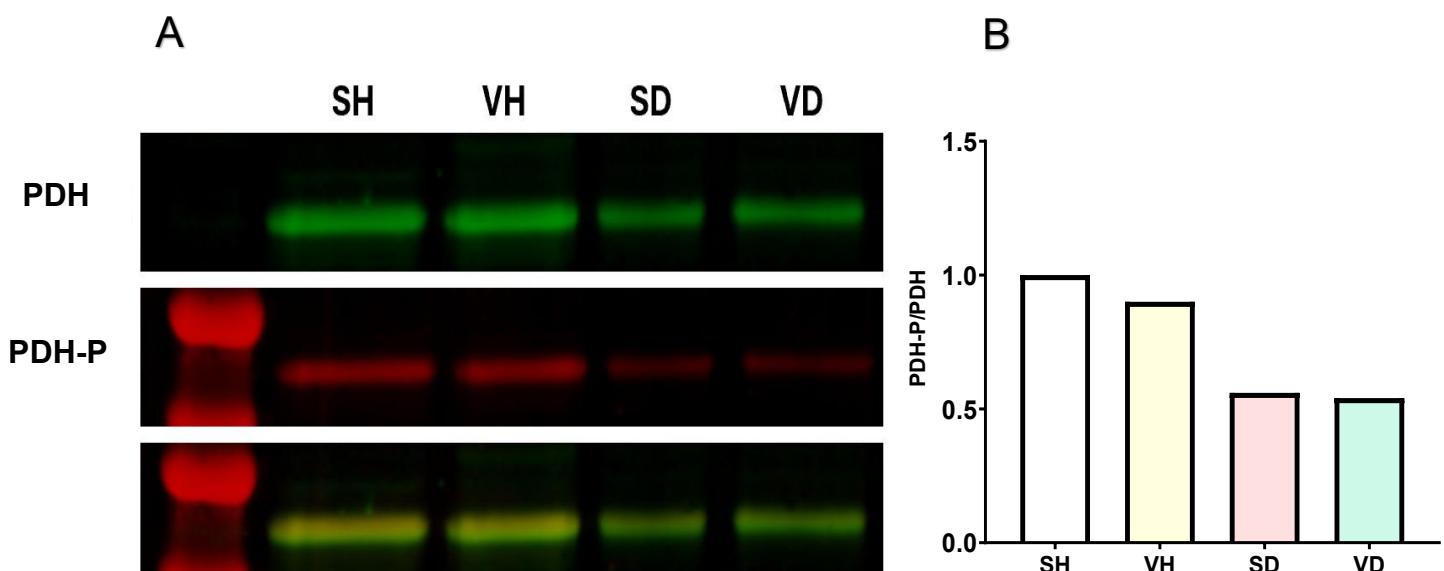


Fig.11- Detección de la presencia de enzima PDH en el ovario. En A se observa imagen representativa de WB para PDH/PDH-P y su colocalización en los diferentes tratamientos. En B se grafica la relación entre PDH-P/ PDH ($n=3$ por grupo).

SH- solución salina/ H_2O VH- vincristina/ H_2O SD-solución salina/DCA VD- vincristina/DCA

Efectos del tratamiento sobre el peso corporal

La ganancia de peso corporal al final del periodo experimental en los animales que recibieron vincristina o DCA fue semejante a lo observado en los animales control, mientras que en los animales que recibieron vincristina junto con DCA la ganancia de peso fue significativamente menor (Fig.12).

Efectos del tratamiento sobre el ciclo estral

Los animales del grupo control y aquellos expuestos a DCA mostraron periodicidad acorde con las diferentes fases del ciclo estral con una duración de entre 4 y 5 días, mientras que en el grupo al que se le administró vincristina los ciclos duraron entre 6 y 7 días, con permanencia en la fase de estro o diestro por más de dos días. En los animales expuestos a vincristina y DCA la actividad cíclica fue similar al grupo control. El análisis de la duración de cada fase del ciclo estral durante un periodo de 21 días no mostró diferencias significativas entre los grupos (Fig.13).

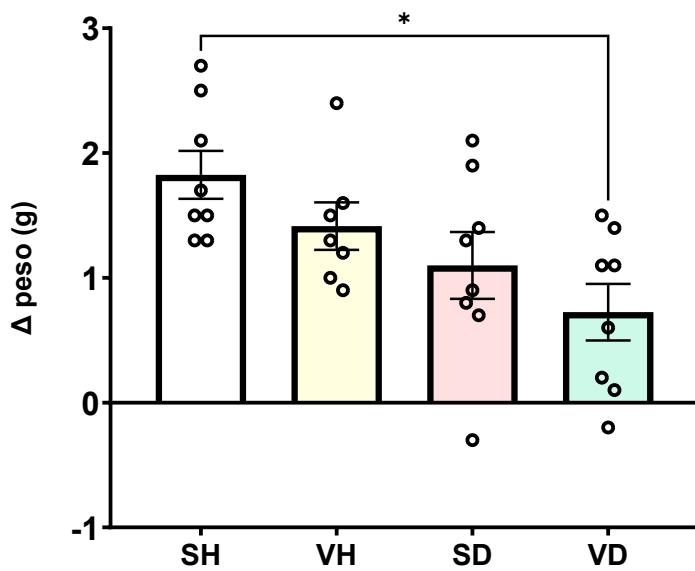


Fig. 12- Variación del peso corporal. Se grafica la variación (Δ) peso entre el inicio y el final del periodo experimental (n= 7 por grupo). (*) p<0,05.

SH- solución salina/H₂O **VH-** vincristina/H₂O **SD-**solución salina/DCA **VD-** vincristina/DCA

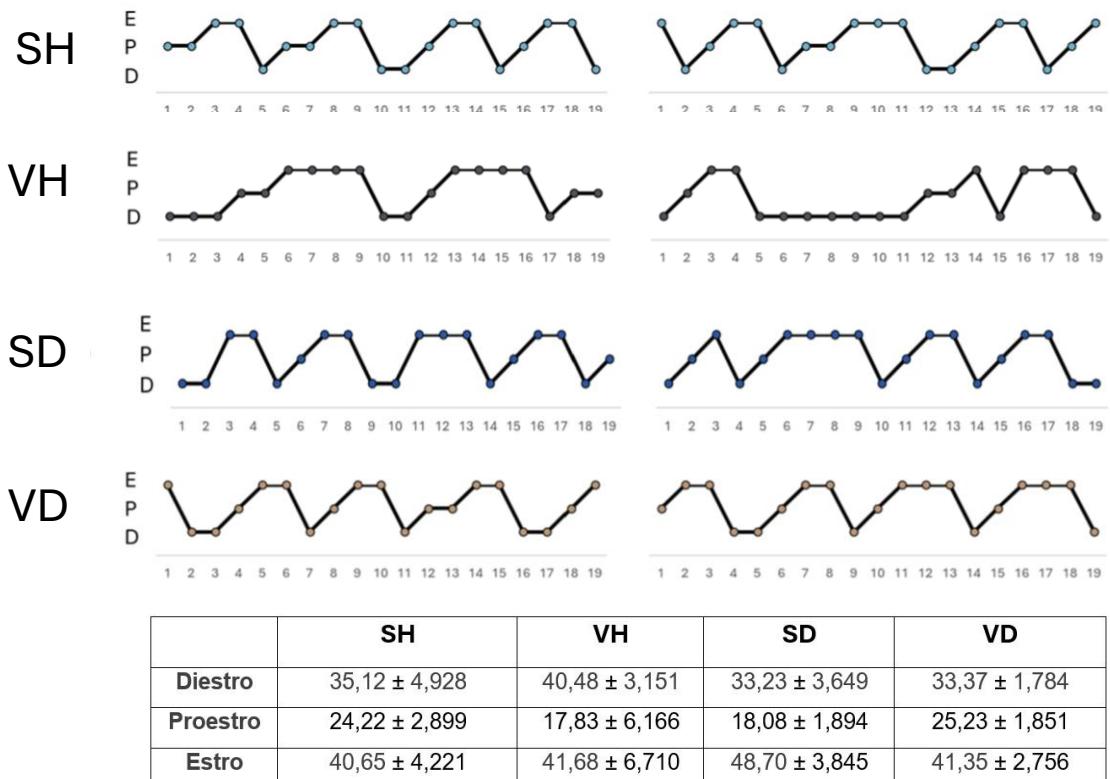


Fig. 13- Ciclo estral. Se grafica de forma representativa los ciclos estrales de dos ratonas de cada grupo experimental. E = estro, P = proestro, D = diestro. En la tabla se presenta el porcentaje promedio (\pm SEM) del tiempo en cada una de las fases del ciclo estral para cada grupo durante el periodo experimental.

Efectos sobre el ovario

A la inspección microscópica de los cortes de ovarios de los distintos grupos no se observaron diferencias morfológicas llamativas, encontrándose en todos ellos la presencia de folículos primordiales, folículos en crecimiento y cuerpos lúteos. No se encontraron estructuras quísticas en ninguno de los casos.

Volumen ovárico

No se encontraron diferencias significativas en el volumen ovárico entre los distintos grupos experimentales (Fig.14).

Población folicular

El número total de folículos primordiales no fue afectado por ninguno de los tratamientos.

En ambos grupos expuestos a vincristina se observó una disminución significativa en la población de folículos sanos en crecimiento. La administración de DCA en el agua de beber no indujo cambios significativos en esta población folicular en ninguno de los grupos estudiados.

No se detectaron folículos atrésicos en la categoría de folículos primordiales. El número total de folículos atrésicos en crecimiento no mostró diferencias entre los distintos grupos.

Cuando se analizó la proporción de folículos atrésicos con respecto a la población total de folículos en crecimiento (sanos y atrésicos), se evidenció un incremento significativo en los grupos que estuvieron expuestos a vincristina. El agregado de DCA no modificó este parámetro (Fig. 15).

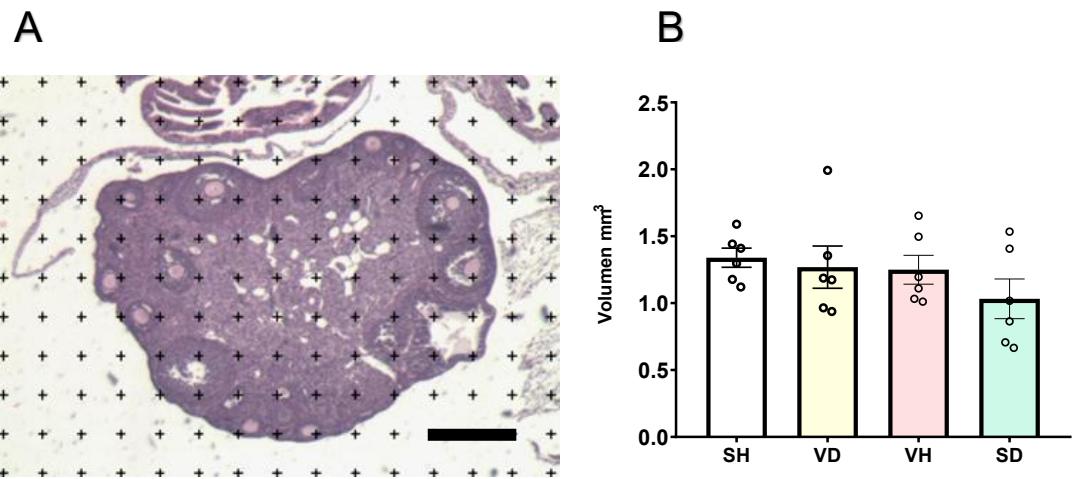


Fig. 14- Volumen ovárico. En la imagen A se observa un corte de ovario con una grilla superpuesta como las utilizadas para el cálculo del volumen del órgano. La barra de calibración corresponde a 300μm. En B se grafica el volumen calculado en los distintos tratamientos (n=5-6 por grupo).

SH- solución salina/H₂O VH- vincristina/H₂O SD-solución salina/DCA VD- vincristina/DCA

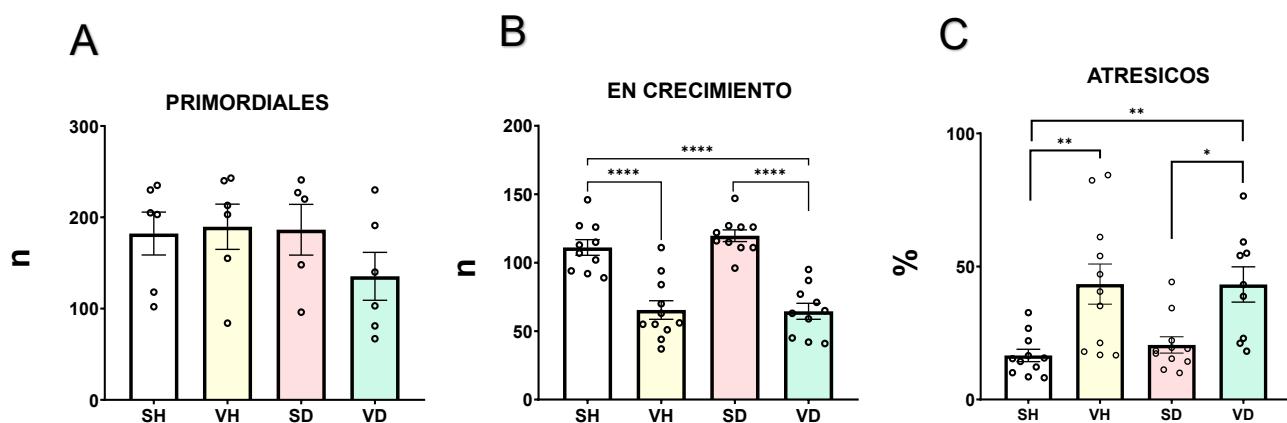


Fig. 15- Población folicular. En A se grafica el número de folículos primordiales y en B los de crecimiento en los distintos grupos experimentales; en C se grafica la proporción de folículos atrésicos con respecto al total de folículos en crecimiento (n=6-9 por grupo) (*) p<0,05, (**) p<0,01 (***) p<0,001, (****) p<0,0001.

SH- solución salina/H₂O VH- vincristina/H₂O SD-solución salina/DCA VD- vincristina/DCA

Atresia folicular – caspasa 3 activada

No se encontraron células marcadas en la población de folículos primordiales. Se observó un aumento significativo del porcentaje de folículos en crecimiento con células marcadas en los animales a los que se les administró vincristina en comparación con los animales control, sin modificación de este resultado con la administración de DCA. El incremento en la atresia folicular identificado por esta técnica afectó significativamente a la categoría de folículos antrales (Fig. 16).

Expresión de proteínas proapoptóticas

Cuantificación de la expresión de la proteína Bax realizada a partir de al menos tres experimentos diferentes. La expresión de Bax se encontró significativamente disminuida por la administración de DCA, tanto cuando se administró solo o junto con vincristina (Fig.17).

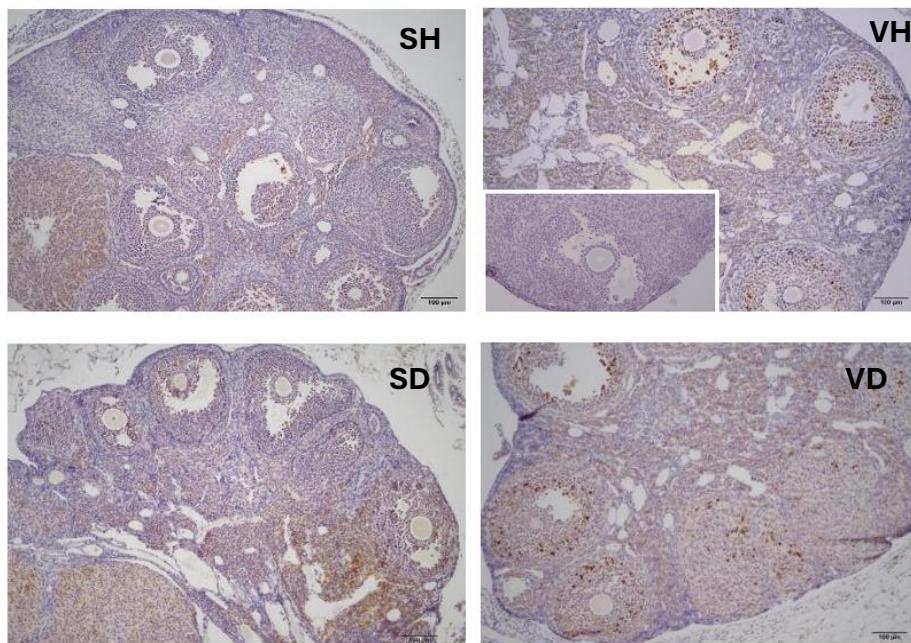
Evaluación de indicadores de estrés oxidativo

Los niveles de Catalasa aumentaron significativamente en ambos grupos expuestos a vincristina en comparación con el grupo control. Los niveles de SOD2 encontrados en los extractos de proteína completa no difirieron significativamente entre los diferentes grupos experimentales (Fig.18).

Cuantificación de colágeno

La exposición a vincristina no modificó el porcentaje de área ocupada por fibras de colágeno. La administración de DCA tendió a disminuir el porcentaje de fibras de colágeno en los ovarios en comparación con el grupo control; esta reducción fue significativa en los animales expuestos a vincristina y DCA (Fig. 19).

A



B

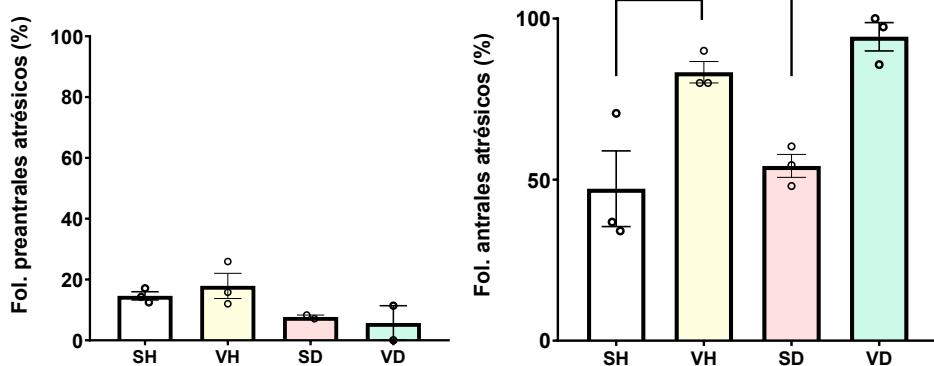


Fig.16- Detección de caspase 3 activada en ovario. En A se observan imágenes representativas de ovarios de los distintos grupos experimentales. La imagen en el recuadro muestra un control negativo. Barra de calibración corresponde a 100 μ m. En B se grafica la cuantificación del porcentaje de folículos preantrales y antrales atrésicos por inmunohistoquímica (n=3 por grupo). (*) p<0,05.

SH- solución salina/H₂O VH- vincristina/H₂O SD-solución salina/DCA VD- vincristina/DCA

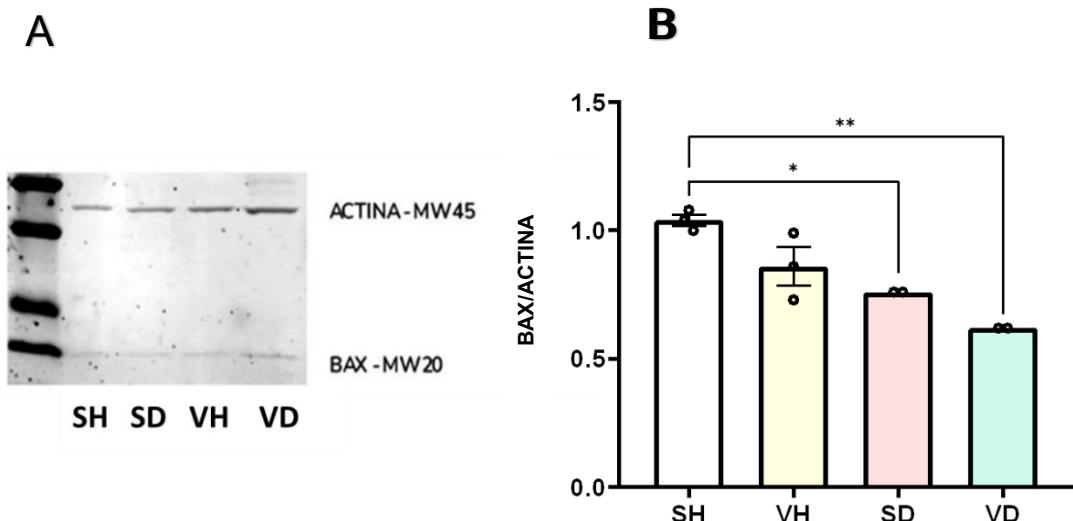


Fig. 17- Detección de Bax en ovario. En A se observa una membrana de WB representativa del ensayo realizado para evaluar la expresión de Bax, se utilizó actina como proteína de referencia. En B se grafica la cuantificación de la densidad óptica de la marca de la proteína Bax en ovarios de los distintos grupos experimentales (nótese que el orden de las muestras es diferente al del WB) ($n=3$ por grupo).

SH- solución salina/ H_2O VH- vincristina/ H_2O SD-solución salina/DCA VD- vincristina/DCA

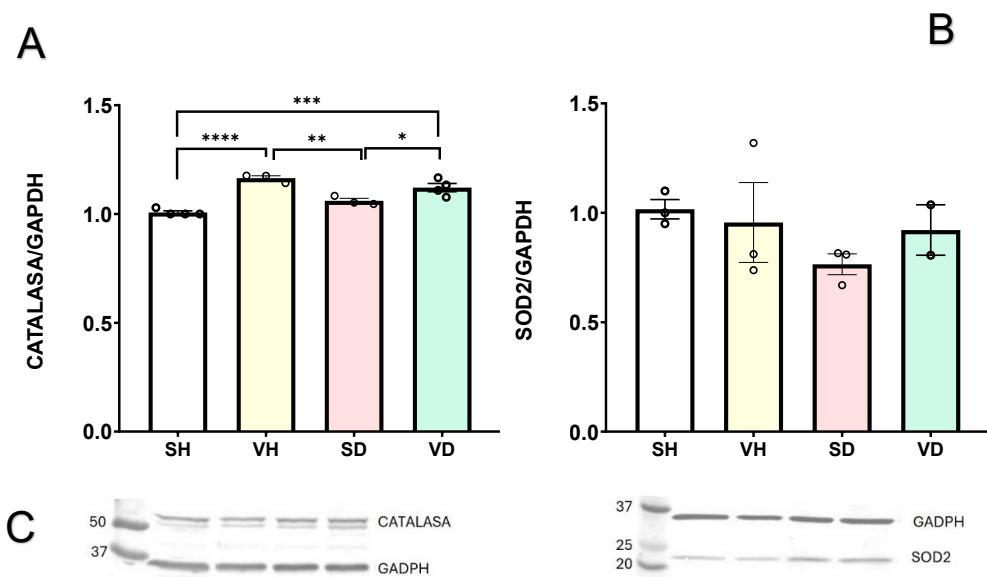


Fig.18- Detección de indicadores de estrés oxidativo en ovario. Se grafica en A la cuantificación de la densidad óptica de la marca de la proteína Catalasa y en B la de proteína SOD2. En ambos casos se utiliza GAPDH como proteína de referencia. (*) $p<0.05$, (**) $p<0.01$ (***) $p<0.001$, (****) $p<0.0001$. En C las membranas de WB representativa del ensayo realizado ($n=3$ por grupo).

SH- solución salina/ H_2O VH- vincristina/ H_2O SD-solución salina/DCA VD- vincristina/DCA

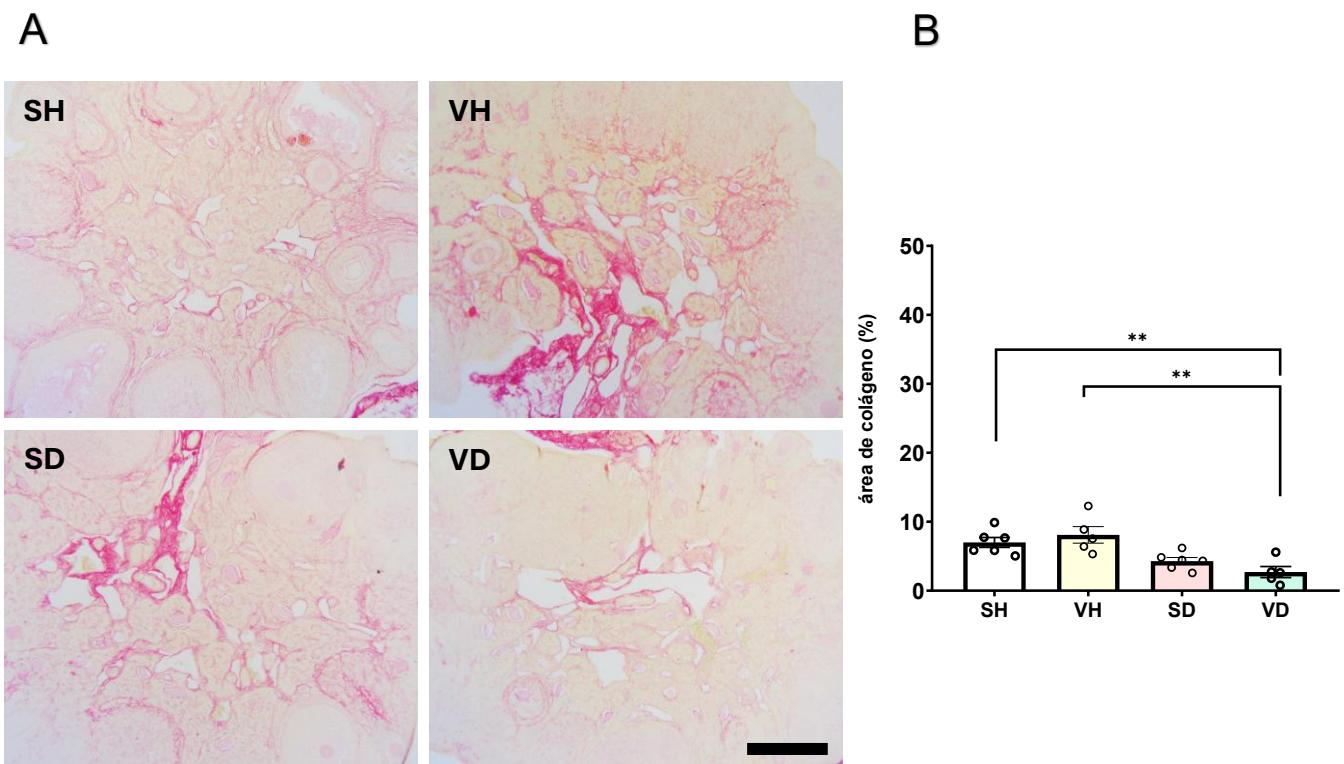


Fig.19- Detección de fibras de colágeno en ovario. En A se observan imágenes representativas de ovarios de los distintos grupos experimentales en los que se realizó la detección de fibras de colágeno. Barra de calibración corresponde a 200 μ m. En B se grafica la cuantificación del área de colágeno expresado como porcentaje del área total (n=5 por grupo). (**) p<0,01

SH- solución salina/H₂O **VH-** vincristina/H₂O **SD-**solución salina/DCA **VD-** vincristina/DCA

Activación de folículos primordiales

No se detectaron diferencias significativas en los porcentajes de células marcadas con anticuerpo Ki-67 en ninguno de los folículos analizados en los distintos grupos (Fig.20).

Otro indicador de activación analizado fue la detección inmunohistoquímica del factor de transcripción FoxO3a (Fig.21) La cuantificación evidenció una disminución significativa del porcentaje de marca nuclear de folículos primordiales en los animales tratados con vincristina respecto al control. Este efecto no se revirtió con la coadministración de DCA.

Detección de AMH

Se detectó una disminución sustancial en el porcentaje promedio del área de inmunorreactividad para AMH después del análisis semicuantitativo en ovarios de animales tratados con vincristina y DCA con respecto al grupo control (Fig.22).

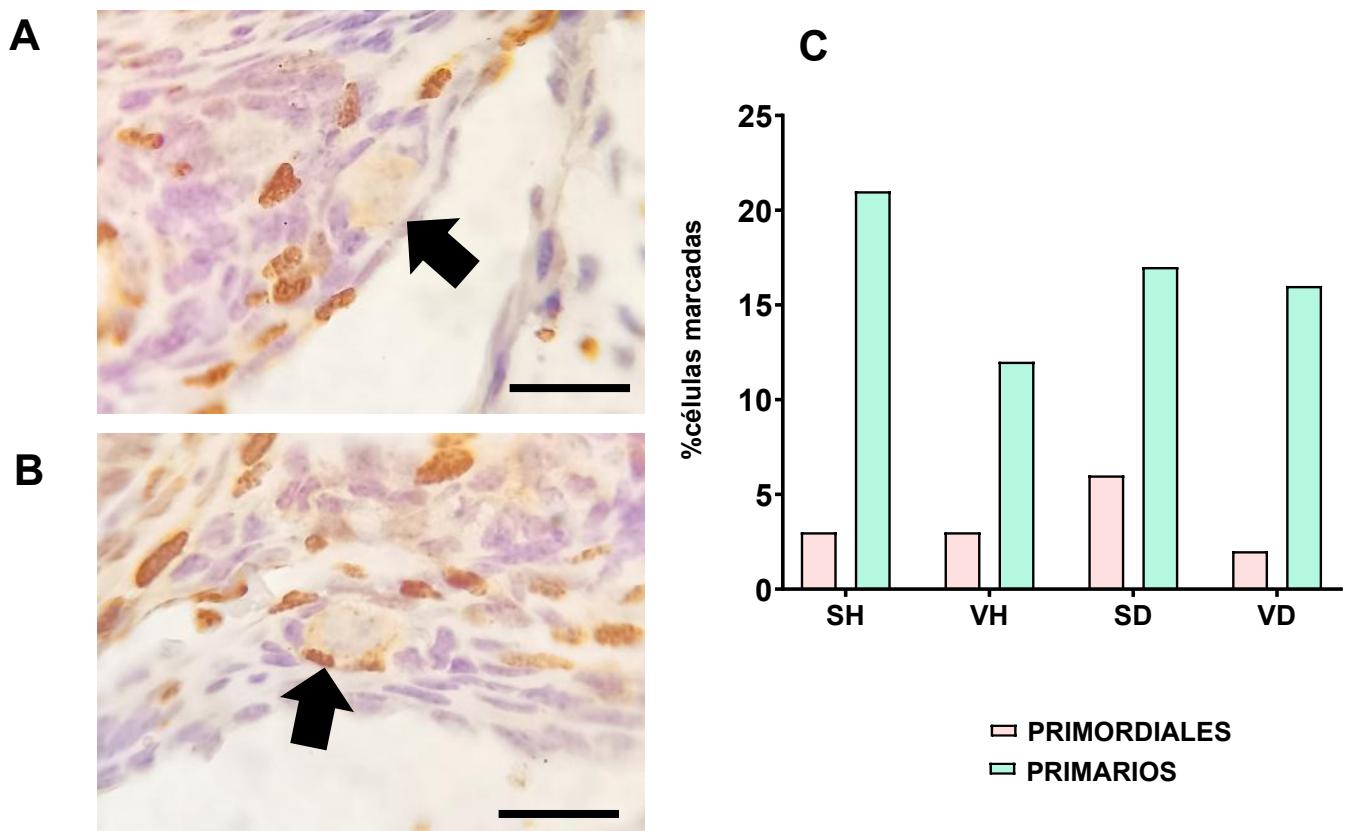


Fig.20- Detección de Ki-67 en folículos primordiales y primarios. En A imágenes representativas de un folículo primordial con el total de células foliculares negativas (flecha) y en B un folículo primordial con algunas células foliculares positivas (flecha) para Ki-67. Barra de calibración corresponde a 10 μ m. En C se grafica el porcentaje de células marcadas (positivas) para Ki-67 en folículos primordiales y primarios de los distintos grupos experimentales ($n=2$ por grupo).

SH- solución salina/ H_2O **VH-** vincristina/ H_2O **SD-**solución salina/DCA **VD-** vincristina/DCA

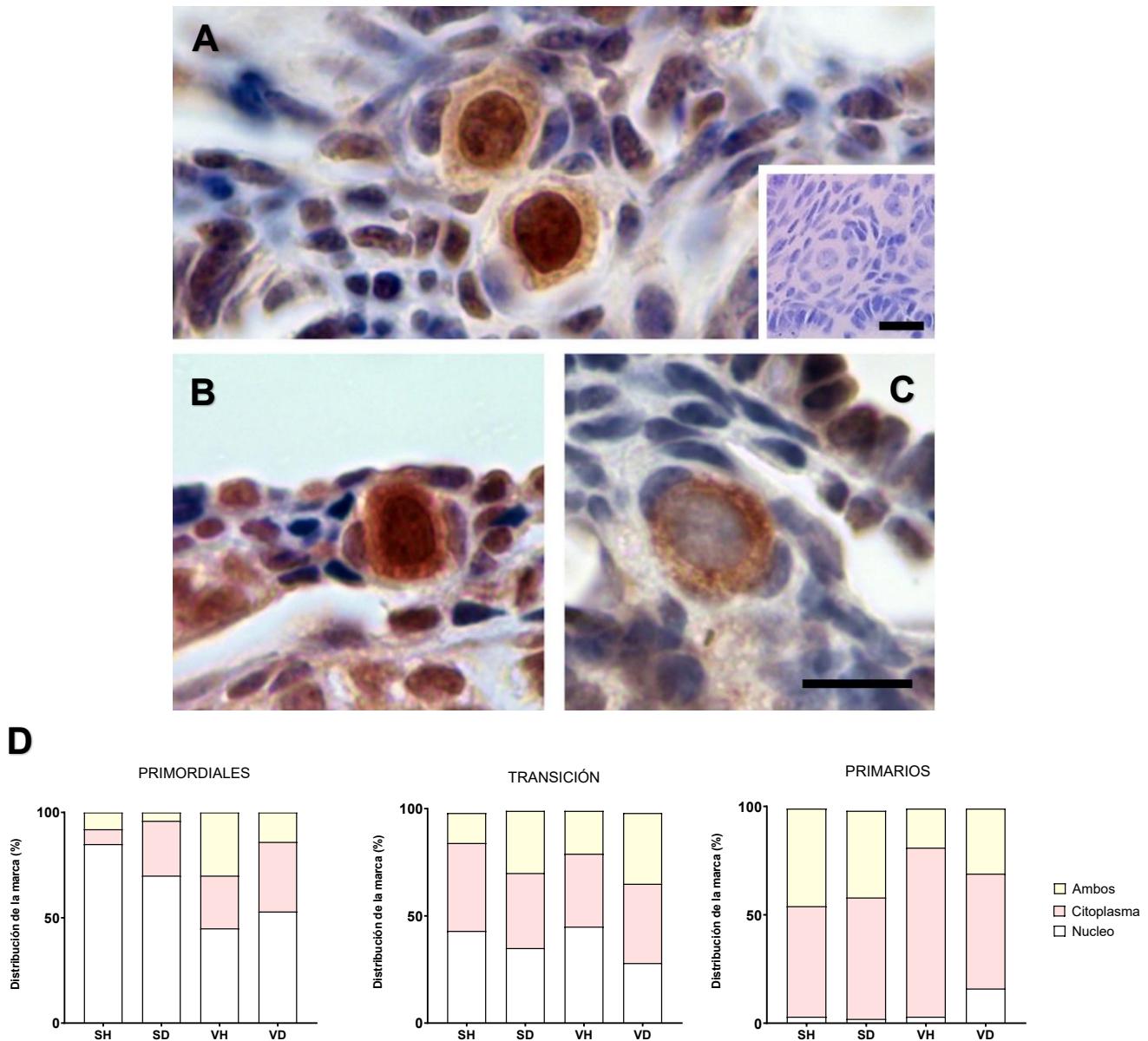


Fig. 21- Detección de FoxO3a en folículos primordiales, transición y primarios. En A ovocito en reposo (marca nuclear), en B ovocito en vías de activación (marca tanto en núcleo como en citoplasma), en C ovocito activado (marca citoplasmática), el recuadro en A muestra un control negativo. Barra de calibración corresponde a 10 µm. En D se grafica la distribución proporcional de la marca en folículos primordiales, en transición y primarios en los distintos grupos ($n=3$ por grupo).

SH- solución salina/ H_2O **VH-** vincristina/ H_2O **SD-**solución salina/DCA **VD-** vincristina/DCA

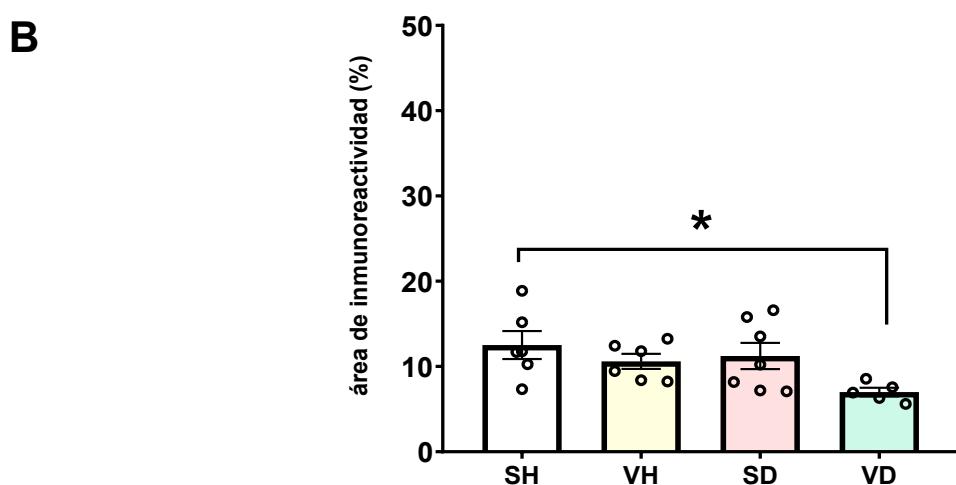
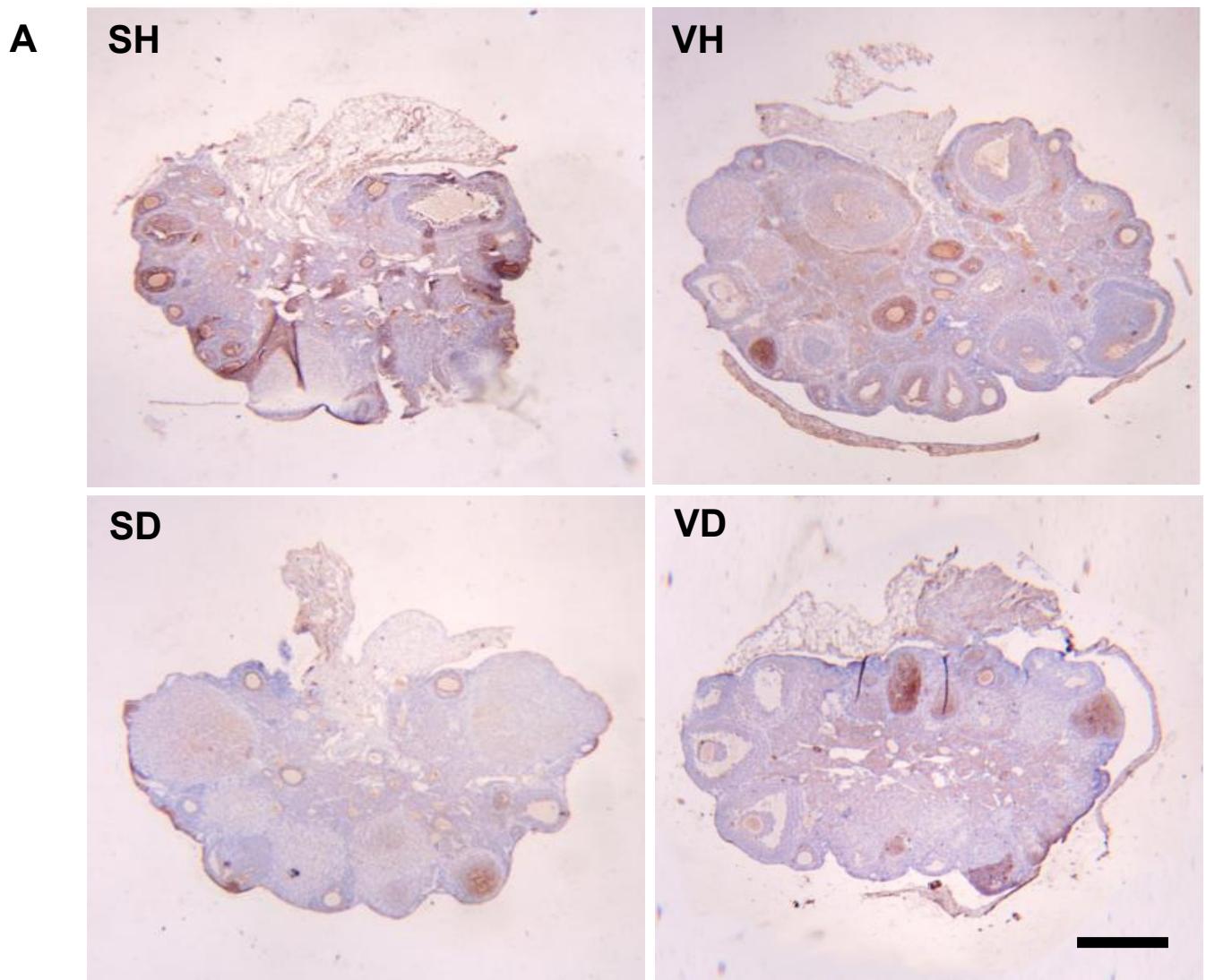
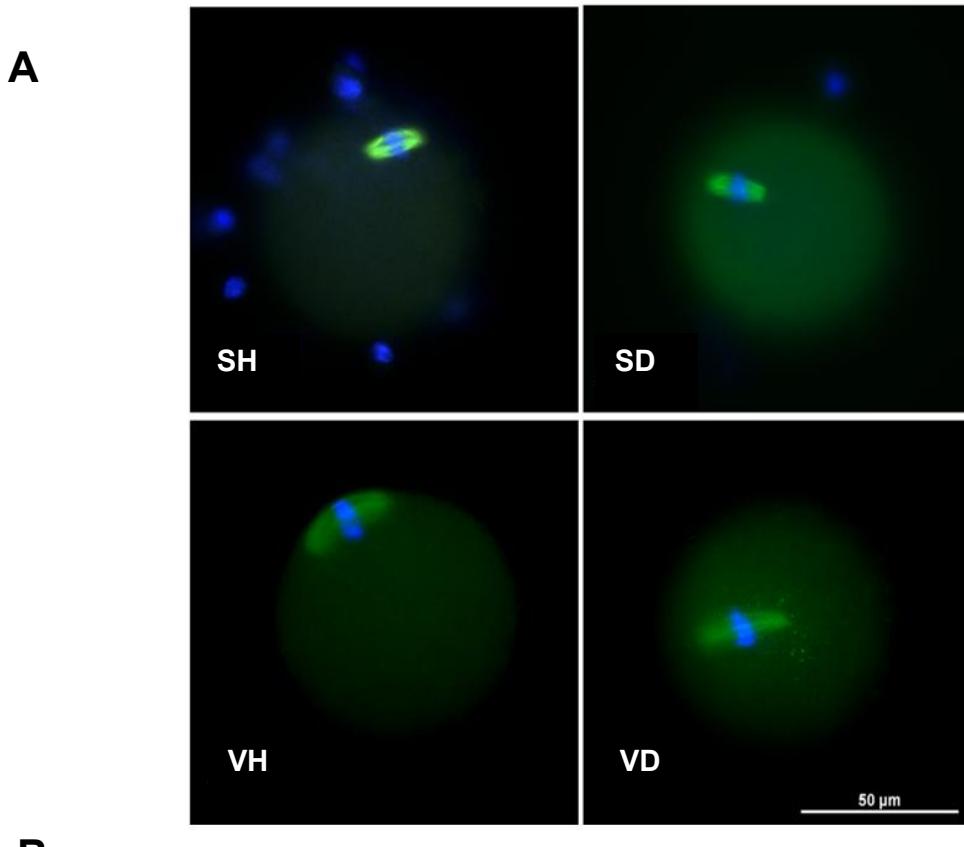


Fig.22- Detección de AMH en el ovario. En A imágenes representativas de la localización inmunohistoquímica de hormona anti mulleriana en los distintos grupos. (*) p<0,05. Barra de calibración corresponde a 250 µm. En B se grafica el área de inmunoreactividad expresada en porcentaje (n=6 por grupo)

SH- solución salina/H₂O **VH**- vincristina/H₂O **SD**-solución salina/DCA **VD**- vincristina/DCA

Efectos del tratamiento sobre los ovocitos ovulados

Luego de la inducción de la ovulación el número de ovocitos obtenidos se redujo significativamente en los animales del grupo expuesto a vincristina y DCA. El análisis morfológico de los ovocitos mostró que los animales tratados con vincristina presentaron un diámetro significativamente mayor, acompañado de un aumento en la longitud del huso meiótico. Las características del huso de los animales del grupo que recibió vincristina junto con DCA fueron similares a las del grupo control. La disposición de los cromosomas en el plano ecuatorial no se vio afectada por ninguno de los tratamientos (Fig.23).



B

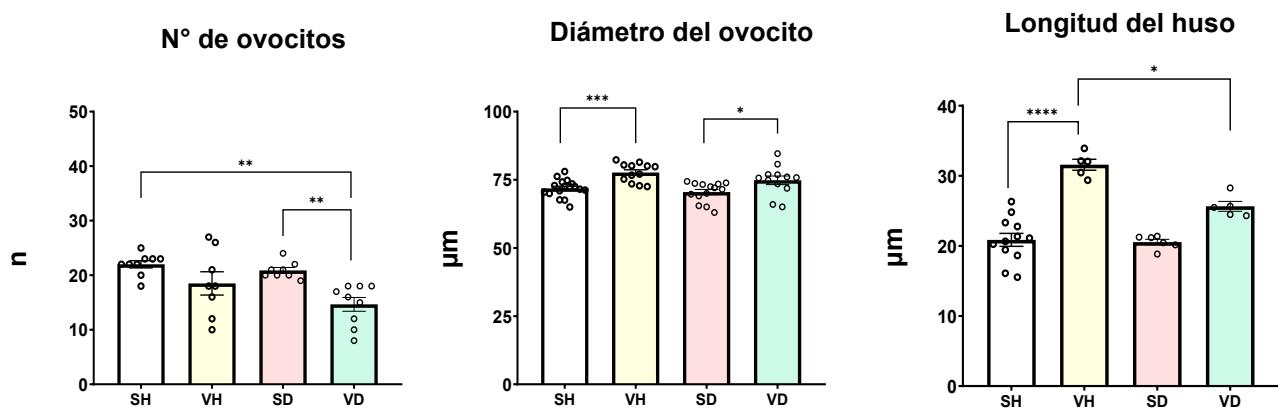


Fig.22- Evaluación de los ovocitos a largo plazo. En A imágenes representativas del huso meiótico, se muestra a la tubulina (verde) y al ADN (azul) en ovocitos de los distintos grupos experimentales. Barra de calibración corresponde a 50 μm . En B se grafica la tasa de ovulación inducida, el diámetro del ovocito y la longitud del huso de cada grupo ($n=9$ por grupo). (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,005$; (****) $p < 0,0001$.

SH- solución salina/ H_2O **VH-** vincristina/ H_2O **SD-**solución salina/DCA **VD-** vincristina/DCA

DISCUSIÓN

En este estudio, la exposición a vincristina indujo alteraciones en el ciclo estral durante el tratamiento. Esto se asoció con un aumento de la atresia de los folículos en crecimiento, una mayor activación de los folículos primordiales y una disminución de la señalización mediada por AMH. En el análisis de los efectos a largo plazo se destaca como resultado interesante la disminución de la tasa ovulatoria y la alteración del huso meiótico, resultados que no se encuentran reportados en la literatura y que podrían generar impactos importantes sobre el desarrollo embrionario.

Por otro lado, la coadministración de DCA y vincristina reduce aún más el número de folículos en crecimiento y el número de ovocitos ovulados. Sin embargo, en los efectos a largo plazo los ovocitos presentaron husos meióticos similares a los de los controles.

Varios estudios han permitido clasificar a la vincristina y otros alcaloides de la vinca como quimioterápicos con bajo riesgo de inducir insuficiencia ovárica en pacientes sometidas a estos tratamientos (Feldberg & Purandare, 2025; Himpe et al., 2023). Sin embargo, los avances en el conocimiento de los efectos sistémicos de los agentes antineoplásicos han propiciado la constante reevaluación de sus implicancias clínicas, generando nuevos consensos respecto a su toxicidad y seguridad reproductiva. En el presente trabajo se utilizó un modelo en ratón con administración de DCA en el agua de beber con la finalidad de modular la actividad mitocondrial a nivel del ovario y de esta forma paliar los efectos gonadotóxicos de la vincristina.

Se comprobó la presencia de la enzima PDH en el tejido ovárico, así como la modulación de la actividad de la enzima PDK por la presencia de DCA. La importancia del sistema PDH/PDK en el metabolismo energético y la función mitocondrial en el ovario, y particularmente en las células granulosas, ya ha sido mostrada previamente (Imanaka et al., 2022; Zhang et al., 2025). Los resultados encontrados en el modelo luego de la cuantificación de la relación PDH-

fosforilada/PDH sugieren una modulación mitocondrial favorable y una posible mejora en los procesos metabólicos celulares inducida por la presencia de DCA.

Efectos de la vincristina y DCA sobre los parámetros fisiológicos y conductuales

Dado que la vía de administración de la vincristina fue sistémica, se evaluaron parámetros adicionales relacionados con la toxicidad general. En el contexto oncológico, uno de los efectos adversos más relevantes es la aparición de dolor neuropático, el cual puede conducir a la suspensión del tratamiento (Arrúa et al., 2024). Este parámetro no fue evaluado directamente en el presente trabajo, pero si se realizó un seguimiento del comportamiento de los animales, así como del peso corporal y el consumo de agua durante todo el periodo experimental. Los animales expuestos a vincristina y DCA presentaron una disminución significativa en la ganancia de peso, sin evidenciar pérdida ponderal. Por otro lado, el consumo de agua se mantuvo constante a lo largo del tratamiento. En ningún caso se evidenciaron alteración de la marcha o signos de dolor. Varios estudios muestran que las hembras desarrollan menos signos de dolor y que estos desaparecen en forma más rápida que en los machos (Amodeo et al., 2025; Parsania et al., 2014), lo que podría explicar esta falta de síntomas. Finalmente, se analizó el ciclo estral como indicador del funcionamiento del eje hormonal reproductivo, observándose irregularidades en los animales tratados con vincristina, lo que podría reflejar una alteración en la regulación endocrina ovárica.

Efectos de la vincristina y DCA sobre la fibrosis en ovario

La exposición del tejido ovárico a algunos grupos de agentes quimioterápicos ha demostrado inducir alteraciones en el estroma, particularmente mediante el aumento de la fibrosis (Guo et al., 2024b). En el presente estudio, la vincristina no produjo cambios significativos en la cantidad de fibras de colágeno presentes en el estroma ovárico, en comparación con el grupo control, lo cual concuerda

con estudios previos que no atribuyen este efecto a la vincristina, aunque si lo relacionan con otros grupos de agentes quimioterápicos como la ciclofosfamida y la doxorrubicina (Guo et al., 2024b). Sin embargo, los animales tratados con la combinación de vincristina y DCA mostraron una disminución significativa en la densidad de fibras de colágeno, tanto en relación con el grupo control como con el grupo tratado exclusivamente con vincristina. Este hallazgo sugiere un posible efecto modulador del DCA sobre la matriz extracelular ovárica, en línea con reportes previos que describen su acción antifibrótica en modelos de fibrosis ovárica inducida por diabetes (Pala et al., 2021d) y en modelos de enfermedad renal crónica (Wei et al., 2019). Si esta disminución de la presencia de colágeno está asociada a una promoción del crecimiento folicular en este grupo es un parámetro que queda por determinar.

Efectos de la vincristina y DCA sobre indicadores de estrés oxidativo

La evaluación de enzimas involucradas en la eliminación de ROS ha sido considerada de particular interés, dado el impacto que estas especies tienen sobre la función mitocondrial y, en consecuencia, sobre la calidad ovocitaria, los procesos reproductivos, y el desarrollo embrionario temprano (Tatone et al., 2006). Los resultados obtenidos en este trabajo evidencian que los grupos experimentales tratados con vincristina presentan una mayor expresión de la enzima catalasa en comparación con el grupo control. Este hallazgo podría atribuirse a un incremento en la generación de ROS en el tejido ovárico, lo cual activaría mecanismos compensatorios orientados a restablecer el equilibrio redox mediante la eliminación de dichas especies reactivas. Otros estudios han sugerido que la modulación de estos sistemas antioxidantes provoca una respuesta adaptativa del ovario frente al estrés oxidativo inducido por el tratamiento quimioterápico (Bezdíček et al., 2025). Dado que la actividad de la enzima SOD, no fue modificada por los distintos tratamientos, es posible sugerir que la respuesta antioxidante inducida por el tratamiento con vincristina estaría mediada principalmente por la catalasa. La falta de incremento en la enzima

SOD2 podría estar indicando que otras enzimas se encuentran implicadas en este proceso.

Efectos de la vincristina y DCA sobre los folículos primordiales

Numerosos estudios han mostrado la disfunción ovárica y la reducción de la fertilidad como consecuencia de la quimioterapia en pacientes con diferentes tipos de cáncer, en particular cuando se han utilizado agentes alquilantes, debido a la disminución o pérdida de la reserva ovárica (Morgan et al., 2012; Sonigo et al., 2019). El impacto de la quimioterapia en la reserva ovárica humana se evalúa indirectamente mediante parámetros clínicos como la amenorrea y los niveles de AMH y FSH. Muy pocos estudios analizan el efecto de distintos regímenes de quimioterapia sobre la población folicular de mujeres mediante aproximaciones histológicas (McLaughlin et al., 2017). Además, el uso combinado de drogas, la variabilidad de edad de las pacientes y de sus condiciones de salud, así como el bajo número de casos al que es posible acceder para realizar este tipo de análisis, hacen necesario el uso de modelos animales en los que se puedan controlar todos estos parámetros.

La población de folículos primordiales representa la reserva ovárica funcional y está compuesta por estructuras en estado quiescente (Pepling & Spradling, 2001), lo que los hace menos susceptibles a agentes quimioterapéuticos que actúan sobre estructuras en división activa, como los folículos en crecimiento. Sin embargo, en el presente trabajo se observó un aumento de indicadores de activación de folículos primordiales, como ser una mayor proporción de traslocación de FoxO3a del núcleo al citoplasma en respuesta a la exposición a vincristina lo que no fue reportado hasta el momento. Este efecto no fue revertido por la administración concomitante de DCA. Estos hallazgos ponen de relevancia la necesidad de no solo cuantificar la población folicular de reserva, sino también evaluar su estado (reposo o activo).

Sería esperable que la disminución del número de folículos en crecimiento encontrada en los grupos expuestos a vincristina estuviese asociada con una disminución de la señalización mediada por AMH. En este estudio, el análisis del área inmunomarcada para esta hormona mostro una disminución de la presencia

de la misma solo en el grupo expuesto a vincristina y DCA. Esto coincide con los hallazgos de activación folicular mostrados por la localización de FoxO3a. Esto sugiere que los folículos primordiales podrían estar siendo activados por ausencia de inhibición por parte de la AMH. Sin embargo, en el grupo expuesto solo a vincristina, no se encontró diferencia en el área inmunomarcada para AMH respecto al control. Este resultado podría atribuirse a la limitada sensibilidad de la técnica empleada, lo que habría impedido detectar cambios sutiles en los parámetros evaluados. Por lo tanto, sería relevante corroborar estos hallazgos mediante métodos complementarios, como la determinación de la hormona en sangre.

Por otra parte, el marcador de proliferación celular Ki-67 no mostró diferencias significativas entre los grupos experimentales, lo que podría indicar que la activación observada es un evento temprano que podría estar determinado por un aumento del tamaño de las células foliculares y que aún no se traduce en proliferación celular detectable o que quizás no llega a activar completamente al ovocito. Para confirmar estos resultados se podrían evaluar otros marcadores vinculados a la activación folicular, como ser la localización de proteína asociada a Yes (Yap), factor de transcripción que es translocado desde el citoplasma al núcleo de las células foliculares una vez que es activada la vía Hippo. Esta vía ha sido implicada en la regulación de la ovogénesis y el crecimiento folicular (De Roo et al., 2020; McGee & Hsueh, 2000; Zhu et al., 2023)

Tomando en consideración todos estos hallazgos, los efectos generados por vincristina sobre la población de folículos primordiales, podrían ser similares a los inducidos por otros agentes gonadotóxicos como la ciclofosfamida, pero de menor magnitud y relevancia y hacen necesario profundizar en el estudio de los mecanismos implicados con el fin de buscar estrategias que permitan mejoras en la preservación de la reserva ovárica.

Efectos de la vincristina y DCA sobre la población de folículos en crecimiento

Estudios previos realizados en modelos murinos han aportado evidencia sobre los efectos deletéreos de la vincristina en la población de folículos en crecimiento (Winship et al., 2019). Este fenómeno se explica por la alta afinidad de la vincristina hacia células que se encuentran en procesos activos de división celular, como las células foliculares. Su principal mecanismo de acción se basa en la interferencia con la polimerización de los microtúbulos y la formación del huso mitótico (Moudi et al., 2013). En el presente estudio, se muestra que la administración de vincristina induce que una mayor proporción de folículos en crecimiento presente atresia. Este resultado es coincidente con el encontrado mediante la detección inmunohistoquímica de la caspasa 3 activada, la cual mostró que este incremento significativo en el porcentaje de folículos atrésicos afecta principalmente a la categoría de folículos antrales. El incremento en la expresión de la proteína proapoptótica Bax, sugiere que el proceso de atresia folicular inducido por vincristina se encuentra mediado principalmente por la vía apoptótica.

Efectos de la vincristina y DCA en la ovulación

La estimulación ovárica cuatro semanas luego de la finalización del tratamiento permitió la recolección de ovocitos que estuvieron expuestos al agente quimioterápico en su etapa de folículo primordial. Los resultados obtenidos indican que, a largo plazo, el tratamiento con vincristina produce una disminución en la tasa de ovocitos ovulados, aunque esta no alcanza diferencias estadísticas respecto al grupo control. No obstante, se observaron alteraciones en la morfología del huso meiótico, lo que sugiere un impacto sobre la integridad estructural del huso. Alteraciones similares se han reportado en el huso meiótico de ovocitos de ratón expuestos *in vivo* a vincristina u otros alcaloides de la vinca (Chang et al., 2024; Russo & Pacchierotti, 1988). En estos estudios el análisis se realizó durante o inmediatamente después de la exposición. Resultados comparables se encontraron también durante la maduración *in vitro* de ovocitos

tratados con vinorelbina, otro alcaloide de la vinca. En todos estos casos, se describió una disrupción en el ensamblaje del huso y en la alineación cromosómica, lo que derivó en la inducción de aneuploidías (Cheng et al., 2024). Además, la exposición *in vivo* a vinblastina redujo la capacidad de unión entre ovocito y espermatozoide y el número de gránulos corticales en la corteza de los ovocitos de ratón (Russell & Pacchierotti, 1988). Todos estos trabajos coinciden en que los alcaloides de la vinca alteran la estructura del huso meiótico y son potencialmente generadores de aneuploidías afectando así el desarrollo embrionario posterior. Es de interés resaltar que estos trabajos hacen referencia a efectos en el corto plazo, mientras que en el presente trabajo se observa que estas alteraciones en el huso meiótico están presentes luego de 4 semanas de finalizado el tratamiento, hecho que reafirma la importancia de tener en cuenta que los efectos pueden perdurar, aunque se restablezca el ciclo y los valores hormonales estén dentro de los parámetros esperados.

Por otro lado, la coadministración de vincristina y DCA resultó en una disminución significativa de la tasa de ovocitos ovulados, y en un mantenimiento de la longitud del huso meiótico, cuando se compara con el grupo control. Este hallazgo resulta interesante y al momento desconocemos el o los mecanismos implicados en ese acontecimiento, por lo que el estudio de las proteínas del citoesqueleto involucradas en el mantenimiento de la estabilidad del huso nos podría aportar datos esclarecedores teniendo en cuenta las particularidades que presenta el huso meiótico.

Además, resulta importante continuar con esta línea en base a los hallazgos obtenidos y evaluar las características del desarrollo embrionario luego de 4 semanas de finalizado el tratamiento y observando las características de las camadas para contar con una evaluación más completa de los efectos sobre la reproducción a largo plazo.

CONCLUSIONES

La vincristina, a pesar de considerarse un agente de baja gonadotoxicidad, afecta de forma significativa la función ovárica. El tratamiento con vincristina produjo alteración de los ciclos estrales, disminución de folículos en crecimiento, aumento de la atresia y activación del pool de folículos primordiales. A largo plazo, provocó disminución del número de ovocitos ovulados y alteraciones en su morfología y la del huso meiótico, lo cual comprometería la maduración ovocitaria y la eficiencia reproductiva.

La administración de DCA como posible modulador de la función mitocondrial no fue capaz de revertir globalmente el daño folicular inducido por la vincristina. Sin embargo, mostró efectos duales: en algunos casos exacerbó las alteraciones foliculares, mientras que en otros casos tuvo un efecto positivo ya que redujo la fibrosis ovárica y mejoró la morfología del huso meiótico, lo que indica un posible beneficio parcial sobre la calidad ovocitaria.

En conjunto, estos hallazgos demuestran que la vincristina puede tener un impacto más profundo de lo esperado sobre la reserva folicular y la calidad ovocitaria, y que el DCA podría ofrecer protección limitada y específica más que un efecto protector general.

Continuar con la exploración de los efectos nos permitirá tener una mejor comprensión de los procesos que suceden a nivel ovárico durante y luego del tratamiento con vincristina con vistas a poder aplicar parte de estos hallazgos en la actividad clínica y de esta manera asesorar a las pacientes de forma más completa contribuyendo a mejoras en su calidad de vida.

PERSPECTIVAS

A partir de los resultados presentados en este trabajo de tesis, nos planteamos los posibles ejes de acción para un futuro cercano.

- Profundizar en los mecanismos moleculares por los cuales la vincristina induce la activación prematura de los folículos primordiales, ya que este fenómeno podría acelerar el agotamiento de la reserva ovárica.
- Determinar la capacidad reproductiva funcional posterior al tratamiento, tanto *in vivo* como *in vitro* (maduración y desarrollo embrionario).
- Explorar otras combinaciones terapéuticas metabólicas o antioxidantes que puedan mitigar la gonadotoxicidad sin comprometer la eficacia oncológica

PUBLICACIONES

Los resultados presentados en esta tesis forman parte de un artículo que se encuentra en revisión en la revista Reproductive Sciences, con ID de envío: RESC-D-25-01228.

"Impact of vincristine treatment on the mouse ovary and the potential protective effect of dichloroacetate "

Autores: Toledo. A, Simoes. P, Fernandez-Tabó. C, Hernandez-Mir.K, Chávez-Genaro. R, Anesetti.G

Los resultados obtenidos hasta el momento fueron presentados en formato póster y presentación oral:

Poster en el congreso de Histología e Ingeniería Tisular organizado por la SEHIT (Sociedad Española de Histología e Ingeniería Tisular) en la ciudad de Granada, España

Cita completa: Histology and Histopathology, Volume 37 (Supplement 1), 2022, pág 71. Disponible en: [Suppl 1, 2022.pdf](#)

Poster en el 29th Congreso de la Sociedad Brasilera de Microscopia y Microanálisis Interamericano en la ciudad de Olinda, Brasil.

PS-II.LSS7.38 - Evaluation Of Dichloroacetate As A Protector Against the Gonadotoxic Effects Of Vincristine On The Ovar. Disponible en: [CSBMM and CIASEM 2023 - EventWeb](#)

Presentación oral de los resultados en la mesa de Reproducción del 3er Congreso Nacional de Biociencias, organizado por la Sociedad Uruguaya de Biociencias en la ciudad de Montevideo, Uruguay.

Cita completa: Mesa avances en biología de la reproducción. Resumen 374. Disponible en: [Special Issue. Congreso Nacional de Biociencias – Physiological Mini Reviews](#)

Financiamiento

Parte de este trabajo fue financiado con fondos del proyecto Iniciación a la Investigación CSIC año 2022.

REFERENCIAS

- Aardema, H., Vos, P. L. A. M., Luciano, A. M., & Buratini, J. (2025). Metabolic and endocrinologic interplay in the peri-ovulatory follicle to support the cumulus-oocyte-complex towards full competence. *Animal Reproduction*, 22(3). <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2025-0067>
- Aboutalebi, H., Vafaei, S., Aboutalebi, M., Dortaj, H., Alipour, F., & Bideskan, A. E. (2025). Premature ovarian insufficiency restoration after chemotherapy: current achievements and future prospects on its treatment or management. In *Journal of Ovarian Research* (Vol. 18, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13048-025-01677-4>
- Albamonte, M. I., Calabró, L. Y., Albamonte, M. S., & Vitullo, A. D. (2023). FOXO3 and PTEN expression in the ovary of girls with extra-gonadal cancer with or without chemotherapy treatment prior to cryopreservation. *BMC Women's Health*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12905-023-02648-x>
- Amodeo, G., Galimberti, G., Ceruti, S., Riboldi, B., Franchi, S., & Sacerdote, P. (2025). Physical exercise ameliorates pain, mood alterations and neuroinflammation in a murine model of osteoarthritis. *Life Sciences*, 374. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2025.123710>
- Anesetti, G., & Chávez-Genaro, R. (2016). Ovarian follicular dynamics after aromatizable or non aromatizable neonatal androgenization. *Journal of Molecular Histology*, 47(5), 491–501. <https://doi.org/10.1007/s10735-016-9692-1>
- Arrúa, J. M., Luz Rodríguez, M., Gómez, K., Martínez, G., & D'aloia, K. (2024). Neurotoxicidad diafragmática asociada a vincristina en un paciente con linfoma de Hodgkin: Reporte de un caso. *AÑO*, 15(1).
- Asadi, M., Taghizadeh, S., Kaviani, E., Vakili, O., Taheri-Anganeh, M., Tahamtan, M., & Savardashtaki, A. (2022a). Caspase-3: Structure, function, and biotechnological aspects. In *Biotechnology and Applied Biochemistry* (Vol. 69, Issue 4, pp. 1633–1645). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/bab.2233>
- Babayev, E., Wang, T., Szigeti-Buck, K., Lowther, K., Taylor, H. S., Horvath, T., & Selig, E. (2016). Reproductive aging is associated with changes in oocyte mitochondrial dynamics, function, and mtDNA quantity. *Maturitas*, 93, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2016.06.015>
- Bardia, A., & Hurvitz, S. (2018). Targeted therapy for premenopausal women with HR+, HER2- advanced breast cancer: Focus on special considerations and latest advances. *Clinical Cancer Research*, 24(21), 5206–5218. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0162>
- Belli, M., & Shimasaki, S. (2018). Molecular Aspects and Clinical Relevance of GDF9 and BMP15 in Ovarian Function. In *Vitamins and Hormones* (Vol. 107, pp. 317–348). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2017.12.003>
- Bezdíček, J., Sekaninová, J., Janků, M., Makarevič, A., Luhová, L., Dujíčková, L., & Petřivalský, M. (2025). Reactive oxygen and nitrogen species: multifaceted regulators of ovarian activity†. *Biology of Reproduction*, 112(5), 789–806. <https://doi.org/10.1093/BIOLRE/IOAF032>
- Bhardwaj, J. K., Bikal, P., & Sachdeva, S. N. (2023). Chemotherapeutic drugs induced female reproductive toxicity and treatment strategies. In *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* (Vol. 37, Issue 7). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jbt.23371>
- Bloom, W., & Fawcett, D. W. (1995). *Tratado de Histología* (Vol. 12).
- Boucret, L., Chao De La Barca, J. M., Morinière, C., Desquiret, V., Ferré-L'Hôtellier, V., Descamps, P., Marcaillou, C., Reynier, P., Procaccio, V., & May-Panloup, P. (2015). Relationship between diminished ovarian reserve and mitochondrial biogenesis in cumulus cells. *Human Reproduction*, 30(7), 1653–1664. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev114>

- Brunet, A., Park, J., Tran, H., Hu, L. S., Hemmings, B. A., & Greenberg, M. E. (2001). Protein Kinase SGK Mediates Survival Signals by Phosphorylating the Forkhead Transcription Factor FKHL1 (FOXO3a). *Molecular and Cellular Biology*, 21(3), 952–965. <https://doi.org/10.1128/mcb.21.3.952-965.2001>
- Buckle, A. (1959). Methotrexate in treatment of metastasizing chorioncarcinoma. In *M.A. Arch. intern. Med* (Vol. 94).
- Byskov, A.G. (1986). *Differentiation of Mammalian Embryonic Gonad.*
- Castrillon, D. H., Miao, L., Kollipara, R., Horner, J. W., & DePinho, R. A. (2003a). Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science*, 301(5630), 215–218. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1086336>
- Chang, H., Cheng, S., Xing, G., Huang, C., Zhang, C., Qian, W., & Li, J. (2024). Vincristine exposure impairs mouse oocyte quality by inducing spindle defects and early apoptosis. *IUBMB Life*, 76(6), 345–356. <https://doi.org/10.1002/iub.2797>
- Chávez-Genaro, R., & Anesetti, G. (2018). First ovarian response to gonadotrophin stimulation in rats exposed to neonatal androgen excess. *Journal of Molecular Histology*, 0(0), 0. <https://doi.org/10.1007/s10735-018-9800-5>
- Chen, W., Wang, X., Wan, S., Yang, Y., Zhang, Y., Xu, Z., Zhao, J., Mi, C., & Zhang, H. (2024). Dichloroacetic acid and trichloroacetic acid as disinfection by-products in drinking water are endocrine-disrupting chemicals. *Journal of Hazardous Materials*, 466. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.133035>
- Cheng, S. Y., Yi, Z. Y., Zhang, C. H., Sun, Q. Y., Qian, W. P., & Li, J. (2024). Vinorelbine administration impedes the timely progression of meiotic maturation and induces aneuploidy in mouse oocytes. *Reproductive Toxicology*, 128. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2024.108634>
- Conti, M., Andersen, C. B., Richard, F., Mehats, C., Chun, S. Y., Horner, K., Jin, C., & Tsafiriri, A. (2002). Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187(1–2), 153–159. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00686-4](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00686-4)
- Cummings, A. M., & Kavlock, R. J. (2004). Gene–Environment Interactions: A Review of Effects on Reproduction and Development. *Critical Reviews in Toxicology*, 34(6), 461–485. <https://doi.org/10.1080/10408440490519786>
- Da Silva, J. V. A., Ispada, J., Nociti, R. P., Da Fonseca Junior, A. M., De Lima, C. B., Dos Santos, E. C., Chiaratti, M. R., & Milazzotto, M. P. (2023). The central role of pyruvate metabolism on the epigenetic maturation and transcriptional profile of bovine oocytes. *Reproduction*, 167(4). <https://doi.org/10.1530/REP-23-0181>,
- De Felici, M., Scaldaferri, M. L., Lobascio, M., Iona, S., Nazzicone, V., Klinger, F. G., & Farini, D. (2004). Experimental approaches to the study of primordial germ cell lineage and proliferation. In *Human Reproduction Update* (Vol. 10, Issue 3, pp. 197–206). <https://doi.org/10.1093/humupd/dmh020>
- de Mey, S., Dufait, I., Jiang, H., Corbet, C., Wang, H., Gucht, M. Van De, Kerkhove, L., Law, K. L., Vandenplas, H., Gevaert, T., Feron, O., & De Ridder, M. (2020). Dichloroacetate radiosensitizes hypoxic breast cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms21249367>
- De Roo, C., Lierman, S., Tilleman, K., & De Sutter, P. (2020). In-vitro fragmentation of ovarian tissue activates primordial follicles through the Hippo pathway. *Human Reproduction Open*, 2020(4). <https://doi.org/10.1093/HROPEN/HOAA048>
- Deng, Y. L., Luo, Q., Liu, C., Zeng, J. Y., Lu, T. T., Shi, T., Cui, F. P., Yuan, X. Q., Miao, Y., Zhang, M., Chen, P. P., Li, Y. F., Lu, W. Q., & Zeng, Q. (2022). Urinary biomarkers of exposure to drinking water disinfection byproducts and ovarian reserve: A cross-sectional study in China. *Journal of Hazardous Materials*, 421. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126683>

- di Clemente, N., Racine, C., Pierre, A., & Taieb, J. (2021). Anti-Müllerian Hormone in Female Reproduction. In *Endocrine Reviews* (Vol. 42, Issue 6, pp. 753–782). Endocrine Society. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnab012>
- Dumollard, R., Ward, Z., Carroll, J., & Duchen, M. R. (2007). Regulation of redox metabolism in the mouse oocyte and embryo. *Development*, 134(3), 455–465. <https://doi.org/10.1242/dev.02744>
- Durlinger, A. L. L., Kramer, P., Karels, B., De Jong, F. H., Uilenbroek, J. T. J., Anton Grootegoed, J., & Themmen, A. P. N. (1999). Control of Primordial Follicle Recruitment by Anti-Müllerian Hormone in the Mouse Ovary. *Endocrinology*, 140(12), 5789–5796. <https://doi.org/10.1210/ENDO.140.12.7204>
- Edith A. Perez, M. D., Paul A. Roche, M. D., Edward H. Romond, M. D., George W. Sledge Jr., M. D., Soonmyung Paik, M. D., Charles E. Geyer Jr., M. D., Joseph P. Crown, M. D., Victor Giambrone, M. D., Sandra M. Davidson, Ph. D., & Norman Wolmark, M. D. (2005). Trastuzumab plus Adjuvant Chemotherapy for Operable HER2-Positive Breast Cancer. In *n engl j med* (Vol. 352, Issue 20). www.nejm.org
- Erickson, G. F., & Shimasaki, S. (2000). The role of the oocyte in folliculogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 11(5), 193–198. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(00\)00249-6](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(00)00249-6)
- Feldberg, D., & Purandare, N. (2025). Cancer therapy and reproductive impact. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 169(3), 891–894. <https://doi.org/10.1002/ijgo.16174>
- Fountas, S., Petinaki, E., Bolaris, S., Kargakou, M., Dafopoulos, S., Zikopoulos, A., Moustakli, E., Sotiriou, S., & Dafopoulos, K. (2024). The Roles of GDF-9, BMP-15, BMP-4 and EMMPRIN in Folliculogenesis and In Vitro Fertilization. *Journal of Clinical Medicine*, 13(13), 3775. <https://doi.org/10.3390/JCM13133775>
- Fowler, P. A., Anderson, R. A., Saunders, P. T., Kinnell, H., Mason, J. I., Evans, D. B., Bhattacharya, S., Flannigan, S., Franks, S., Monteiro, A., & O'Shaughnessy, P. J. (2011). Development of steroid signaling pathways during primordial follicle formation in the human fetal ovary. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(6), 1754–1762. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-2618>
- Fujimoto, T., Miyayama, Y., & Fuyuta, M. (1977). The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells. *The Anatomical Record*, 188(3), 315–329. <https://doi.org/10.1002/AR.1091880305>; PAGEGROUP:STRING:PUBLICATION
- Galmarini, D., Galmarini, C. M., & Galmarini, F. C. (2012). Cancer chemotherapy: A critical analysis of its 60 years of history. In *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (Vol. 84, Issue 2, pp. 181–199). <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2012.03.002>
- Gershon, E., & Dekel, N. (2020). Newly identified regulators of ovarian folliculogenesis and ovulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms21124565>
- Guicciardi, M. E., & Gores, G. J. (2009). Life and death by death receptors. *The FASEB Journal*, 23(6), 1625–1637. <https://doi.org/10.1096/FJ.08-111005>
- Guo, Y., Xue, L., Tang, W., Xiong, J., Chen, D., Dai, Y., Wu, C., Wei, S., Dai, J., Wu, M., & Wang, S. (2024a). Ovarian microenvironment: challenges and opportunities in protecting against chemotherapy-associated ovarian damage. *Human Reproduction Update*, 30(5), 614. <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMAE020>
- Hannon, P. R., & Curry, T. E. (2018). Folliculogenesis. In *Encyclopedia of Reproduction* (pp. 72–79). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64628-7>
- Hao, X., Zhao, J., & Rodriguez-Wallberg, K. A. (2024). Comprehensive atlas of mitochondrial distribution and dynamics during oocyte maturation in mouse models. *Biomarker Research*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s40364-024-00672-z>

- Harris, S. E., Leese, H. J., Gosden, R. G., & Picton, H. M. (2009). Pyruvate and oxygen consumption throughout the growth and development of murine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 76(3), 231–238. <https://doi.org/10.1002/MRD.20945>
- Himpe, J., Lammerant, S., Van den Bergh, L., Lapeire, L., & De Roo, C. (2023). The Impact of Systemic Oncological Treatments on the Fertility of Adolescents and Young Adults—A Systematic Review. In *Life* (Vol. 13, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/life13051209>
- Hirshfield, A. N. (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology*, 124(C), 43–101. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61524-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61524-7)
- Höke, A., & Ray, M. (2014). Rodent models of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *ILAR Journal*, 54(3), 273–281. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilt053>
- Hou, X., Zhu, S., Zhang, H., Li, C., Qiu, D., Ge, J., Guo, X., & Wang, Q. (2019). Mitofusin1 in oocyte is essential for female fertility. *Redox Biology*, 21(November 2018), 101110. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101110>
- Hoyer, P. E., Byskov, A. G., & Møllgård, K. (2005). Stem cell factor and c-Kit in human primordial germ cells and fetal ovaries. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 234(1–2), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2004.09.012>
- Hu, L. L., Liao, M. H., Liu, Y. X., Xing, C. H., Nong, L. L., Yang, F. L., & Sun, S. C. (2024). Loss of AMPK activity induces organelle dysfunction and oxidative stress during oocyte aging. *Biology Direct*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s13062-024-00471-4>
- Hutt, K. J. (2015). The role of BH3-only proteins in apoptosis within the ovary. In *Reproduction* (Vol. 149, Issue 2, pp. R81–R89). BioScientifica Ltd. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0422>
- Imanaka, S., Shigetomi, H., & Kobayashi, H. (2022). Reprogramming of glucose metabolism of cumulus cells and oocytes and its therapeutic significance. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 29(3), 653–667. <https://doi.org/10.1007/S43032-021-00505-6>
- Jinno, M. (2025). Ovarian stimulation by promoting basal follicular growth. In *Reproductive Biology and Endocrinology* (Vol. 23, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12958-025-01356-5>
- Kano, M., Sosulski, A. E., Zhang, L. H., Saatcioglu, H. D., Wang, D., Nagykery, N., Sabatini, M. E., Gao, G., Donahoe, P. K., & Pépin, D. (2017). AMH/MIS as a contraceptive that protects the ovarian reserve during chemotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(9), E1688–E1697. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1620729114>
- Kashi, O., Roness, H., Spector, I., Derech-Haim, S., & Meirow, D. (2023). Dual suppression of follicle activation pathways completely prevents the cyclophosphamide-induced loss of ovarian reserve. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 38(6), 1086–1098. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEAD064>
- Kaur, S., & Kurokawa, M. (2023). Regulation of Oocyte Apoptosis: A View from Gene Knockout Mice. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms24021345>
- Kerr, J. B., Duckett, R., Myers, M., Britt, K. L., Mladenovska, T., & Findlay, J. K. (2006). Quantification of healthy follicles in the neonatal and adult mouse ovary: Evidence for maintenance of primordial follicle supply. *Reproduction*, 132(1), 95–109. <https://doi.org/10.1530/rep.1.01128>
- Kristensen, S. G., Kumar, A., Mamsen, L. S., Kalra, B., Pors, S. E., Bøtkjær, J. A., Macklon, K. T., Fedder, J., Ernst, E., Hardy, K., Franks, S., & Andersen, C. Y. (2022). Intrafollicular Concentrations of the Oocytesecreted Factors GDF9 and BMP15 Vary Inversely in Polycystic Ovaries. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 107(8), E3374–E3383. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgac272>

- Kumar, S., Kao, W. H., & Howley, P. M. (1997). Physical interaction between specific E2 and hect E3 enzymes determines functional cooperativity. *Journal of Biological Chemistry*, 272(21), 13548–13554. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.21.13548>
- La Marca, A., Broekmans, F. J., Volpe, A., Fauser, B. C., & MacKlon, N. S. (2009). Anti-Müllerian hormone (AMH): What do we still need to know? In *Human Reproduction* (Vol. 24, Issue 9, pp. 2264–2275). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep210>
- Lenert, M. E., Chaparro, M. M., & Burton, M. D. (2021). Homeostatic Regulation of Estrus Cycle of Young Female Mice on Western Diet. *Journal of the Endocrine Society*, 5(4). <https://doi.org/10.1210/JENDSO/BVAB010>
- Litichever, N., Gershon, E., Dekel, N., & Koch, Y. (2009). Hormonal regulation of GnRH and LH β mRNA expression in cultured rat granulosa cells. *Journal of Molecular Neuroscience*, 39(1–2), 78–85. <https://doi.org/10.1007/S12031-009-9185-8/METRICS>
- Liu, H., Chang, D. W., & Yang, X. (2005). Interdimer processing and linearity of procaspase-3 activation. A unifying mechanism for the activation of initiator and effector caspases. *Journal of Biological Chemistry*, 280(12), 11578–11582. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414385200>
- Luderer, U. (2014). Ovarian Toxicity from Reactive Oxygen Species. *Vitamins and Hormones*, 94, 99–127. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800095-3.00004-3>
- Marchais, M., Gilbert, I., Bastien, A., Macaulay, A., & Robert, C. (2022). Mammalian cumulus-oocyte complex communication: a dialog through long and short distance messaging. In *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* (Vol. 39, Issue 5, pp. 1011–1025). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10815-022-02438-8>
- May-Panloup, P., Boucret, L., de la Barca, J. M. C., Desquiret-Dumas, V., Ferré-L'Hotellier1, V., Morinière, C., Descamps, P., Procaccio, V., & Reynier, P. (2016). Ovarian ageing: The role of mitochondria in oocytes and follicles. *Human Reproduction Update*, 22(6), 725–743. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw028>
- McGee, E. A., & Hsueh, A. J. W. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*, 21(2), 200–214. <https://doi.org/10.1210/EDRV.21.2.0394>
- McLaughlin, M., Kelsey, T. W., Wallace, W. H. B., Anderson, R. A., & Telfer, E. E. (2017). Non-growing follicle density is increased following adriamycin, bleomycin, vinblastine and dacarbazine (ABVD) chemotherapy in the adult human ovary. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 32(1), 165–174. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEW260>
- Michelakis, E. D., Webster, L., & Mackey, J. R. (2008). Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *British Journal of Cancer*, 99(7), 989–994. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604554>
- Millier, S. G., Whitelaw, P. F., & Smyth, C. D. (1994). Follicular oestrogen synthesis: the “two-cell, two-gonadotrophin” model revisited. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 100(1–2), 51–54. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(94\)90278-X](https://doi.org/10.1016/0303-7207(94)90278-X)
- Miquel, E., Cassina, A., Martínez-Palma, L., Bolatto, C., Trías, E., Gandelman, M., Radi, R., Barbeito, L., & Cassina, P. (2012). Modulation of Astrocytic Mitochondrial Function by Dichloroacetate Improves Survival and Motor Performance in Inherited Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS ONE*, 7(4), e34776. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0034776>
- Moffatt-Blue, C. S., Sury, J. J., & Young, K. A. (2006). Short photoperiod-induced ovarian regression is mediated by apoptosis in Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *Reproduction*, 131(4), 771–782. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00870>
- Morgan, S., Anderson, R. A., Gourley, C., Wallace, W. H., & Spears, N. (2012). How do chemotherapeutic agents damage the ovary? *Human Reproduction Update*, 18(5), 525–535. <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMS022>
- Motta, P. M., Nottola, S. A., Makabe, S., & Heyn, R. (2000). Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells. In *Human Reproduction* (Vol. 15). <http://humrep.oxfordjournals.org/>

- Moudi, M., Go, R., Yien, C. Y. S., & Nazre, M. (2013). Vinca alkaloids. In *International Journal of Preventive Medicine* (Vol. 4, Issue 11, pp. 1131–1135). Wolters Kluwer -- Medknow Publications. <https://doi.org/10.2165/00128415-200711380-00080>
- Mühlfeld, C., Nyengaard, J. R., & Mayhew, T. M. (2010). A review of state-of-the-art stereology for better quantitative 3D morphology in cardiac research. In *Cardiovascular Pathology* (Vol. 19, Issue 2, pp. 65–82). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2008.10.015>
- Neill, J. D. (2006). *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier.
- Ódor, D. L., & Blandau, R. J. (1969). Ultrastructural studies on fetal and early postnatal mouse ovaries. II. Cytodifferentiation. *The American Journal of Anatomy*, 125(2), 177–215. <https://doi.org/10.1002/AJA.1001250205>
- Orozco-Galindo, B. V., Sánchez-Ramírez, B., González-Trevizo, C. L., Castro-Valenzuela, B., Varela-Rodríguez, L., & Burrola-Barraza, M. E. (2025). Folliculogenesis: A Cellular Crosstalk Mechanism. In *Current Issues in Molecular Biology* (Vol. 47, Issue 2). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/cimb47020113>
- Pala, H. G., Pala, E. E., Artunc Ulkumen, B., & Erbas, O. (2021a). Protective effects of dichloroacetic acid on endometrial injury and ovarian reserve in an experimental rat model of diabetes mellitus. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 47(12), 4319–4328. <https://doi.org/10.1111/JOG.15045>,
- Parsania, S., Shabani, M., Moazzami, K., Razavinasab, M., Larizadeh, M. H., Nazeri, M., Asadi-Shekaari, M., & Kermani, M. (2014). Gender difference in motor impairments induced by chronic administration of vinblastine. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 17(6), 433. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4137941/>
- Pascuali, N., Scotti, L., Di Pietro, M., Oubiña, G., Bas, D., May, M., Gómez Muñoz, A., Cuasnicú, P. S., Cohen, D. J., Tesone, M., Abramovich, D., & Parborell, F. (2018). Ceramide-1-phosphate has protective properties against cyclophosphamide-induced ovarian damage in a mice model of premature ovarian failure. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 33(5), 844–859. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEY045>
- Pepling, M. E., & Spradling, A. C. (2001). Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Developmental Biology*, 234(2), 339–351. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0269>
- Picca, A., Mankowski, R. T., Burman, J. L., Donisi, L., Kim, J. S., Marzetti, E., & Leeuwenburgh, C. (2018). Mitochondrial quality control mechanisms as molecular targets in cardiac ageing. In *Nature Reviews Cardiology* (Vol. 15, Issue 9, pp. 543–554). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0059-z>
- Rian, B., Ruker, J. D., Oshe, M., Alpaz, T., Esta, E. J. R., Eng, I. P., Uchdunger, L. B., Ohn, J., Ord, M. F., Ydon, I. B. L., Antarjian, A. K., Enaud, R., Apdeville, C., Ayuri, S., Hno -J, O., Ones, B. S., Harles, C., & Awyers, L. S. (2001). EFFICACY AND SAFETY OF A SPECIFIC INHIBITOR OF THE BCR-ABL TYROSINE KINASE IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA A BSTRACT. In *NUMBER 14 N Engl J Med* (Vol. 344, Issue 14). www.nejm.org
- Richards, J. S., & Pangas, S. A. (2010a). The ovary: basic biology and clinical implications. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(4), 963. <https://doi.org/10.1172/JCI41350>
- Rodgers, R. J., & Irving-Rodgers, H. F. (2010). Formation of the Ovarian Follicular Antrum and Follicular Fluid. *Biology of Reproduction*, 82(6), 1021–1029. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.109.082941>
- Romito, A., Bove, S., Romito, I., Zace, D., Raimondo, I., Fragomeni, S. M., Rinaldi, P. M., Pagliara, D., Lai, A., Marazzi, F., Marchetti, C., Paris, I., Franceschini, G., Masetti, R., Scambia, G., Fabi, A., & Garganese, G. (2021). Ovarian reserve after chemotherapy in breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Personalized Medicine*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/jpm11080704>
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2016). *Histología: Texto y atlas con correlaciones de biología celular y molecular* (7th ed.). Editorial Médica Panamericana.

- Russo, A., & Pacchierotti, F. (1988). Meiotic arrest and aneuploidy induced by vinblastine in mouse oocytes. *Mutation Research*, 202(1), 215–221. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(88\)90185-6](https://doi.org/10.1016/0027-5107(88)90185-6)
- Saitou, M. (2021). Mammalian Germ Cell Development: From Mechanism to In Vitro Reconstitution. *Stem Cell Reports*, 16(4), 669–680. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.01.008>
- Saldaña, J. C., & Chávez-Genaro, R. (2023). *Manejo de animales tradicionales en experimentación*.
- Siegel, R. L., Kratzer, T. B., Giaquinto, A. N., Sung, H., & Jemal, A. (2025). Cancer statistics, 2025. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 75(1), 10–45. <https://doi.org/10.3322/caac.21871>
- Singh, R., Letai, A., & Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 20, Issue 3, pp. 175–193). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0089-8>
- Sonigo, C., Beau, I., Binart, N., & Grynberg, M. (2019). The Impact of Chemotherapy on the Ovaries: Molecular Aspects and the Prevention of Ovarian Damage. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21). <https://doi.org/10.3390/IJMS20215342>
- Spears, N., Lopes, F., Stefansdottir, A., Rossi, V., De Felici, M., Anderson, R. A., & Klinger, F. G. (2019). Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection. *Human Reproduction Update*, 25(6), 673–693. <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMZ027>
- Stacpoole, P. W. (2017). Therapeutic Targeting of the Pyruvate Dehydrogenase Complex/Pyruvate Dehydrogenase Kinase (PDC/PDK) Axis in Cancer. In *Journal of the National Cancer Institute* (Vol. 109, Issue 11). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jnci/djx071>
- Sugiura, K., Su, Y. Q., Diaz, F. J., Pangas, S. A., Sharma, S., Wigglesworth, K., O'Brien, M. J., Matzuk, M. M., Shimasaki, S., & Eppig, J. J. (2007). Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. *Development (Cambridge, England)*, 134(14), 2593–2603. <https://doi.org/10.1242/DEV.006882>
- Sun, X., Su, Y., He, Y., Zhang, J., Liu, W., Zhang, H., Hou, Z., Liu, J., & Li, J. (2015). New strategy for in vitro activation of primordial follicles with mTOR and PI3K stimulators. *Cell Cycle*, 14(5), 721–731. <https://doi.org/10.1080/15384101.2014.995496>
- Tataranni, T., & Piccoli, C. (2019). Dichloroacetate (DCA) and Cancer: An Overview towards Clinical Applications. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/8201079>
- Tatone, C., Carbone, M. C., Falone, S., Aimola, P., Giardinelli, A., Caserta, D., Marci, R., Pandolfi, A., Ragnelli, A. M., & Amicarelli, F. (2006). Age-dependent changes in the expression of superoxide dismutases and catalase are associated with ultrastructural modifications in human granulosa cells. *Molecular Human Reproduction*, 12(11), 655–660. <https://doi.org/10.1093/molehr/gal080>
- Teilmann, S. C. (2005). Differential expression and localisation of connexin-37 and connexin-43 in follicles of different stages in the 4-week-old mouse ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 234(1–2), 27–35. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2004.10.014>
- Telfer, E. E., Grosbois, J., Odey, Y. L., Rosario, R., & Anderson, R. A. (2023). MAKING A GOOD EGG: HUMAN OOCYTE HEALTH, AGING, AND IN VITRO DEVELOPMENT. In *Physiological Reviews* (Vol. 103, Issue 4, pp. 2623–2677). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2022>
- Tian, L., Wu, D., Dasgupta, A., Chen, K. H., Mewburn, J., Potus, F., Lima, P. D. A., Hong, Z., Zhao, Y. Y., Hindmarch, C. C. T., Kutty, S., Provencher, S., Bonnet, S., Sutendra, G., & Archer, S. L. (2020). Epigenetic Metabolic Reprogramming of Right Ventricular Fibroblasts in Pulmonary Arterial Hypertension: A Pyruvate Dehydrogenase Kinase-Dependent Shift in

- Mitochondrial Metabolism Promotes Right Ventricular Fibrosis. *Circulation Research*, 126(12), 1723–1745. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.316443>,
- Triarico, S., Romano, A., Attinà, G., Capozza, M. A., Maurizi, P., Mastrangelo, S., & Ruggiero, A. (2021). Vincristine-Induced Peripheral Neuropathy (VIPN) in Pediatric Tumors: Mechanisms, Risk Factors, Strategies of Prevention and Treatment. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 4112, 22(8), 4112. <https://doi.org/10.3390/IJMS22084112>
- Urs, D. B. S., Wu, W. H., Komrskova, K., Postlerova, P., Lin, Y. F., Tzeng, C. R., & Kao, S. H. (2020). Mitochondrial function in modulating human granulosa cell steroidogenesis and female fertility. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10). <https://doi.org/10.3390/ijms21103592>
- Van Blerkom, J., Davis, P. W., & Lee, J. (1995). Fertilization and early embryology: ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Human Reproduction*, 10(2), 415–424. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.HUMREP.A135954>
- van der Reest, J., Nardini Cecchino, G., Haigis, M. C., & Kordowitzki, P. (2021). Mitochondria: Their relevance during oocyte ageing. *Ageing Research Reviews*, 70(June), 101378. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101378>
- Wang, Q., & Hutt, K. J. (2021). Evaluation of mitochondria in mouse oocytes following cisplatin exposure. *Journal of Ovarian Research*, 14(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13048-021-00817-w>
- Wang, W., Liu, H. L., Tian, W., Zhang, F. F., Gong, Y., Chen, J. W., Mao, D. G., & Shi, F. X. (2010). Morphologic observation and classification criteria of atretic follicles in guinea pigs. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 11(5), 307–314. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0900391>
- Wei, Q., Su, J., Dong, G., Zhang, M., Huo, Y., & Dong, Z. (2019). Glycolysis inhibitors suppress renal interstitial fibrosis via divergent effects on fibroblasts and tubular cells. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 316(6), F1162–F1172. <https://doi.org/10.1152/AJPRENAL.00422.2018>
- Weigel, M. T., & Dowsett, M. (2010). Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocrine-Related Cancer*, 17(4). <https://doi.org/10.1677/ERC-10-0136>
- Winship et al., 2019. (2019). Vincristine Chemotherapy Induces Atresia of Growing Ovarian Follicles in Mice. *Toxicological Sciences*, Volume 169(Issue 1), Pages 43–53. <https://academic.oup.com/toxsci/article-abstract/169/1/43/5292299?redirectedFrom=fulltext>
- Woodruff, T. K. (2015). Oncofertility: a grand collaboration between reproductive medicine and oncology. *Reproduction (Cambridge, England)*, 150(3), S1–S10. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0163>
- Yadav, P. K., Tiwari, M., Gupta, A., Sharma, A., Prasad, S., Pandey, A. N., & Chaube, S. K. (2018). Germ cell depletion from mammalian ovary: Possible involvement of apoptosis and autophagy. *Journal of Biomedical Science*, 25(1). <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0438-0>
- Zhang, L., Guo, Y., Huang, E., Lu, J., Wang, T., Shi, Y., Lv, M., Chen, Y., Li, S., Yuan, X., & Li, J. (2025). Pyruvate Regulates the Expression of DLAT to Promote Follicular Growth. *Cells*, 14(6). <https://doi.org/10.3390/CELLS14060444>
- Zhang, T., He, M., Zhang, J., Tong, Y., Chen, T., Wang, C., Pan, W., & Xiao, Z. (2023). Mechanisms of primordial follicle activation and new pregnancy opportunity for premature ovarian failure patients. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 14). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1113684>
- Zheng, J. H., Zhang, J. K., Tian, Y. P., Song, Y. B., Yang, Z. W., & Huang, X. H. (2021). A Stereological Study of Mouse Ovary Tissues for 3D Bioprinting Application. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 14(3), 259–265. <https://doi.org/10.1007/s12195-021-00668-x>

Zhu, M., Xu, M., Zhang, J., & Zheng, C. (2023). The role of Hippo pathway in ovarian development. *Frontiers in Physiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2023.1198873>