



ORIGINAL

La administración de tungstato sódico restaura la ovulación y la fertilidad en ratones infértiles IRS2^{-/-}☆



Ignasi Canals^{a,*}, Agnès Arbat^a, Pilar Cot^b y Joana Moitinho Oliveira^c

^a Oxolife S.L., Sant Quirze del Vallès, Barcelona, España

^b Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Quirón, Barcelona, España

^c Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, Barcelona, España

Recibido el 18 de mayo de 2016; aceptado el 31 de agosto de 2016

Disponible en Internet el 30 de septiembre de 2016

PALABRAS CLAVE

Tungstato sódico;
Fertilidad;
Ovulación;
Embarazo

Resumen La supresión del gen del sustrato 2 del receptor de insulina (IRS-2) induce una alteración del eje hipotálamo-ovárico como consecuencia de la inducción de resistencia central a leptina. Las hembras IRS-2^{-/-} se caracterizan por una anovulación persistente, acompañada de la ausencia del ciclo estral, que se traduce en una marcada reducción de la fertilidad (tasa embarazo: 9% IRS-2^{-/-} frente 100% IRS-2^{wt}). El tungstato sódico (Na₂WO₄) ha demostrado su capacidad para revertir estados de resistencia a la leptina mediante una inhibición de fosfatasa implicadas en la cascada de señalización de diversas citoquinas. El objetivo del presente trabajo es realizar una aproximación experimental para determinar el potencial interés del Na₂WO₄ en la capacidad reproductiva de ratones hembra anovuladoras IRS-2^{-/-}.

Material y métodos: Se administró Na₂WO₄ (2 g/l en agua de bebida) a ratones hembra IRS-2^{-/-}. Se estudió el ciclo estral mediante citologías vaginales y la tasa de embarazo tras el cruce de machos IRS-2^{wt}.

Resultados: Durante la fase de pretratamiento se confirmó la ausencia de ciclo estral en los ratones IRS-2^{-/-}. Tras 7 días de tratamiento todos los animales mostraban fases tardías del ciclo (estro y metaestro) en las citologías, indicando una recuperación del ciclo ovulatorio normal. Al final del estudio, tras realizar los cruces con machos IRS-2^{wt} competentes, un 80% de las hembras tratadas con Na₂WO₄ habían quedado embarazadas. Estos resultados indican una recuperación de la fertilidad, en contraposición a la tasa de embarazo descrita para las hembras IRS-2^{-/-} sin tratamiento (9%).

Conclusiones: Por primera vez, se describe el efecto directo del Na₂WO₄ en la restauración de la función ovárica y de la fertilidad en ratones hembra IRS-2^{-/-}.

© 2016 Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción y Sociedad Española de Fertilidad. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

☆ Ignasi Canals y Agnès Arbat han contribuido por igual en la elaboración de este trabajo.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: i.canals@oxolife.com (I. Canals).

KEYWORDS

Sodium tungstate;
Fertility;
Ovulation;
Pregnancy

Sodium tungstate administration restores ovulation and fertility in infertile IRS2^{-/-} mice

Abstract Insulin receptor substrate-2 (IRS-2) gene suppression induces an alteration of hypothalamic-ovarian axis as a result of central leptin resistance induction. IRS-2^{-/-} females mice are characterised by persistent anovulation, accompanied by the absence of the oestrous cycle, which results in a marked reduction in fertility (pregnancy rate: 9% IRS-2^{-/-} vs. 100% IRS-2^{wt}). Sodium tungstate (Na₂WO₄) has demonstrated its ability to reverse the leptin resistance state through an inhibition of phosphatases involved in the signalling pathway of several cytokines. The objective of this work is to present an experimental approach to determine a potential interest towards Na₂WO₄ in the reproductive ability of anovulatory IRS-2^{-/-} female mice.

Material and methods: Na₂WO₄ was administered in drinking water (2 g/L) to female mice. The oestrous cycle was assessed through vaginal smears, and pregnancy rates were measured after mating with IRS-2^{wt} males.

Results: Lack of oestrous cycle was confirmed in the mice during the pre-treatment period. After 7 days of treatment all animals showed delayed cycle phases (oestrous and meta-oestrous) in vaginal smears, indicating a recovery of normal ovulatory cycle. At the end of the study, after mating with competent IRS-2^{wt} male, 80% of females treated with Na₂WO₄ were pregnant. These results show a fertility recovery, as opposed to the pregnancy rate described in untreated IRS-2^{-/-} (9%).

Conclusions: For the first time, a description is presented of the direct effect of Na₂WO₄ in the restoration of ovarian function and fertility in IRS-2^{-/-} female mice.

© 2016 Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción y Sociedad Española de Fertilidad. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción**Leptina y su rol en la fertilidad**

La leptina, hormona secretada por adipocitos, es una proteína clave en diversas funciones más allá de las descritas inicialmente como indicador de las reservas energéticas periféricas y controlador de la homeostasis energética (Friedman y Halaas, 1998). Se ha descrito el papel crucial de la leptina en procesos biológicos como la angiogénesis, la función inmune, la inflamación y la función reproductora (Brewer y Balen, 2010; Cervero et al., 2005; Pérez-Pérez et al., 2015).

La leptina juega un rol crítico en la función reproductora, es esencial en el inicio de la pubertad, en el dimorfismo sexual y en la regulación de la señalización neuronal para modular el eje hipotálamo-hipófiso-ovárico (HHO) (Moschos et al., 2002). La hormona se une a su receptor a nivel hipotálamico y activa una cascada de señalización bien establecida en la que participa el sistema *janus kinase/signal transducer and activator of transcription* (JAK/STAT) (Villanueva y Myers, 2008). Esta cascada de señalización está compartida por otras citoquinas, como interleucinas o el factor inhibidor de la leucemia. También se han descrito acciones directas de la leptina en otros tejidos relacionados con la función reproductora, estableciéndose acciones directas de la hormona en el ovario, el embrión y el endometrio, capaces de modular el desarrollo folicular, la calidad embrionaria, la tasa de implantación y la placentación (Brewer y Balen, 2010; Cervero et al., 2005; Elías y Purohit, 2013; Pérez-Pérez et al., 2015). Se ha descrito su actividad como un activador

inicial de la cascada de señalización obligatoria en el proceso de implantación embrionaria (Ramos et al., 2005), en la que JAK/STAT son pasos críticos del proceso (Gonzalez et al., 2004; Salamonsen et al., 2010). También se ha establecido la implicación de la leptina en la prevención del aborto (Maheshwari et al., 2007). Por lo tanto, no parece sorprender que en enfermedades o alteraciones metabólicas dependientes de leptina, obesidad o síndrome del ovario poliquístico, entre otras, exista un alto riesgo de infertilidad debido a deficiencias en la ovulación y a la implantación embrionaria (Duggal et al., 2000). Así, la ausencia, el exceso y/o la resistencia a la leptina están claramente relacionadas con una baja eficiencia reproductiva o infertilidad (Elías y Purohit, 2013).

El tungstato sódico modula la señal de citoquinas

El tungstato sódico (Na₂WO₄) es una sal inorgánica de tungsteno con una actividad inhibidora de fosfatasa moderada, que ha evidenciado que ejerce un incremento de la actividad de leptina, entre otras citoquinas, modulando la señalización intracelular de estas hormonas señalizadoras, especialmente la cascada que involucra a JAK-2/STAT-3 (Amigó-Correig et al., 2011; Canals et al., 2009). La seguridad y la tolerabilidad de esta molécula tras su administración en humanos y animales son conocidas por los diversos estudios preclínicos y clínicos (estudios de fase I y II) realizados hasta la fecha (Hanzu et al., 2010).

Se ha demostrado que el Na₂WO₄ es capaz de disminuir la glucemia y mejorar la diabetes a través de una mejoría de la sensibilidad a la insulina, entre otros mecanismos (Claret

et al., 2005). También se ha demostrado un claro efecto sobre el peso corporal, a través del control del gasto energético y la ingesta, a través de un mecanismo dependiente de leptina y mediante la modulación de JAK-2/STAT-3 (Amigó-Correig et al., 2011; Canals et al., 2009; Claret et al., 2005).

La evidencia disponible sugeriría que el Na_2WO_4 podría mejorar la eficiencia reproductiva a través de efectos sistémicos sobre el eje HHO y efectos directos en el endometrio, el ovocito y el embrión para alcanzar mayores tasas de implantación.

Ratón knock-out IRS-2: un modelo para el estudio de la infertilidad femenina

En el modelo de ratón IRS-2^{-/-}, desarrollado por Burks et al. (2000), se induce una delección del gen *insulin receptor substrate-2* (IRS-2), que se traduce en un claro dimorfismo sexual en relación con la fertilidad y al metabolismo de los hidratos de carbono.

Los machos de este modelo presentan resistencia a la insulina y una severa hiperglucemia iniciada desde edades tempranas. Por contra, en edades tempranas las hembras se mantienen relativamente euglucémicas y desarrollan una ligera resistencia a la insulina, que se mantiene hasta edades avanzadas (4-5 meses). Las hembras IRS-2^{-/-} en edades tempranas, alrededor de 10 semanas de edad, muestran un bajo desarrollo folicular y una anovulación persistente, acompañada de la ausencia del ciclo estral en la mayoría de los ratones. La tasa de embarazos de los ratones hembra IRS-2^{-/-} es del 9%, frente a una tasa del 100% en ratones hembra IRS^{wt} (IRS-2^{+/+} wild-type). Dado que en estas edades las hembras se mantienen euglucémicas y que únicamente desarrollan una ligera resistencia a la insulina, la profunda alteración en la fertilidad no es una consecuencia directa de las anomalías en el metabolismo de la glucosa. Las hembras de este modelo presentan alteraciones en los niveles circulantes de leptina desde edades tempranas. Así, ya en las 4 primeras semanas de edad los niveles circulantes de esta leptina son 2,5 veces superiores a los animales wild-type y a las 8 semanas son 5 veces superiores. Una evidente resistencia hipotalámica a la leptina se sugiere como el mecanismo más plausible responsable de la infertilidad en las hembras de este modelo animal.

Las características de este modelo animal le hacen útil para el estudio de la infertilidad relacionada con estados de resistencia a la leptina como la obesidad o el síndrome del ovario poliquístico, entre otros. Por lo tanto, este modelo animal abarca una serie de factores importantes relacionados con infertilidad, y como tal es un modelo adecuado para estudiar la eficacia del Na_2WO_4 en el tratamiento de la infertilidad.

El trabajo actual pretende hacer una primera aproximación experimental para determinar el efecto del Na_2WO_4 sobre la capacidad reproductiva de un modelo animal, ratones hembra IRS-2^{-/-}, en los que se ha descrito una limitada capacidad reproductiva como consecuencia de una profunda anovulación. Los resultados de esta prueba de concepto permitirán determinar el interés del Na_2WO_4 en el tratamiento de la fertilidad, que deberá confirmarse con estudios controlados y bien diseñados para determinar su alcance.

Material y métodos

Animales

Para la realización de esta prueba de concepto se utilizaron ratones hembra IRS-2^{-/-} mantenidos en una colonia con *background* genético mixto C57Bl/6 x 129Sv, generados como ha sido previamente descrito (Withers et al., 1998, 1999). Ratones hembra IRS-2^{-/-} y ratones macho wild-type (IRS-2^{wt}) de edades comprendidas entre 6 y 8 semanas se estabularon en ciclo luz/oscuridad de 12 h y temperatura y humedad normales. Los animales tuvieron acceso *ad libitum* tanto al agua de bebida como al alimento (pienso estándar tipo A04 Panlab, Barcelona).

Todos los procedimientos realizados en este estudio fueron realizados de acuerdo a las guías de cuidado de animales de laboratorio (regulación local y europea) y aprobados por el comité de experimentación animal de la Universitat de Barcelona.

Tratamiento

Los ratones hembra IRS-2^{-/-} se estabularon en grupos de 4-6 ratones/jaula. Tras un periodo de aclimatación, los animales se mantuvieron 2 semanas en fase de pretratamiento, durante las que se administraron comida y bebida en las condiciones previamente descritas. Tras este periodo se administró Na_2WO_4 (tungstato sódico dihidrato CAS-num 6132-04-3 Sigma-Aldrich) en el agua de bebida (2 mg/ml en agua bidestilada) con acceso *ad libitum*. El tratamiento se inició inmediatamente después de la fase de pretratamiento (día 0 de tratamiento) y hasta 4 semanas antes del sacrificio de los animales. La dosis diaria de Na_2WO_4 ingerida por los ratones no fue controlada, pero se estima que fue aproximadamente de 180 mg/kg de peso corporal, según ha sido descrito previamente en modelos animales y diseños experimentales similares (Canals et al., 2009; Claret et al., 2005). En un grupo de animales se monitorizó el peso corporal y la glucemia durante los primeros 12 días de tratamiento. Tras 6 h de ayuno se midieron los niveles de glucosa en sangre en los días 2, 5, 7, 9 y 12 de tratamiento, las medidas se realizaron con un sensor de glucosa Accutrend (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Este grupo de animales no se incluyó en la determinación del ciclo estral ni en el análisis posterior de la tasa de embarazo, con la intención de evitar interferencia que pudiesen ser causadas por el estrés generado por los repetidos periodos de ayuno.

Citologías vaginales

Se eligieron 6 ratones hembras IRS-2^{-/-} al azar para la determinación del ciclo estral. Se les realizaron frotis vaginales en los días pretratamiento (-8, -5, -2 y -1) y en los días de tratamiento (7, 8, 14, 15 y 22). Para la realización de los frotis vaginales se introdujo en la vagina de los ratones entre 1 y 2 ml de solución salina con una pipeta Pasteur. Con la misma pipeta se recogió el exudado vaginal y se extendió en un portaobjetos. Una vez secado al aire, se fijó y se tiñó con la técnica de Papanicolaou. Las preparaciones se analizaron por personal entrenado y a ciego simple para

Tabla 1 Determinación del ciclo estral mediante citologías

ID Ratón	Tiempo (días)									
	-8	-5	-2	-1	7	8	14	15	22	
1	A	A	P	D	E	E-M	E	E	A	
2	A	D	P	P	E	E-M	E-M	A	D	
3	D-P	D	P	P	E	E	E-M	M	A	
5	D	D	P	P	E	E	E-M	M	M	
8	D	D	P	P	E-M	E-M	D	E	P	
9	D	D	-	P	M	M	-	D	D	

Las fases del ciclo estral son las siguientes: A: anestro; D: diestro; P: proestro; E: estro; M: metaestro.

eliminar el sesgo del evaluador. Las muestras se clasificaron en las siguientes fases: diestro, proestro, estro, metaestro, anestro o no evaluable.

Tasa de fertilidad

A partir la tercera semana de tratamiento, los ratones hembra IRS-2^{-/-} se establecieron por parejas junto a un ratón macho IRS-2^{wt} competentes durante 12 semanas. Los ratones se observaron diariamente en busca de signos de embarazo o parto. El tratamiento con Na₂WO₄ se mantuvo durante las 8 semanas de establecimiento conjunta de machos y hembras, periodo tras el que se retiró el tratamiento. En el caso de embarazo las hembras fueron establecidas individualmente hasta el parto, manteniendo el tratamiento según el diseño del estudio. Estas hembras no se reincorporaron al estudio. Transcurridas las 12 semanas, las hembras que permanecían en el estudio fueron sacrificadas y biopsiadas en busca de indicios de embarazo, para calcular la tasa de fertilidad.

Resultados

El tungstato sódico restaura la ciclicidad del ciclo en ratones hembra IRS-2^{-/-}

En la evaluación de las citologías de ratones hembra IRS-2^{-/-} se identificaron fases anestro/diestro, proestro, estro, metaestro. La presencia de las 4 fases del ciclo en periodos de 4 a 6 días es indicativa de la ciclicidad estral y de un ciclo ovárico normal. Sin embargo, la persistencia en fases anestro/diestro o proestro son indicadores de la ausencia de ciclicidad. Teniendo en consideración este patrón, se pueden determinar patrones diferenciales en el ciclo estral entre las fases de pretratamiento y tratamiento (tabla 1). Así, se observa que en las fases de pretratamiento todos los animales estudiados permanecen en fases anestro/diestro o proestro, mientras que en la fase de tratamiento se observa que todos los animales alcanzan fases tardías del ciclo (estro y metaestro), indicando que han recuperado el ciclo estral. Estos cambios en el ciclo se observan ya desde la primera medida realizada durante el periodo de tratamiento (día 7), indicando una rápida recuperación del ciclo estral con la administración de Na₂WO₄. Adicionalmente se puede observar una reducción de los ciclos en estro y metaestro en las citologías realizadas en el día 22 de tratamiento. No obstante, el diseño del estudio no permite determinar si se

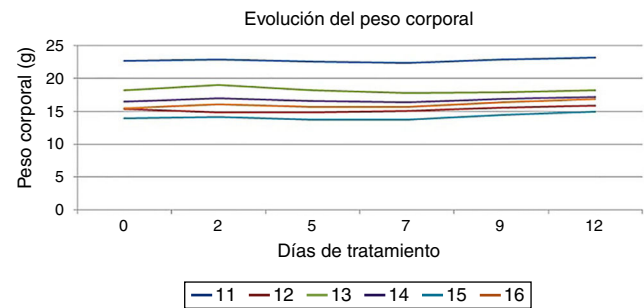


Figura 1 Evolución del peso corporal en ratones IRS-2^{-/-} tratados con Na₂WO₄.

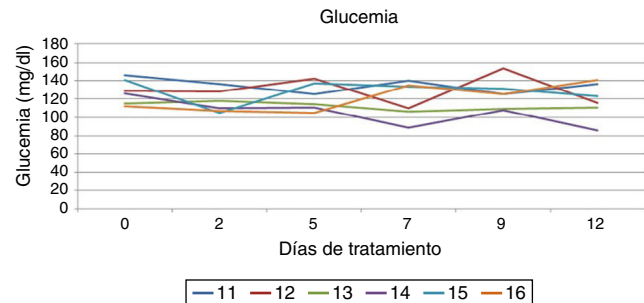


Figura 2 Evolución de la glucosa en sangre en ratones IRS-2^{-/-} tratados con Na₂WO₄.

trata de un efecto aleatorio en el que la mayoría de los animales se encuentran en fases tempranas del ciclo o de una disminución del efecto del tratamiento.

La recuperación del ciclo estral en ratones hembra IRS-2^{-/-} con el tratamiento del tungstato sódico es independiente de cambios en la ganancia ponderal y en el metabolismo de la glucosa

Se monitorizó la evolución de la ganancia ponderal en ratones hembra IRS-2^{-/-} durante los primeros 12 días de tratamiento con Na₂WO₄. En este periodo no se observaron cambios significativos en el peso corporal de los ratones (fig. 1). De la misma forma, se monitorizaron los niveles de glucosa en sangre en los mismos animales tras 6 h de ayuno. Como previamente estaba descrito, los animales mostraron niveles de glucosa ligeramente superiores a los normales, pero en los márgenes de la euglucemia (fig. 2). Durante los primeros días de tratamiento no se observaron cambios en los niveles de glucosa en sangre.

El tungstato sódico recupera la fertilidad en ratones hembra IRS-2^{-/-}

Tras finalizar el periodo de cruces entre hembras IRS-2^{-/-} y machos IRS-2^{wt}, se sacrificaron las hembras que no habían parido y se biopsiaron en búsqueda de signos de embarazos. Cuatro hembras habían parido durante el periodo de estudio. En el momento del sacrificio 4 hembras estaban embarazadas en diferentes estadios de gestación. Así, un total de 8 de las 10 hembras tratadas (80%) estaban embarazadas o habían parido en el momento del sacrificio (tabla 2). Esta tasa de

Tabla 2 Tasas de embarazo y crías/embriones en ratones hembra IRS-2^{-/-} tratados con Na₂WO₄

N.º ratón	Embarazo	Número de embriones implantados o crías nacidas	Momento del parto o edad embrionaria en el momento del sacrificio ^a
1	Sí	1 cría	Semana parto: 4
2	Sí	8 crías	Semana parto: 10
3	Sí	7 embriones	Embriones: E10-13
4	Sí	3 crías	Semana parto: 5
5	Sí	7 embriones	Embriones: E10-13
6	No	—	—
7	Sí	6 embriones	Embriones: E18-19
8	Sí	8 crías	Semana parto: 5
9	No	—	—
10	Sí	7 embriones	Embriones: E15

^a El momento del parto se definió como semanas transcurridas desde el primer día de inicio de cruces con machos competentes.

embarazo es muy superior al 9% descrito previamente en hembras IRS-2^{-/-} no tratadas (Burks et al., 2000).

El número medio de crías/embriones por hembra embarazada fue de 4,7 (mediana 6,5 crías/hembra). No se observaron anomalías a nivel macroscópico en los fetos ni en las crías nacidas.

Estos resultados sugieren que la administración de Na₂WO₄ mantiene la recuperación de la ovulación y permite la recuperación de la fertilidad en ratones hembra IRS-2^{-/-}.

Discusión

Este estudio pretende hacer una primera aproximación experimental para determinar el efecto del Na₂WO₄ sobre la capacidad reproductiva un modelo animal, ratones hembra IRS-2^{-/-}. Los resultados sugieren por primera vez, a nuestro conocimiento, los efectos directos del Na₂WO₄ en la fertilidad femenina. En estudios anteriores, Ballester et al. (2007) demostraron que la restauración parcial del metabolismo de la glucosa en ratas diabéticas tras la administración de Na₂WO₄ durante 11 semanas recupera parcialmente la capacidad fértil de las hembras. Sin embargo, nuestro estudio demuestra un efecto del Na₂WO₄ en la restauración del ciclo estral en tras solo 7 días de tratamiento e independientemente de cambios en los niveles de glucosa y en la ganancia ponderal.

El modelo animal utilizado, IRS-2^{-/-}, representa un modelo útil para estudiar las deficiencias en el sistema reproductivo, especialmente las relacionadas con la resistencia a la leptina. Las alteraciones en la función ovárica y en la señalización a nivel hipotalámico de estos animales presentan similitudes con diversas alteraciones en humanos, como el síndrome del ovario poliquístico o la obesidad, que tienen un importante impacto sobre la fertilidad (Burks et al., 2000). Así, los efectos del Na₂WO₄ aquí presentados podrían tener una traducción en posibles tratamientos en el manejo de la fertilidad en humanos.

El objetivo principal de esta prueba de concepto fue el estudio del ciclo ovárico en el modelo animal. En estudios

anteriores con ratones hembras IRS-2^{-/-} se ha observado una drástica disminución de folículos antrales frente a los animales wild-type, y la práctica ausencia de cuerpos lúteos, indicando la anovulación como causa de la infertilidad en estos animales (Burks et al., 2000). Una técnica clásica para el estudio del ciclo estral en roedores *in vivo* se basa en el análisis de citologías vaginales (Deb et al., 2006). Mediante esta técnica se pueden identificar las 4 fases del ciclo estral en roedores que ciclan normalmente, mientras que en animales anovuladores solo se pueden identificar las fases iniciales anestro/diestro y proestro. En nuestros resultados se observa que en las fases de pretratamiento ninguna de las citologías realizadas se encuentran en estadios tardíos del ciclo, indicando ausencia de ciclo estral y, por tanto, de ovulación. Sin embargo, tras solo 7 días de tratamiento con Na₂WO₄ se observan citologías en los 4 estadios, indicando la recuperación del ciclo estral. En este experimento las citología se han realizado en días no consecutivos, lo que puede suponer una limitación del estudio, pero teniendo en consideración que la duración del ciclo estral en ratones es de 4-5 días (Salvador, 2001), con la distribución de los días en que se realizan las medidas deberían identificarse estadios avanzados del ciclo en la fase de pretratamiento. Adicionalmente se observa que en el último día de recogida de las citologías hay una reducción en el número de hembras en estadios tardíos del ciclo (estro y metaestro). El diseño del estudio no permite determinar si se trata de un efecto aleatorio en el que la mayoría de los animales se encuentran en fases tempranas de un ciclo recuperado y normal, o de una disminución del efecto del tratamiento. Sin embargo, el hecho de que estas hembras se queden embarazadas en días posteriores nos sugiere que el Na₂WO₄ mantiene su actividad en la función ovárica a medio y largo plazo.

La recuperación de la ovulación es el paso previo para la restauración de la fertilidad en hembras IRS-2^{-/-}. Estas presentan solo un 9% de tasa de embarazo al cruzarlos con machos wild-type competentes, mientras que en nuestro trabajo la tasa de embarazo se eleva hasta el 80% al tratar con Na₂WO₄. Estos resultados certifican que los ratones han recuperado la función ovárica, tal y como indicaban las citologías vaginales. Se ha observado una tardanza en el embarazo en varios de estos animales. Las causas de este retraso en conseguir el embarazo no quedan esclarecidas en nuestro trabajo. La ausencia de un grupo control y la ausencia de datos en la publicación de Burks et al. (2000) respecto al tiempo requerido por estos animales para conseguir un embarazo impiden evaluar si este efecto está relacionado con el tratamiento con Na₂WO₄ o si los tiempos se encuentran dentro de la normalidad. Este efecto se deberá estudiar en profundidad en futuros estudios controlados. Otro aspecto metodológico a discutir es la administración de Na₂WO₄ a los machos competentes y el efecto que puede producir en la capacidad fértil de estos. Sin embargo, trabajos anteriores han descartado cualquier efecto positivo o deletéreo del Na₂WO₄ sobre la fertilidad en ratones machos (Ballester et al., 2005), por lo que el efecto en este experimento es negligible.

No se han observado anomalías macroscópicas en las crías ni en los embriones, en concordancia con los estudios preclínicos de seguridad que se han realizado con el Na₂WO₄.

El estudio demuestra un efecto sistémico del Na₂WO₄ sobre la fertilidad mediante la restauración de la

ovulación. En el modelo IRS-2^{-/-} no se han descrito alteraciones a nivel uterino ni embrionario, pero no podemos descartar que el Na₂WO₄ tenga actividad directa en estos tejidos. De hecho, hay evidencias que indican que tanto la leptina como el receptor de leptina juegan un papel fundamental en la comunicación embrión-endometrio en el momento de la implantación (Ramos et al., 2005), y la vía de señalización JAK/STAT es crítica en este proceso (Gonzalez y Leavis, 2003; Catalano et al., 2005; Nakamura et al., 2006; Salamonsen et al., 2010). Además, la señal de leptina induce la secreción de factores de crecimiento vasculares endotelial (VEGF) en células endometriales, mecanismo por el que la leptina impactaría en el proceso de implantación. Diversos trabajos han demostrado el efecto del Na₂WO₄ sobre la expresión de VEGF (Bertinat et al., 2015) y sobre la modulación de la fosforilación de JAK-2 y STAT-3, principal mecanismo de modulación de la señal de leptina (Amigó-Correig et al., 2011). Adicionalmente, experimentos realizados en nuestro grupo de trabajo en colaboración con el Dr. Simón (Fundación IVI) nos muestran un efecto directo del Na₂WO₄ sobre células endometriales (HEC-1A), aumentando hasta un 69% la tasa de adhesión de esferoides JEG-3, tras 24 h de incubación con Na₂WO₄ (datos no publicados). Por tanto, el efecto del Na₂WO₄ sobre otros procesos clave en la fertilidad, como la implantación o la placentación, no pueden ser descartados y deben ser estudiados.

Como se ya se ha comentado, este trabajo pretende ser una primera aproximación experimental para determinar cuál es el papel del Na₂WO₄ en el manejo de la fertilidad en modelos con resistencia a la leptina. Las limitaciones experimentales son importantes, por lo que los resultados deben ser confirmados en estudios controlados y de diseño robusto. La ausencia de un grupo control o la realización de las citologías en días no consecutivos dificultan la interpretación de los datos. Sin embargo, la contundencia de los hallazgos en esta prueba de concepto nos sugiere una actividad relevante del Na₂WO₄ en el manejo de la fertilidad. Otras moléculas con actividad inhibidora de fosfatasa, como derivados del molibdeno, vanadio, cromo o selenio, o sales de tungsteno diferentes al Na₂WO₄ (Hsu y Goetz, 1992), también podrían ser efectivas en el tratamiento de la infertilidad o la mejora de la eficiencia reproductiva en mamíferos.

Los resultados de esta primera aproximación experimental indican que el Na₂WO₄ es capaz de recuperar el ciclo estral en ratones hembra IRS-2^{-/-} anovuladoras, por lo menos en las primeras semanas de tratamiento, y conseguir altas tasas de embarazo. Estos resultados abren el interés hacia un estudio controlado y de diseño experimental más robusto que permita definir el efecto del Na₂WO₄ en la fertilidad en mamíferos.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses en la elaboración de este trabajo.

Agradecimientos

Los autores agradecen a R. Gomis, F. Hanzu y J. Calaf por sus consejos durante el desarrollo del estudio y la revisión crítica de los resultados presentados en este manuscrito.

Bibliografía

- Amigó-Correig, M., Barceló-Batlloiri, S., Piquer, S., Soty, M., Puigadas, G., Gasa, R., et al., 2011. Sodium tungstate regulates food intake and body weight through activation of the hypothalamic leptin pathway. *Diabetes, Obesity & Metabolism* 13, 235–242.
- Ballester, J., Domínguez, J., Muñoz, M., Sensat, M., Rigau, T., Guinovart, J., et al., 2005. Tungstate treatment improves Leydig cell function in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Andrology* 26, 706–715.
- Ballester, J., Muñoz, M., Domínguez, J., Palomo, M., Rivera, M., Rigau, T., et al., 2007. Tungstate administration improves the sexual and reproductive function in female rats with streptozotocin-induced diabetes. *Human Reproduction* 22, 2128–2135.
- Bertinat, R., Silva, P., Mann, E., Li, X., Nualart, F., Yáñez, A., 2015. In vivo sodium tungstate treatment prevents E-cadherin loss induced by diabetic serum in HK-2 cell line. *Journal of Cellular Physiology* 230, 2437–2446.
- Brewer, C., Balen, A., 2010. The adverse effects of obesity on conception and implantation. *Reproduction* 140, 347–364.
- Burks, D., Font de Mora, J., Schubert, M., Withers, D., Myers, M., Towery, H., et al., 2000. IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis. *Nature* 407, 377–382.
- Canals, I., Carmona, M., Amigó, M., Barbera, A., Bortolozzi, A., Artigas, F., et al., 2009. A functional leptin system is essential for sodium tungstate antiobesity action. *Endocrinology* 150, 642–650.
- Catalano, R., Johnson, M., Campbell, E., Charnock-Jones, D., Smith, S., Sharkey, A., 2005. Inhibition of STAT3 activation in the endometrium prevents implantation: A nonsteroidal approach to contraception. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 8585–8590.
- Cervero, A., Horcajadas, J., Domínguez, F., Pellicer, A., Simón, C., 2005. Leptin system in embryo development and implantation: a protein in search of a function. *Reproductive Biomedicine Online* 10, 217–223.
- Claret, M., Corominola, H., Canals, I., Saura, J., Barcelo-Batlloiri, S., Guinovart, J., et al., 2005. Tungstate decreases weight gain and adiposity in obese rats through increased thermogenesis and lipid oxidation. *Endocrinology* 146, 4362–4369.
- Deb, K., Reese, J., Paria, B., 2006. Methodologies to Study Implantation in Mice. En: Soares, M., Hunt, J. (Eds.), *Placenta and Trophoblast. Methods and Protocols* (Vol. I). Humana Press Inc, Totowa, New Jersey, pp. 9–34.
- Duggal, P., van der Hoek, K., Milner, C., Ryan, N., Armstrong, D., Magoffin, D., et al., 2000. The in vivo and in vitro effects of exogenous leptin on ovulation in the rat. *Endocrinology* 141, 1971–1976.

- Elias, C., Purohit, D., 2013. [Leptin signaling and circuits in puberty and fertility. Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS 70, 841–862.](#)
- Friedman, J., Halaas, J., 1998. [Leptin and the regulation of body weight in mammals. Nature 395, 763–770.](#)
- Gonzalez, R., Leavis, P., 2003. [A peptide derived from the human leptin molecule is a potent inhibitor of the leptin receptor function in rabbit endometrial cells. Endocrine 21, 185–195.](#)
- Gonzalez, R., Rueda, B., Ramos, M., Littell, R., Glasser, S., Leavis, P., 2004. [Leptin-induced increase in leukemia inhibitory factor and its receptor by human endometrium is partially mediated by interleukin 1 receptor signaling. Endocrinology 145, 3850–3857.](#)
- Hanzu, F., Gomis, R., Coves, M., Viaplana, J., Palomo, M., Andreu, A., et al., 2010. [Proof-of-concept trial on the efficacy of sodium tungstate in human obesity. Diabetes, Obesity & Metabolism 12, 1013–1018.](#)
- Hsu, S., Goetz, F., 1992. [Oxoanions stimulate in vitro ovulation and signal transduction pathways in goldfish \(*Carassius auratus*\) follicles. American Journal of Physiology 263 \(5 Pt 1\), E943–E949.](#)
- Maheshwari, A., Stofberg, L., Bhattacharya, S., 2007. [Effect of overweight and obesity on assisted reproductive technology—a systematic review. Human Reproduction Update 13, 433–444.](#)
- Moschos, S., Chan, J., Mantzoros, C., 2002. [Leptin and reproduction: a review. Fertility and Sterility 77, 433–444.](#)
- Nakamura, H., Kimura, T., Koyama, S., Ogita, K., Tsutsui, T., Shimoya, K., et al., 2006. [Mouse model of human infertility: transient and local inhibition of endometrial STAT-3 activation results in implantation failure. FEBS Letters 580, 2717–2722.](#)
- Pérez-Pérez, A., Sánchez-Jiménez, F., Maymó, J., Dueñas, J., Varone, C., Sánchez-Margalet, V., 2015. [Role of leptin in female reproduction. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 53, 15–28.](#)
- Ramos, M., Rueda, B., Leavis, P., Gonzalez, R., 2005. [Leptin serves as an upstream activator of an obligatory signaling cascade in the embryo-implantation process. Endocrinology 146, 694–701.](#)
- Salamonsen, L., Menkhurst, E., Dimitriadis, E., 2010. [Leukemia inhibitory factor and human endometrial receptivity. Indian Journal of Physiology and Pharmacology 54, 17–26.](#)
- Salvador, N., 2001. [Biología general del reactivo biológico. En: Zúñiga, J., Tur, J., Milocco, S., Piñeiro, R. \(Eds.\), Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal. McGraw-Hill/Interamericana de España SAU, Aravaca, Madrid, pp. 23–82.](#)
- Villanueva, E., Myers, M.J., 2008. [Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. International Journal of Obesity. 32 \(Suppl 7\), S8–S12.](#)
- Withers, D., Burks, D., Towery, H., Altamuro, S., Flint, C., White, M., 1999. [Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling. Nature Genetics 23, 32–40.](#)
- Withers, D., Gutierrez, J., Towery, H., Burks, D., Ren, J., Previs, S., et al., 1998. [Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. Nature 391, 900–904.](#)