

Tesis Doctoral

# Mecanismos involucrados en la atresia del folículo ovárico: relación entre esteroidogénesis, angiogénesis y apoptosis

Irusta, Griselda

2008

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Irusta, Griselda. (2008). Mecanismos involucrados en la atresia del folículo ovárico: relación entre esteroidogénesis, angiogénesis y apoptosis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Irusta, Griselda. "Mecanismos involucrados en la atresia del folículo ovárico: relación entre esteroidogénesis, angiogénesis y apoptosis". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2008.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**  
**Departamento de Química Biológica**

**MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA ATRESIA DEL  
FOLICULO OVARICO: RELACION ENTRE  
ESTEROIDOGENESIS, ANGIOGENESIS Y APOPTOSIS**

**Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de  
Buenos Aires en el área Química Biológica**

**LIC. GRISELDA IRUSTA**

Directora de Tesis: Dra. Marta Tesone  
Consejero de Estudios: Dra. Marta Tesone

Lugar de trabajo: Laboratorio de Fisiología Ovárica. Instituto de Biología  
y Medicina Experimental (IByME)-CONICET  
Buenos Aires, 2008

# **MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA ATRESIA DEL FOLICULO OVARICO: RELACION ENTRE ESTEROIDOGENESIS, ANGIOGENESIS Y APOPTOSIS**

## **RESUMEN**

En este trabajo se han realizado experimentos para dilucidar la función local en el ovario de la Hormona Liberadora de Gonadotrofinas (GnRH-I). Se han estudiado procesos fundamentales del desarrollo folicular como la síntesis de esteroides sexuales y la angiogénesis ovárica en su relación con la apoptosis folicular.

En nuestro laboratorio se postuló que el GnRH-I ejerce una acción inhibitoria durante el desarrollo folicular actuando como modulador intraovárico. En ratas estimuladas con gonadotrofinas analizamos los niveles de esteroides sexuales y la expresión y contenido de enzimas ováricas responsables de la síntesis de esteroides luego del tratamiento con un agonista de GnRH-I, Acetato de Leuprolide (LA). Los efectos observados se han corroborado con experimentos realizados *in vitro* utilizando este mismo agonista. Además, estudiamos factores angiogénicos esenciales para el desarrollo y establecimiento de la vasculatura en el foliculo ovárico, como también parámetros de la atresia folicular.

El tratamiento con el agonista afectó la síntesis de esteroides ováricos al igual que el contenido folicular de las enzimas esteroideogénicas, produciendo una disminución en la síntesis de andrógenos y como consecuencia, en la producción de estradiol. Estos resultados se observaron en los experimentos realizados *in vivo* e *in vitro*. También se observó una disminución en el contenido de factores angiogénicos y de sus receptores, acompañado de un aumento de la actividad de caspasa-3, enzima efectora clave en el proceso de apoptosis folicular.

Se concluyó que el factor GnRH-I actuaría en el ovario localmente afectando factores esenciales para el desarrollo folicular. Este factor interfiere en la foliculogénesis inducida por gonadotrofinas, alterando la síntesis de esteroides gonadales e inhibiendo la angiogénesis folicular. Esto alteraría el balance de los factores de supervivencia de las células foliculares, causando la activación de proteínas reguladoras de la apoptosis, llevando a los folículos en desarrollo al proceso de atresia.

**Palabras claves:** Esteroidogénesis, Angiogénesis, GnRH-I, Apoptosis, Ovario.

# **MECHANISMS INVOLVED IN OVARIAN FOLLICULAR ATRESIA: RELATIONSHIP BETWEEN STEROIDOGENESIS, ANGIOGENESIS AND APOPTOSIS**

## **SUMMARY**

In the present work, we have performed experiments to elucidate the local ovarian role of Gonadotropin Releasing Hormone-I (GnRH-I). Main processes of the follicular development were studied as sexual steroids synthesis, angiogenesis and its relationship with the follicular apoptosis.

In our laboratory, it was proposed that GnRH-I exerts an inhibitory action of follicular development acting as a local ovarian modulator. In gonadotropin-stimulated rats treated with a GnRH-I agonist, Leuprolide Acetate (LA), we analyzed the sexual steroids levels and the expression and content of steroidogenic enzymes. The *in vivo* results were compared and corroborated by performing *in vitro* experiments using the agonist. Moreover, we analyzed essential angiogenic factors for the development and stabilization of the vascular vessels in the ovarian follicle as well as, follicular atresia parameters.

The agonist treatment altered the ovarian steroids synthesis and the follicular content of the steroidogenic enzymes, diminishing the androgen synthesis and as a consequence, the estradiol production. These results were observed in *in vivo* and *in vitro* experiments. We also observed a decrease in follicular angiogenic factors and their receptors content, and this was parallel to an increase in the activity of caspase-3 enzyme, key effector of the follicular apoptosis process.

We concluded that GnRH-I would act locally in the ovary affecting essential factors for follicular development. In addition it interferes in the gonadotropin-induced folliculogenesis, altering gonadal steroids synthesis and inhibiting follicular angiogenesis. This will lead to an imbalance of the survival factors of the follicular cells, causing the activation of apoptotic regulatory proteins and inducing atresia in the developing follicles.

**Key words:** steroidogenesis, angiogenesis, GnRH-I, apoptosis, ovary

Este trabajo de Tesis, como todo trabajo científico, no es un trabajo individual, es el resultado del esmero de muchas personas que de una u otra forma colaboraron con su realización. Entre ellas, agradezco especialmente:

....a **Sully** por haberme dado la posibilidad de ser parte de su equipo de trabajo, por su guía durante estos años, su paciencia y por su continuo apoyo científico

....a **Fer** por haberme adoptado apenas comencé y por todas las enseñanzas a nivel científico y también personal, y gracias a quien este trabajo no podría haber sido completado en tiempo y forma

.... a **Dalhia** por ser una persona excepcional y de principios, amiga y excelente compañera de trabajo con quien compartimos largas charlas también personales y científicas

.... a **Marina** por las charlas y momentos compartidos y a **Diana** que en estos últimos años aportó al lab su continuo buen humor y compartió nuestro entusiasmo en los experimentos

.....a **Ale Vitale** por acompañarme y guiarme en la primera parte de mi doctorado y por las charlas compartidas

.....a **Fátima y Alejandra** por cederme el espacio para la escritura y el mate

.....a **Rosa Inés, Carla, Analía, Gabi y Mariela**, por los momentos compartidos de los cuales espero poder seguir disfrutando, y en especial a **Mariela** por su infinita ayuda con la computadora y por los cursos compartidos

....a los laboratorios que nos rodean, **las chicas de Omar, Caro en especial, Pati y Elizalde**, que también son parte fundamental del trabajo diario siempre dispuestos a prestar reactivos o contestar dudas

.... a la **Dra. Alicia Motta**, por haberme recibido en su lab y dejarme participar de su grupo de trabajo

.....al **IByME** por darme el lugar para poder desarrollar la tesis y continuar mi formación científica

....a la **Universidad de Buenos Aires** por la formación que me brindó y a **CONICET** y **ANPCyT** por su apoyo económico ya sea mediante la beca que me permitió terminar mi doctorado o mediante los subsidios otorgados

....a **Marcelo** por acompañarme en este último tramo con su excelente humor

....y finalmente, a mis **Padres por su apoyo incondicional, hermanos, Hernán y sobrinos...mis dos solcitos.**

***DEDICADO A MIS PADRES,  
MI HERMANA SILVANA  
Y  
MI HERMANO GUILLERMO***

*"There are more things in heaven and  
earth Horatio, than are dreamt of in your  
philosophy"*

*W. Shakespeare, Hamlet, Act I, sc.5*

Los resultados presentados en esta Tesis de Doctorado fueron parte de los siguientes trabajos científicos publicados en revistas internacionales:

**The Steroidogenic Acute Regulatory Protein in ovarian follicles of Gonadotropin-stimulated rats is regulated by a Gonadotropin-releasing hormone agonist.**

**G. Irusta**, F. Parborell, M. Peluffo, M. Pulak, S.I.Gonzalez-Calvar, R. Calandra, D. Stocco and M. Tesone. **Biology of Reproduction** 68 (5) 1577-83, 2003

**Inhibition of Cytochrome P<sub>450</sub>C17 (CYP 17) enzyme by a Gonadotropin-releasing hormone (GnRH-I) agonist in ovarian follicles from gonadotropin-stimulated rats.**

**Griselda Irusta**, Fernanda Parborell, and Marta Tesone

**American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism** 2007 May 292 (5):E1456-64.

**Regulation of ovarian angiogenesis and apoptosis by GnRH-I analogs**

Parborell Fernanda, **Irusta Griselda**, Rodríguez Celín Alejandra and Tesone Marta

**Molecular Reproduction and Development.** 2007 Sep 14.

## Abreviaturas

<b>µg</b>	.....	<b>picogramo</b>
<b>17 red</b>	.....	<b>Enzima 17 reductasa</b>
<b>17β-HSD</b>	.....	<b>17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa</b>
<b>20α-HSD</b>	.....	<b>20α-hidroxiesteroide deshidrogenasa</b>
<b>3β-HSD</b>	.....	<b>3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa/delta4- delta5 isomerasa</b>
<b>5α-reductasa</b>	.....	<b>Enzima 5α-reductasa</b>
<b>5β-reductasa</b>	.....	<b>Enzima 5β-reductasa</b>
<b>ACTH</b>	.....	<b>Adenocorticotrofina</b>
<b>ADNc</b>	.....	<b>Acido desoxirribonucleico copia</b>
<b>AMPc</b>	.....	<b>Adenosín monofosfato cíclico</b>
<b>ANGPTs</b>	.....	<b>Angiopietinas</b>
<b>ANT</b>	.....	<b>Antide</b>
<b>ARN mensajero</b>	.....	<b>Acido ribonucleico mensajero</b>
<b>CL</b>	.....	<b>Cuerpo Luteo</b>
<b>CYP11A o P450 scc</b>	.....	<b>Citocromo del clivaje de la cadena lateral del colesterol</b>
<b>CYP17</b>	.....	<b>17α hidroxilasa /C-17,20 liasa</b>
<b>CYP17 o P450C17</b>	.....	<b>Citocromo P450 17α-hidroxilasa/17,20 liasa</b>
<b>CYP19</b>	.....	<b>Enzima aromatasa</b>
<b>DAG</b>	.....	<b>Diacilglicerol</b>
<b>eCG</b>	.....	<b>Gonadotrofina Coriónica equina</b>
<b>EGF</b>	.....	<b>Factor de Crecimiento Epidermal</b>
<b>EG-VEGF</b>	.....	<b>Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular derivado de Glándula Endócrina</b>
<b>FGF</b>	.....	<b>Factor de Crecimiento de Fibroblastos</b>
<b>Flk-1/ KDR/VEGFR-II</b>	.....	<b>Receptor de VEGF tipo II</b>
<b>Flt-1/ VEGFR-1</b>	.....	<b>Receptor de VEGF tipo I</b>
<b>Flt-4/ VEGFR-3</b>	.....	<b>Receptor de VEGF tipo III</b>
<b>FSH</b>	.....	<b>Hormona Folículo estimulante</b>

<b>GDF9</b>	.....	<b>Factor Diferenciador del Crecimiento-9</b>
<b>GnRH</b>	.....	<b>Hormona Liberadora de Gonadotrofinas</b>
<b>GnRHR</b>	.....	<b>Receptor de GnRH</b>
<b>hCG</b>	.....	<b>Gonadotrofina Coriónica humana</b>
<b>hMG</b>	.....	<b>Gonadotropina humana de Mujeres post-Menopáusicas</b>
<b>IGF-1</b>	.....	<b>Factor de Crecimiento similar a la Insulina-I</b>
<b>InsP, InsP<sub>2</sub>, InsP<sub>3</sub></b>	.....	<b>Mono, bis y tris-fosfatos</b>
<b>LA</b>	.....	<b>Acetato de Leuprolide</b>
<b>LH</b>	.....	<b>Hormona Luteinizante</b>
<b>ml</b>	.....	<b>mililitro</b>
<b>NADPH</b>	.....	<b>Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Hidrógeno</b>
<b>ng</b>	.....	<b>nanogramo</b>
<b>PA</b>	.....	<b>Activador de plasminógeno</b>
<b>PARP</b>	.....	<b>Poli ADP ribosa Polimerasa</b>
<b>PCR</b>	.....	<b>Reacción en cadena de la Polimerasa</b>
<b>PDGF</b>	.....	<b>Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas</b>
<b>PGE2</b>	.....	<b>Prostaglandina E2</b>
<b>PGF2<math>\alpha</math></b>	.....	<b>Prostaglandina F2 alfa</b>
<b>PIGF</b>	.....	<b>Factor de crecimiento placentario</b>
<b>PLA<sub>2</sub></b>	.....	<b>Proteína Fosfolipasa A<sub>2</sub></b>
<b>PLC</b>	.....	<b>Proteína Fosfolipasa C</b>
<b>PLD</b>	.....	<b>Proteína Fosfolipasa D</b>
<b>PMSG</b>	.....	<b>Gonadotrofina de yegua preñada</b>
<b>Proteína G<math>\alpha</math>q/11</b>	.....	<b>Proteína G alfa q/11</b>
<b>ProteínaG<math>\alpha</math>i</b>	.....	<b>Proteína G alfa inhibitoria</b>
<b>RIA</b>	.....	<b>Radioinmunoensayo</b>

<b>StAR</b>	..... <b>Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda</b>
<b>TGF-β</b>	..... <b>Factor de Crecimiento Transformante βeta</b>
<b>Tie-1</b>	..... <b>Receptor tirosin quinasa-1</b>
<b>Tie-2</b>	..... <b>Receptor tirosin quinasa-2</b>
<b>VEGF</b>	..... <b>Factor de crecimiento vascular endotelial</b>

## ***INTRODUCCION***

### ***EL OVARIO .....16***

#### **FOLICULOGENESIS .....17**

**Selección del folículo dominante.....23**

**Ovulación .....23**

**Luteinización..... 24**

**Ciclo ovárico de la rata..... 25**

**Cronología de la foliculogénesis en la rata .....27**

**Cronología de la foliculogénesis en humanos ..... 27**

**Factores involucrados en el reclutamiento inicial y cíclico de la foliculogénesis 28**

**Regulación intraovárica del desarrollo folicular ..... 30**

**Regulación endocrina del desarrollo folicular ..... 31**

#### **APOPTOSIS ..... 33**

**Caspasa-3 y función de PARP en la atresia folicular ..... 37**

**Atresia folicular ..... 38**

#### **ESTEROIDOGENESIS ..... 40**

**Metabolismo de esteroides ováricos ..... 44**

**Proteína Reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR) ..... 46**

**StAR en el ovario ..... 48**

**CYP11A1 ..... 49**

**CYP11A1 en el ovario .....49**

**CYP17 .....50**

**CYP17 en el ovario ..... 52**

**Hipótesis dos células-dos gonadotrofinas ..... 54**

#### **ESTEROIDES Y SU ACCION EN EL DESARROLLO FOLICULAR..... 55**

**Progesterona ..... 55**

**Andrógenos ..... 56**

**Estrógenos .....57**

#### **ANGIOGENESIS EN EL OVARIO ..... 58**

**VEGF ..... 59**

**VEGF en la foliculogénesis .....60**

**Regulación de VEGF ..... 61**

**Receptores de VEGF ..... 62**

ANGIOPOIETINAS .....	63
Angiopietinas en la foliculogénesis .....	64
Receptores de angiopietinas .....	65

<b>HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROFINAS (GnRH) .....</b>	<b>67</b>
Regulación neuroendócrina del ovario ejercida por GnRH .....	67
GnRH en el ovario .....	68
Señalización del receptor de GnRH en el ovario .....	69
Regulación de GnRH y sus receptores en el ovario .....	70
Evidencias de los efectos de GnRH en ovario .....	71
La historia de GnRH en nuestro laboratorio .....	72

## ***HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***

HIPOTESIS .....	78
OBJETIVO GENERAL DEL TRABAJO .....	79
Objetivos específicos .....	79

## ***MATERIALES Y METODOS***

Animales .....	82
Tratamientos .....	82
Obtención de ratas superovuladas .....	82
Administración de los análogos de GnRH-I, acetato de leuprolide (LA) y antide (ANT) .....	82
Extracción de esteroides de suero .....	83
Aislamiento de folículos antrales o preovulatorios .....	84
Cultivo de folículos .....	84
Extracción de esteroides foliculares para la realización de RIA .....	84
Radioinmunoensayo (RIA) .....	85
Extracción de ARN para la realización de RT-PCR .....	85
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	86
Amplificación en tiempo real (Real time PCR) .....	87
Extracción de proteínas foliculares y realización de Western Blot .....	88
Técnica de Inmunohistoquímica .....	89
Determinación de la actividad de caspasa-3 .....	90
Extracción de proteínas foliculares y realización de Western Blot .....	90
Análisis de datos .....	90

## **RESULTADOS**

### *1.1 Efecto in vivo del agonista de GnRH-I (LA) sobre los niveles de esteroides en la foliculogénesis de rata*

- a. Medición de los niveles de esteroides ováricos en suero y en tejido folicular .....93**
- b. Medición de los niveles séricos de Progesterona en función del tiempo de administración de LA .....95**

### *1.2 Efecto de LA en la expresión génica, localización y contenido folicular de la proteína esteroideogénica StAR y en el contenido folicular de la enzima CYP11A1.*

- a. Efecto de LA en la expresión génica de StAR (Proteína Reguladora de la Esteroidogénesis Aguda) en folículos de ovario de ratas hiperestimuladas .....97**
- b. Determinación del contenido de la proteína StAR en folículos ováricos de ratas tratadas con LA .....100**
- c. Inmunolocalización de la proteína StAR en ovarios de ratas Control y LA .....102**
- d. Determinación del contenido del citocromo CYP11A1 (Citocromo de la ruptura de la cadena lateral del colesterol) en folículos ováricos de ratas Control y LA .....104**

### *2.1 Efecto in vivo de LA sobre los niveles de Androsterona y la enzima CYP17*

*(Citocromo P450 17 $\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa)*

- a. Medición de los niveles séricos de Androsterona en función del tiempo luego de la administración LA .....106**
- b. Medición de la expresión de ARN mensajero de la enzima CYP17 en folículos ováricos de ratas Control y LA .....108**
- c. Determinación del contenido del citocromo CYP17 en folículos ováricos de ratas Control y LA .....111**

### *2.2 Efecto in vitro de LA en folículos ováricos de ratas prepúberes superovuladas*

- a. Determinación del contenido de Androsterona de folículos en cultivo en presencia de FSH y FSH+LA .....113**
- b. Determinación del contenido folicular de la proteína StAR, de la enzima CYP11A1 y CYP17 en cultivo de folículos en presencia de FSH y FSH+LA ..... 115**

*3.1 Efecto de LA sobre la expresión de factores angiogénicos y sus receptores en folículos ováricos de ratas prepúberes superovuladas*

**a. Medición del contenido folicular de los factores angiogénicos VEGF y ANGPT-1 en folículos de ratas superovuladas tratadas con análogos de GnRH-I.....119**

**b. Determinación del contenido de los receptores de factores angiogénicos Flk-1/KDR y Tie-2 en folículos de ratas superovuladas tratadas con análogos de GnRH-I .....123**

*4.1 Efecto de análogos de GnRH-I sobre la apoptosis en folículos ováricos de ratas prepúberes superovuladas*

**a. Determinación del contenido proteico y actividad enzimática de la enzima caspasa-3 en folículos de ratas superovuladas tratadas con análogos de GnRH-I .....126**

**b. Clivaje de un sustrato de caspasa-3, Polimerasa Poli-ADP ribosa (PARP), en folículos de ratas superovuladas tratadas con análogos de GnRH-I ..... 127**

**c. Localización folicular de la caspasa-3 en ovario de ratas superovuladas tratadas con análogos de GnRH-I .....131**

***DISCUSION* .....135**

***CONCLUSION*....150**

***CONCLUSIONES GENERALES* .....151**

***BIBLIOGRAFIA* .....154**

# ***INTRODUCCION***

---

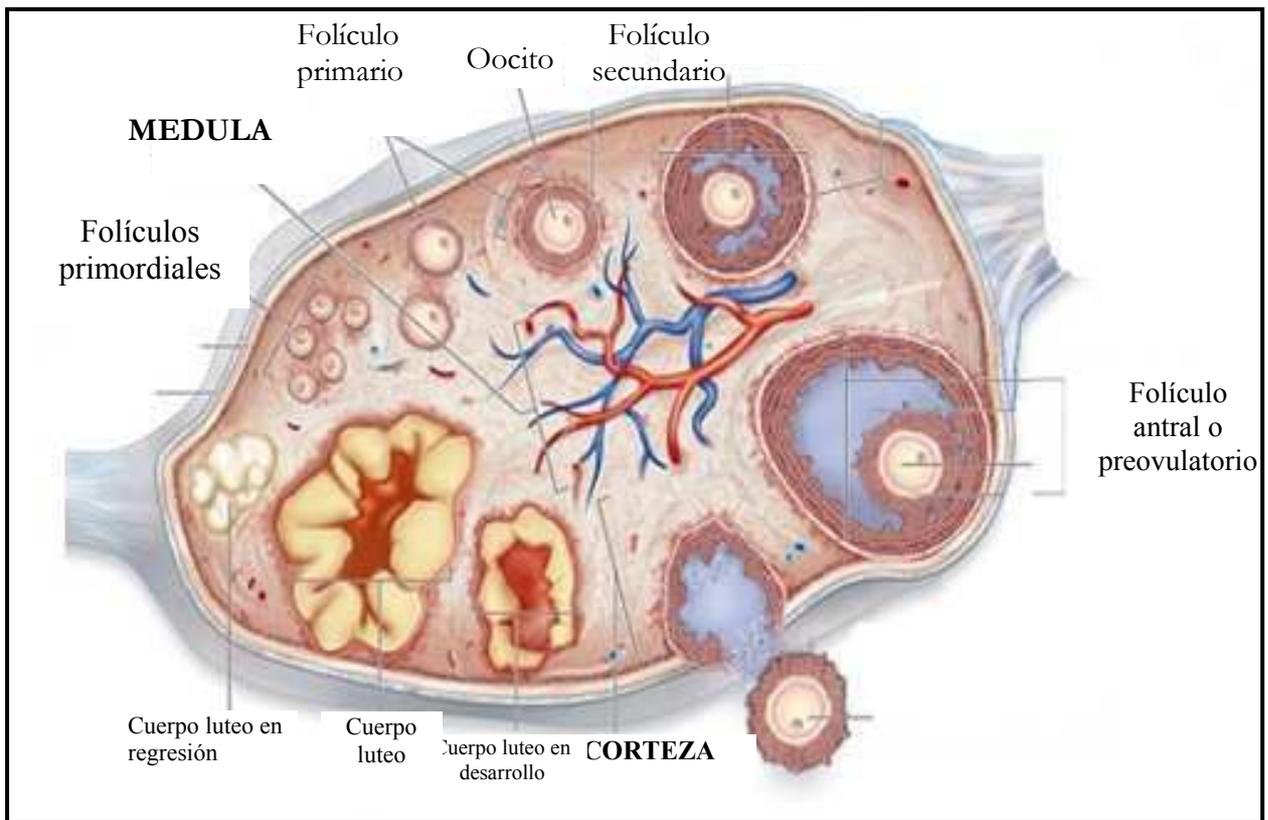
---

## ***EL OVARIO***

El ovario está constituido por un tejido en constante transformación. Posee una estructura multicompartimental caracterizada por propiedades biológicas diferentes y dinámicas. En los mamíferos, el ovario es el sitio de almacenamiento y desarrollo de los oocitos formados durante la vida embrionaria/fetal o alrededor del momento del nacimiento. La principal función de la gónada femenina es la maduración del oocito para la fertilización y exitosa propagación de la especie [1]. Para esto genera un ambiente propicio para la instalación del cigoto, ligado a cambios inducidos por la transformación del folículo ovulatorio en el cuerpo lúteo [2;3]. Además, el ovario constituye el principal portador de las células secretoras de hormonas femeninas que desarrollan y mantienen los caracteres sexuales secundarios de la hembra, así como también las características adecuadas durante la preñez.

Durante la adultez la superficie del ovario es nodular y se encuentra cubierta por una capa monoestratificada de células cúbicas ó poliédricas, llamada epitelio germinal [4]. Esta cubierta epitelial está frecuentemente invaginada hacia el tejido conectivo subyacente llamado túnica albugínea, formando pequeños pliegues, hoyos ó criptas. Por debajo se encuentran dos zonas: la llamada zona cortical y la zona medular, y el límite entre ambas no se encuentra bien definido. La primera comprende al estroma ovárico (formado por tejido conectivo laxo, fibroblastos y precursores de células tecales), y folículos en distintos estadios de maduración, atrésicos y cuerpos lúteos. La zona medular que se encuentra muy vascularizada e inervada, contiene células de tipo muscular y tejido conectivo laxo [5] (*Figura 1*).

***El ovario de mamíferos es, por lo tanto, un órgano heterogéneo en cuanto a la población celular presente en un momento dado, y también lo es en el tiempo, a lo largo de la vida del individuo.*** A partir de la pubertad, se producen variaciones hormonales cíclicas que afectarán tanto al ovario como al cuerpo lúteo y útero, preparándolos para la expulsión del ovocito y la potencial implantación del blastocisto.



**Figura 1:** Estructura del ovario y desarrollo folicular. Adaptado de McGraw Hill Companies

## FOLICULOGENESIS

El proceso de *foliculogénesis* comprende el crecimiento del folículo y su pasaje a través de los distintos estadios de desarrollo, desde el momento en que emerge del pool de folículos formado durante la oogénesis, hasta el momento en el cual es ovulado o entra en atresia (regresión o muerte del folículo). Este proceso es llevado a cabo en la corteza del ovario (*Figura 1 y 2*).

Debido al continuo crecimiento y a la regresión de los folículos, la relación volumen/contenido del ovario, se encuentra en constante cambio [2]. Los ovarios de los mamíferos contienen a los folículos como unidades funcionales. Hasta ahora se creía que el número total de folículos ováricos era determinado en forma temprana en la vida del individuo, y la depleción de este pool, llevaba a la senescencia de la vida reproductiva [1]. Actualmente esta doctrina, que sostenía que los mamíferos perdían su capacidad de generar células germinales durante su vida adulta, se encuentra en amplio

debate [6;7] mostraron la existencia de células germinales mitóticamente activas en ovarios de ratones juveniles y adultos, sugiriendo la presencia de estas células capaces de proliferar en el ovario del mamífero postnatal. Sin embargo, estos estudios aún no han sido confirmados y existen trabajos que plantean controversias respecto a esta nueva posibilidad [8-11].

Para cada especie se encuentran diferencias en el número de folículos formados durante la ovogénesis. Al nacimiento, el ovario contiene alrededor de 20.000, 160.000, y 1.000.000 folículos en ratas, ovejas y humanos respectivamente [2]. En la mayoría de los mamíferos antes ó luego del nacimiento, la oogonia es transformada en **oocitos primarios**. Esta transición de oogonia a oocito está determinada por el cese del proceso de mitosis que sufren las células primordiales germinales y la entrada en la fase meiótica: profase, en la cual los oocitos quedan arrestados. Luego de este proceso, los oocitos se rodean de una capa única de células foliculares aplanadas, llamadas *pregranulosa*. En esta fase, la superficie del oocito y de las células foliculares envoltentes son lisas y están en estrecho contacto. Estas células se encuentran envueltas en la llamada *lámina basal* que separa a este tipo celular de todo elemento que la rodea, entre ellos vasos sanguíneos, capilares y nervios [12]. Estos **folículos primordiales**, (Figura 2) se encuentran principalmente en la periferia de la corteza, inmediatamente por debajo de la túnica albugínea y constituyen la reserva de folículos en reposo, los cuales serán progresivamente eliminados durante la vida reproductiva. Aparecen en el humano aproximadamente en la semana 16 de embarazo y su formación terminaría aproximadamente en la semana sexta luego el nacimiento [13]. Para que estos folículos primordiales inicien su crecimiento, es necesaria una compleja interacción entre factores estimulatorios e inhibitorios.

Estos folículos continuamente abandonan el reservorio para convertirse en **folículos primarios** (Figura 2). Esta transición implica ciertas modificaciones citológicas en el oocito, en las células foliculares y en el tejido conjuntivo adyacente. A medida que el oocito aumenta de tamaño, la capa única de células aplanadas se convierte inicialmente en una capa de células cúbicas y cilíndricas, y mediante mitosis origina las *células granulosa*s que formarán posteriormente un epitelio estratificado. Entre el oocito y las células granulosa circundantes, se originan espacios donde se deposita una sustancia que representa el inicio de la *zona pelúcida*, mucopolisacáridos

secretados por las células de la granulosa, que más tarde originarán un halo translúcido que rodea al ovocito. La zona pelúcida está formada por tres glicoproteínas y su adquisición es una característica del folículo preantral primario. Se sabe que ratones knock out de proteínas que componen la zona pelúcida son infértiles o subfértiles [14].

A medida que los folículos aumentan de tamaño, van desplazándose gradualmente hacia el interior de la corteza. A través de sucesivas divisiones mitóticas de las células granulosas, el folículo primario unilaminar pasa a un estadio preantral, multilaminado (con dos o más capas de células de la granulosa rodeando al oocito), denominado *folículo secundario o folículo preantral* (Figura 2). Estos folículos poseen una o dos arteriolas que termina en una red vascular fuera de la lámina basal, y por lo tanto, el folículo entra en contacto directo con factores que se encuentran en la circulación [15]. En este estadio las células de la granulosa conforman una población homogénea y adquieren receptores de alta afinidad para la hormona folículo estimulante (FSH) y hormonas esteroideas [16]. Recientemente se ha reportado la importancia de un factor derivado del oocito llamado GDF-9 (Factor Diferenciador del Crecimiento-9), el cual, junto con la hormona FSH regularían el desarrollo folicular y la atresia durante la transición del estadio preantral a antral temprano [17]. Por lo tanto la presencia del receptor de FSH en este estadio folicular, sería necesario para su posterior desarrollo. Simultáneamente con la proliferación de estas células, se desarrolla alrededor del folículo otra capa de células originadas del estroma que forma la *teca folicular*. La aparición del estrato tecal se asocia con la adquisición de la vascularización del folículo. A medida que se forman los capilares, las células teca-intersticiales parecen comenzar la diferenciación con la adquisición de los receptores de LH (Hormona Luteinizante) y la capacidad de biosíntesis de esteroides. La capa tecal se diferencia en una interna y otra externa, la cual está compuesta principalmente por tejido conectivo. Numerosos vasos pequeños penetran en la teca externa para proporcionar un rico plexo capilar a la teca interna y dado que los capilares no penetran la membrana basal, la capa de células de granulosa permanece avascular durante todo el crecimiento del folículo. Como consecuencia de este aumento de la vascularidad, el folículo aumenta su exposición a factores que circulan por la sangre [18].

Actualmente se conoce que el factor VEGF (Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular) es un importante mitogéno de las células del endotelio vascular y sería uno de los principales factores involucrados en la angiogénesis del folículo [19], y

su expresión aumenta conforme el folículo ovárico avanza en su desarrollo [20]. Es interesante destacar que el establecimiento de la red de capilares coincide con un periodo de crecimiento y diferenciación del folículo [21]. Al aumentar el folículo de tamaño, se termina de formar la zona pelúcida. Las células de la granulosa mantienen contacto con el oocito a través de proyecciones citoplasmáticas que penetran en la zona pelúcida y establecen contacto con la membrana celular del oocito. Al final de esta fase denominada *preantral*, el oocito detiene su crecimiento y se vuelve competente para reasumir la meiosis. Cuando el folículo alcanza un diámetro aproximado de 0.2 mm y posee de seis a doce capas de células (en humanos), aparecen unos espacios irregulares, llenos de un líquido claro entre las células de la granulosa. Este líquido aumenta en cantidad a medida que crece el folículo y los espacios irregulares que se forman entre las células de la granulosa confluyen para constituir una sola cavidad denominada *antro*.

Con la aparición de la *cavidad antral*, el folículo se convierte en *folículo terciario o folículo antral* (Figura 2), y esta fase se denomina *fase antral*. Se forma, entonces, una cavidad central: *el antro folicular*, rodeado de *células de la granulosa murales*, localizadas en la periferia. El folículo antral está tapizado por un epitelio estratificado de células granulosas que presentan un engrosamiento localizado en uno de sus lados llamado, *células del cumulus*, que mantienen una estrecha relación con el oocito mediante uniones estrechas (*gap*) (Figura 2). La relación con estas células se vuelve más laxa debido a la gradual aparición del líquido que llena los espacios intercelulares. Al desprenderse el oocito, una ó más capas de las células del cumulus, permanecen unidas a él, formando la *corona radiata*, envoltura celular laxa que persiste alrededor del oocito aún después de la ovulación.

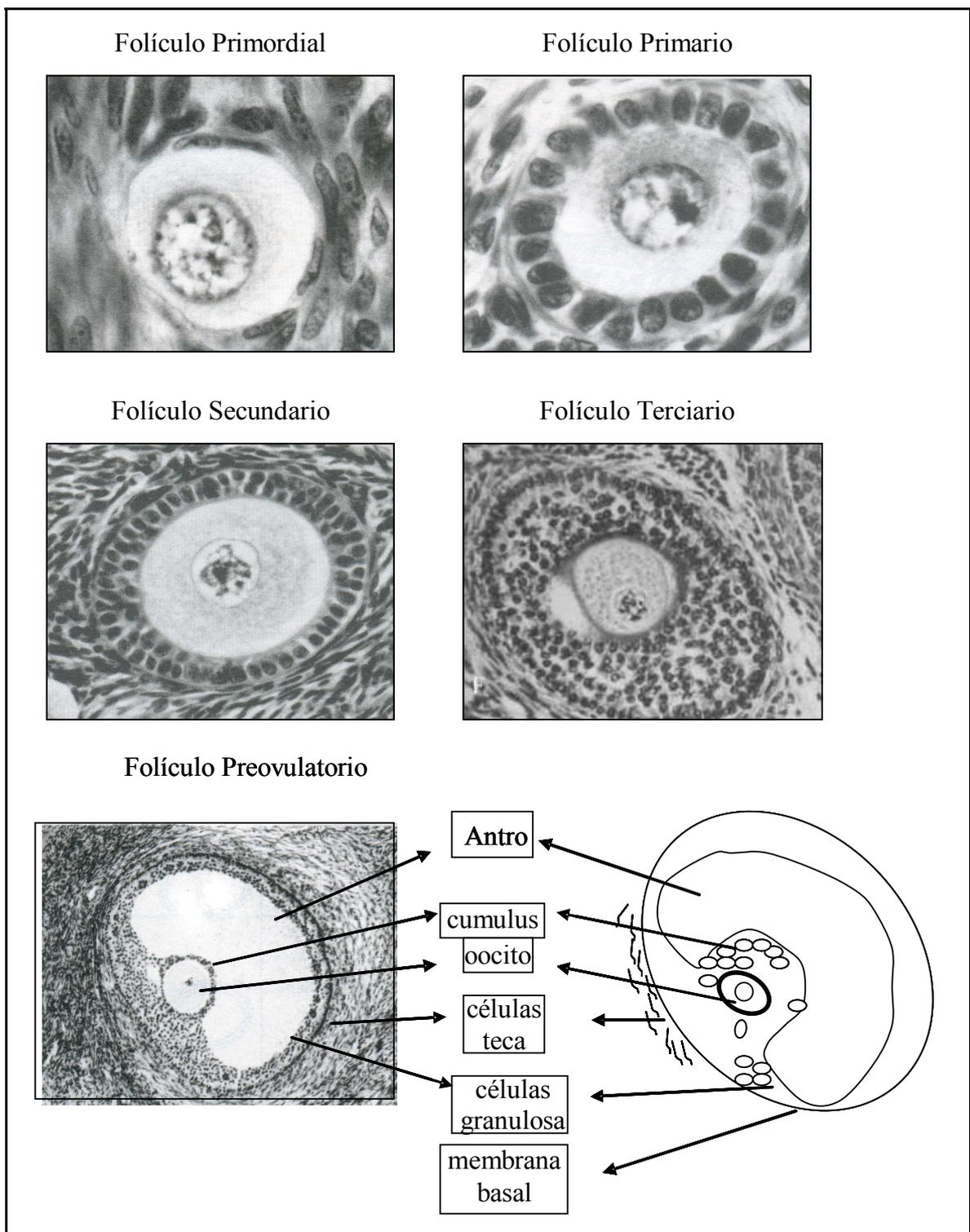
La aparición de los receptores de LH en las células de la granulosa ocurre durante la transición del folículo antral hacia el folículo preovulatorio, debido a la estimulación de FSH [22]. Este paso es fundamental para que el folículo progrese hacia el paso final, *la ovulación*.

Los *folículos preovulatorios* (Figura 2) son aquellos que han alcanzado los estadios finales de crecimiento y maduración del folículo antral y han adquirido la habilidad para ovular ante los adecuados niveles de gonadotropina LH ó la administración de hCG. Es interesante destacar que la expresión de los receptores a LH no se encuentran expresados de forma homogénea en estos folículos, sino que los mismos presentan un gradiente de expresión que disminuye desde las capas externas de

la granulosa hacia la células del cumulus [22;23]. El caso más extremo es el de las células del cumulus de ratón, donde los receptores a LH son indetectables [24]. Por esta razón, el reinicio de la meiosis inducida por LH y la expansión de las células del cumulus requeridas para la ovulación, serían eventos mediados por las células de la granulosa murales [25;26].

Además, estos folículos se caracterizan por una baja tasa mitótica de las células foliculares y una alta relación estrógenos/andrógenos y estrógenos/progesterona en el fluido folicular (contrario a lo que se observa en los folículos atrésicos asociado a pérdida de capacidad de aromatización por parte de las células de la granulosa).

Desde el momento en que el folículo ha sido seleccionado para la ovulación, el mismo comienza a crecer notablemente en tamaño. Las células de la granulosa sufren transformaciones morfológicas como ser el aumento de su volumen [27]. A este folículo destinado a ovular, se lo denomina *folículo dominante* [28].



**Figura 2: Estadios del desarrollo folicular.** (Modificado de Thibault y col., 1993) [2].

### **Selección del folículo dominante**

Además de la importancia de los estrógenos en la maduración folicular y el proceso de ovulación, estos son los principales factores responsables de establecer la dominancia de un folículo que se encuentra en maduración, el cual será ovulado, respecto de los otros folículos que no alcanzarán el proceso de ovulación y serán eliminados por el mecanismo de atresia. Una de las razones por la cual los estrógenos son responsables de esta selección, es el hecho de ser moduladores de la secreción de gonadotrofinas a través el mecanismo de retroalimentación negativa. Hemos nombrado que la adquisición de la enzima aromatasa (CYP19) por la células de la granulosa, permiten que éstas conviertan los andrógenos tecales a estrógenos, entonces la adquisición temprana de un folículo de la capacidad para secretar estrógenos, sería un indicador de que este folículo comienza a entrar en la etapa de folículo preovulatorio [29].

Como hemos mencionado anteriormente, el proceso de foliculogénesis es un proceso asincrónico debido al continuo abandono de los folículos del estadio primorial para continuar su proceso de desarrollo. Por esta razón, dentro del ovario podemos encontrar una distribución de folículos antrales tempranos en distinto estado madurativo bajo la influencia de la FSH.

Luego de la regresión del cuerpo lúteo, la secreción de FSH comienza a aumentar y por lo tanto a estimular a la enzima aromatasa y esto causa un aumento de los estrógenos periféricos. Es así como estos esteroides inhiben la secreción de FSH privando a los otros folículos que se encuentran en desarrollo, del sostén gonadotrófico. El folículo preantral que se convertirá en folículo dominante, parece ser el que se encuentra en un estadio madurativo mas avanzado respecto de los otros folículos y/o aquel que tiene mayor acceso o sensibilidad a la FSH cuando esta comienza a aumentar al final el ciclo menstrual previo.

### **Ovulación**

A medida que se acerca la mitad del ciclo, hay un ascenso notable de estrógenos por sobre el umbral, estimulando, por un mecanismo de retroalimentación positiva, un pico de gonadotrofinas, principalmente de LH y en menor medida de FSH. Junto a circunstancias únicas del microambiente, el pico de LH es el gatillo para que el folículo dominante ovule y origine un cuerpo lúteo en cada ciclo menstrual en humanos (este no es único en el ciclo estral de roedores y otros mamíferos).

Luego del pico preovulatorio de LH, la síntesis de estradiol declina considerablemente, mientras que se produce un aumento notable en la producción de progesterona estimulada por la misma LH [3]. Las células de la granulosa cercanas a la lámina basal, comienzan a soltarse debido a la desaparición de las uniones estrechas (“gap”) que las mantenían unidas. El único sitio donde estas uniones no se ven alteradas, es en aquellas células que están formando parte de la corona radiata.

También en este proceso existe un componente mecánico dado por el rápido aumento del tamaño folicular, luego del cual el folículo ovárico emerge desde la corteza ovárica. Otro prerequisite para la ruptura folicular es la digestión proteolítica de la pared folicular, y se sabe que se activan colagenasas para la disolución de la membrana basal y el tejido tecal asociado a la ovulación. Las prostaglandinas de la serie E y F (PGE y PGF $2\alpha$ ) son algunos de los componentes involucrados en la degradación de la pared folicular [30].

Luego de la ovulación, el folículo ovárico se transforma en cuerpo lúteo y en este proceso se encuentran involucrados una gran cantidad de genes. En este proceso, el ovocito que estaba detenido en profase I, reanuda la meiosis y es ovulado en el estadio de metafase II.

### **Luteinización**

El cuerpo lúteo es un órgano endocrino transitorio formado por las células foliculares remanentes del folículo que ha sido ovulado. Su principal función es la de secretar progesterona, la cual tiene numerosas funciones, entre ellas, la preparación del útero para el período de preñez o embarazo y la regulación de las contracciones del oviducto para el transporte del óvulo al útero. Por lo tanto, la formación del cuerpo lúteo en mamífero, se considera un evento esencial para la supervivencia e implantación del embrión. Este proceso se inicia mediante numerosos cambios bioquímicos y morfológicos que sufren las células de la teca interna y las células de la granulosa de los folículos preovulatorios. Estos cambios que determinan el proceso de *luteinización*, se producen como consecuencia del incremento en los niveles séricos de LH (Hormona Luteinizante), asociado al pico preovulatorio de esta hormona.

No todas las células se diferencian sincrónicamente luego de la ovulación. Es decir que las células del cuerpo lúteo derivan de los dos tipos de células foliculares secretoras de esteroides, de la granulosa y tecales. Por lo tanto esta glándula consiste en, al menos, dos tipos celulares de *células luteales*: *las células granulosa- luteínicas* y *las*

*células teca- luteínicas* en Primates (llamadas grandes o pequeñas en roedores). Las primeras derivan de la granulosa y contienen todos los elementos de las células secretoras de esteroides como numerosas mitocondrias y abundante retículo endoplasmático liso. Por el contrario, las células teca-luteínicas o pequeñas provienen de la teca y tiene moderada cantidad de mitocondrias pero abundante retículo endoplasmático liso. Ambos tipos celulares constituyen el 50 % del cuerpo lúteo, ya que éste contiene además abundantes elementos del tejido conectivo.

El establecimiento de un cuerpo lúteo funcional, en los días siguientes a la ovulación, implica cambios morfológicos como los que ya hemos descripto, y además una rápida vascularización de las capas celulares que se originan de la granulosa y de la teca, fenómeno inducido probablemente por la ruptura de la membrana basal que separa a los dos tipos celulares. Estudios recientes, han demostrado que el factor VEGF cumple un rol importante en el desarrollo y mantenimiento de un cuerpo lúteo funcional [31].

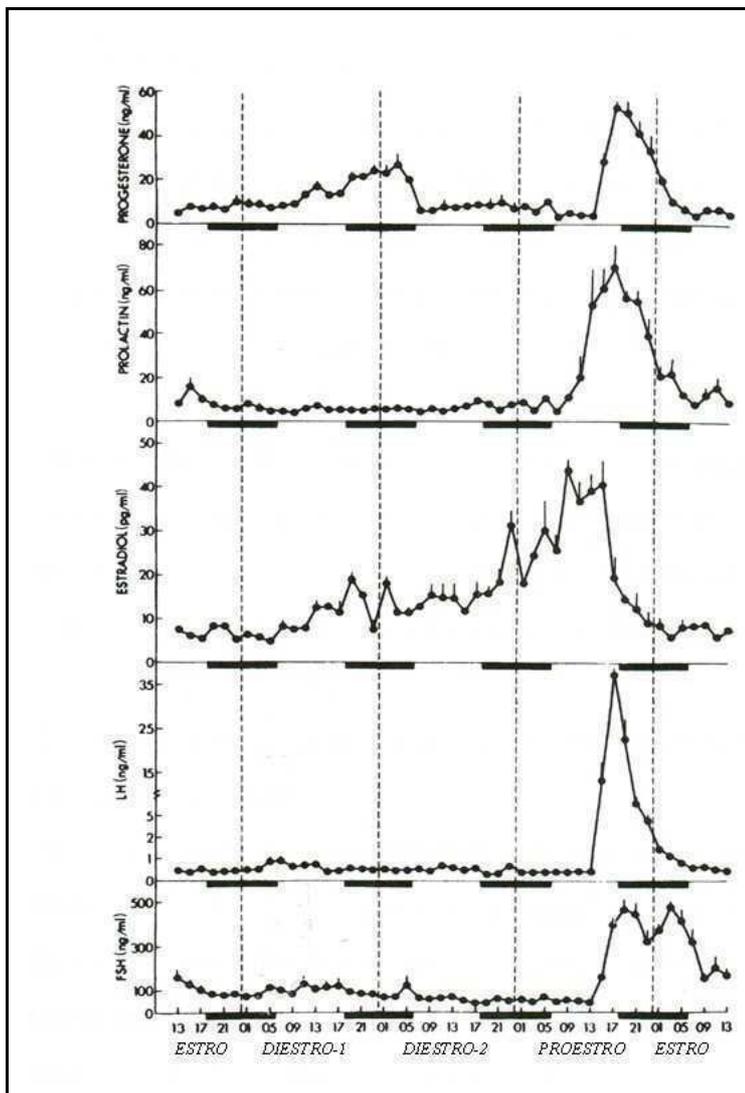
El control de la secreción de progesterona en roedores es llevado a cabo por las hormonas LH, prolactina (ambas luteotróficas) y la sustancia luteolítica, prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ). En la mujer, es la LH (y hCG durante el embarazo) las principales hormonas reguladoras del cuerpo lúteo. En ausencia de embarazo o preñez al final de cada ciclo ovárico, o cuando ya no es requerido para el mantenimiento de la placenta, el cuerpo lúteo deja de producir progesterona y regresiona en un proceso denominado **Luteólisis**. Se ha demostrado que la muerte celular programada o apoptosis está asociada a este proceso [32;33].

### **Ciclo ovárico de la rata**

El término **estro** fue utilizado por primera vez por Heape en el año 1900 para describir el período durante el cual la hembra está dispuesta a recibir al macho en coito fecundante. El período anterior al estro, lo denominó **proestro** y se caracteriza por el momento en el cual el animal entra en celo. En ausencia de concepción, el estro es seguido por el **metaestro**, también conocido como **diestro I**. El período siguiente, **diestro II**, varía en duración de acuerdo a las especies y es el tiempo durante el cual la secreción ovárica prepara a los tejidos reproductivos para la recepción del óvulo fertilizado luego del coito en el estro. En la rata dura uno o dos días determinando que el ciclo estral tenga una duración de 4 o 5 días. Si la fertilización no ocurre, el animal vuelve al período de proestro y un nuevo ciclo se inicia.

A nivel vaginal se pueden determinar los distintos estadios del ciclo por observación con microscopio según los tipos celulares presentes en el extendido. En el proestro predominan células escamosas mientras que en el diestro I y II los mayoritarios son los leucocitos.

La rata de laboratorio es un mamífero no estacional, de ovulación espontánea y poliéstrico. Es decir, el ciclo ovárico ocurre durante todo el año y la ovulación no depende del estímulo de la cópula. Por dichas características, sumadas a su fácil reproducción y mantenimiento en el bioterio, podemos afirmar que la rata de laboratorio representa un buen modelo para el estudio de la fisiología ovárica gonadal.



**Figura 3.** Niveles séricos de progesterona, prolactina, estradiol, LH y FSH, a lo largo de los cuatro días del ciclo estral en la rata. Las barras negras representan el período de oscuridad de (1800 a 0600) y los números en la abscisa indican la hora del día [34].

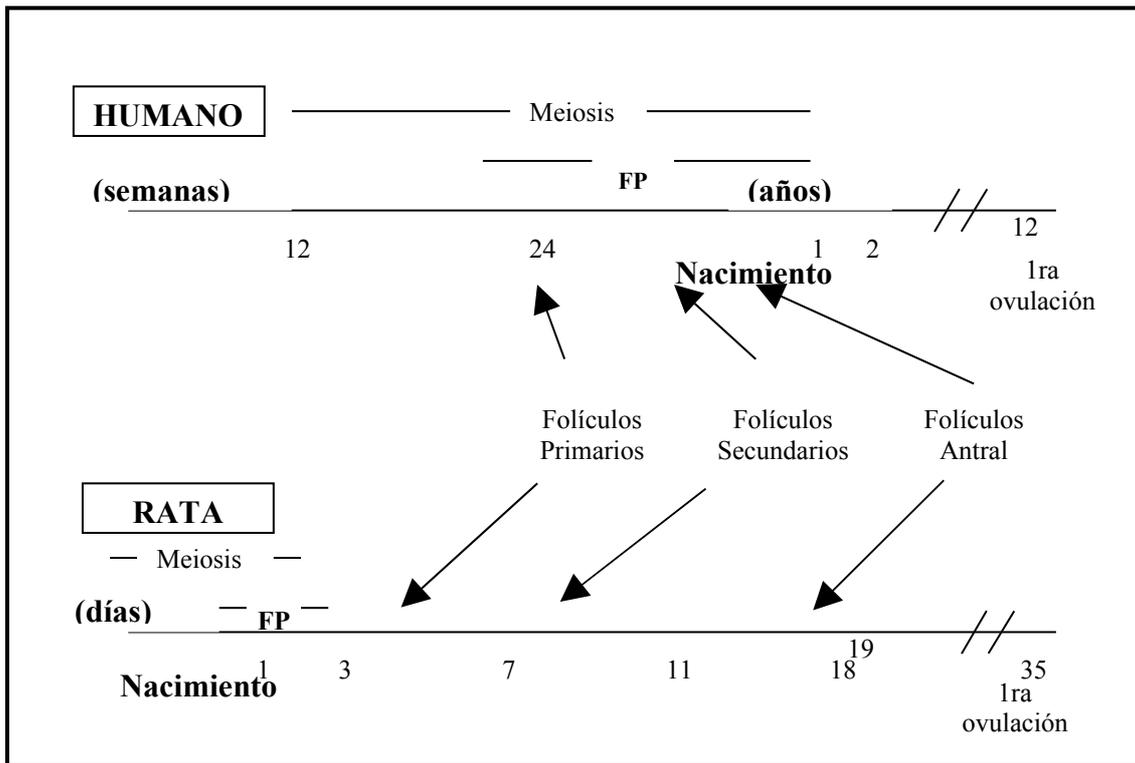
### **Cronología de la foliculogénesis en la rata**

Los folículos primordiales se forman al tercer día de edad postnatal y el primer grupo que llegará al estadio antral, lo hará a partir de la tercera semana de edad, y ya en el séptimo día a partir del nacimiento se pueden encontrar folículos secundarios bien desarrollados. La pubertad ó primer “estro”, (período en el cual la hembra está dispuesta a recibir al macho), ocurre alrededor del día 34 luego del nacimiento, y continúa regularmente hasta aproximadamente 10-12 meses de edad, momento en el cual los animales entran en ciclos irregulares. El tiempo que lleva el desarrollo de los folículos primordiales hasta folículos preovulatorios, es un período mayor a sesenta días ó 15 ciclos estrales. Dentro de este período se necesitan más de 30 días para que los folículos primordiales se desarrollen en folículos secundarios e igual período tarda el desarrollo de los folículos secundarios al estadio en el cual serán ovulados (*Figura 4*).

### **Cronología de la foliculogénesis en humanos**

El desarrollo folicular en humanos comienza con la transformación de las oogonias en oocitos primarios y con la entrada del mismo en los primeros estadios de la meiosis, alrededor de la semana 11-12 de gestación. En la semana 20 el número total de células germinales llega a su pico máximo (6 a 7 millones) pero la tasa de división comienza a declinar. Los folículos primordiales comienzan a formarse en la mitad de la gestación cuando son rodeados de una única capa de células de la pregranulosa, y así continúan hasta el nacimiento, cuando el número de oocitos es de 300.000-400.000 aproximadamente. Un período mayor de 120 días es necesario para la formación de los folículos secundarios, y se estima que mayor tiempo se requiere para que lleguen al estadio previo de primarios. Aproximadamente 85 días es el tiempo que debe transcurrir para el desarrollo de los folículos secundarios en preovulatorios, y en solo 14 días alcanzarán, los folículos antrales, el estadio de folículos de Graff (preovulatorios). Por lo tanto, el período completo que abarca el crecimiento folicular es mayor a los 220 días ó lo que es equivalente, ocho ciclos menstruales.

Se puede observar que si bien los eventos que se suceden durante el desarrollo del ovario en ratas son similares a los que ocurren en humanos, el tiempo en roedores se encuentra mucho más comprimido [1] (*Figura 4*).



**Figura 4.** Desarrollo folicular durante la vida fetal y neonatal en roedores y humanos. FP: folículos primordiales (Modificado de Hsueh AJ et al., 2000) [1].

#### **Factores involucrados en el reclutamiento inicial y cíclico de la foliculogénesis**

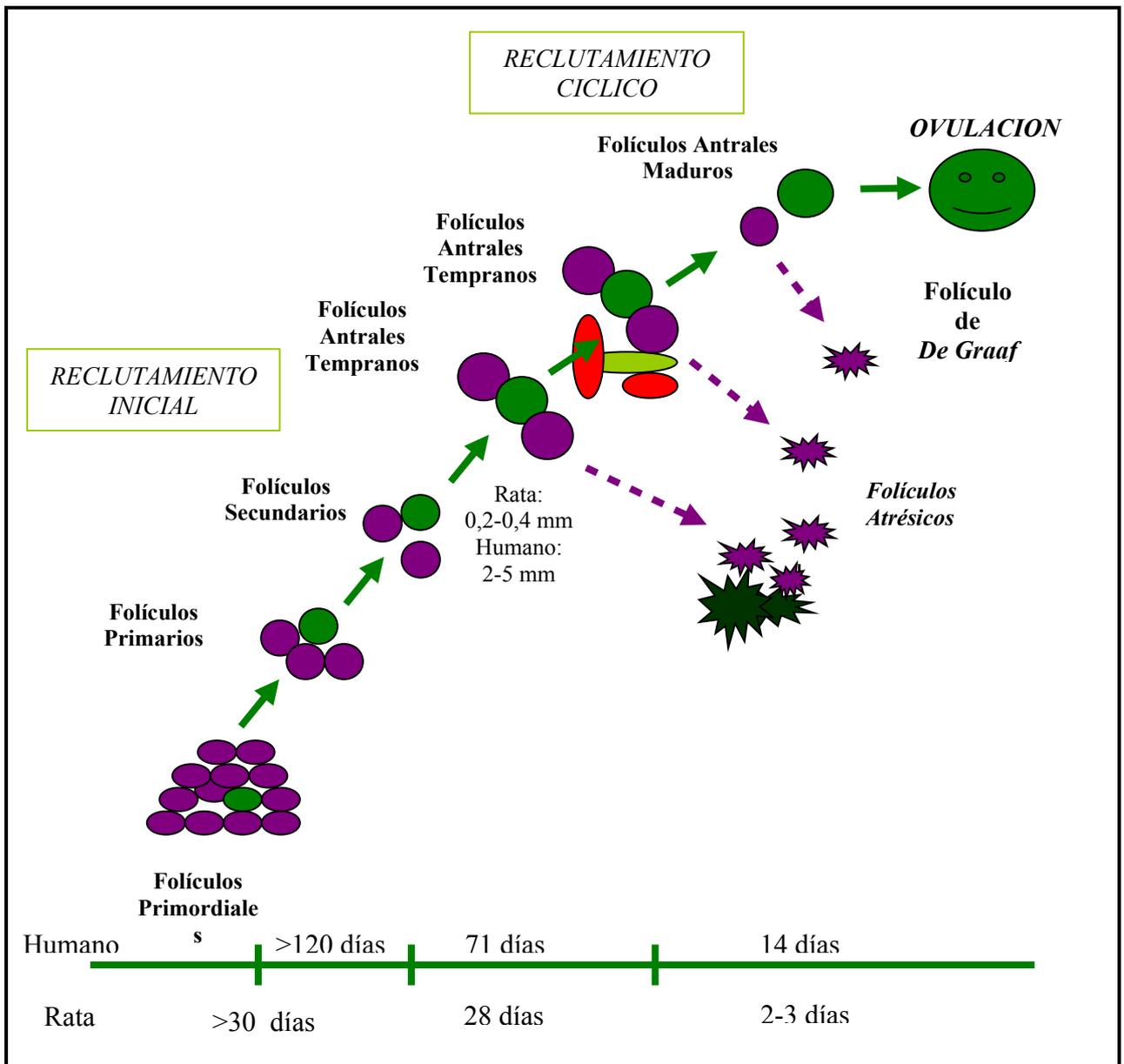
Uno de los puntos más difíciles de dilucidar en la fisiología del ovario son los factores que determinan que los folículos permanezcan senescentes, que entren en desarrollo y en proceso de atresia (muerte folicular), mientras un tercer grupo madura y es ovulado.

Existen dos eventos importantes durante la foliculogénesis: **reclutamiento inicial y reclutamiento cíclico** (Figura 5).

El **reclutamiento inicial** se da de una forma continua comenzando en el preciso momento en que se han formado los folículos, mucho antes de la pubertad y es el responsable de que los folículos primordiales abandonen su estado de reposo y comiencen una etapa de crecimiento. Durante este proceso, factores intraováricos u otros factores desconocidos estimulan a un grupo de folículos primordiales a iniciar el crecimiento, mientras el resto permanece senescente durante meses ó años. Este proceso

podría deberse a la liberación de estímulos inhibitorios que hasta ese momento mantenían los folículos en reposo [1].

En contraste, el *reclutamiento cíclico* comienza después de llegada la pubertad como resultado de un aumento en los niveles de Hormona Folículo Estimulante (FSH) circulante, que durante los ciclos reproductivos se secretará en forma pulsátil. Esto permite que una cohorte de folículos en fase antral sea rescatada del proceso de atresia. En este momento los folículos han completado su crecimiento, adquirido la zona pelúcida y se encuentran competentes para reasumir la meiosis. De este modo solo un número de folículos sobrevivirá, mientras que el resto entrará en atresia.



**Figura 5.** Esquema representativo de los procesos que sufren los folículos ováricos a lo largo de la vida reproductiva (Modificado de Hsueh AJ y col., 2000)[1].

## **Regulación intraovárica del desarrollo folicular**

Los mecanismos que controlan el inicio del crecimiento de los folículos han sido difíciles de investigar debido a que es un proceso prolongado caracterizado por un crecimiento lento de un número determinado de folículos. Se postula que las gonadotrofinas, especialmente la FSH, serían las responsables del desarrollo temprano del folículo [35]. Sin embargo los efectos ejercidos por las gonadotrofinas en el estadio primordial no se darían de forma directa ya que estos folículos no poseen receptores funcionales para estas hormonas y además, se ha observado que el inicio del crecimiento folicular puede darse *in vitro* en ausencia de FSH [36]. Aunque estos receptores no se desarrollan hasta la etapa secundaria, las células de la pregranulosa y los folículos primordiales responden a activadores del camino de AMPc, por lo cual activadores endógenos de estas vías jugarían un importante papel en la diferenciación de los folículos luego del reclutamiento inicial [37]. Se considera que los factores involucrados en la comunicación entre el oocito y las células de la granulosa poseerían un papel pasivo en el reclutamiento inicial. Mutaciones en factores que son expresados por las células de la granulosa de folículos en crecimiento, como Ligando kit (KITL), han producido dificultades en el desarrollo folicular a estadios posteriores al primario, como también se ha observado este efecto neutralizando con anticuerpos anti receptor de c-kit localizado en oocitos [38]. Este factor parece ser importante en la relación folículo-oocito [39].

Otro factor involucrado es el Factor de Crecimiento y Diferenciación-9 (GDF-9) perteneciente a la familia de los Factores de Crecimiento Transformantes- $\beta$  (TGF- $\beta$ )/Activina, que es producido por los oocitos en crecimiento en ratón, rata y humano. Ratones que portan mutaciones para este gen, no poseen folículos en estadios posteriores al estadio primario [40]. También se ha demostrado que existe interacción entre estos factores, KITL y GDF-9 y que estas interacciones serían dependientes del estadio folicular y reguladas por FSH [39].

Por lo tanto se considera que existen múltiples factores que actúan en forma parácrina entre el ovocito y las células somáticas durante el desarrollo temprano del folículo. En relación al desarrollo y diferenciación de los folículos preantrales, además de la comunicación oocito-granulosa, la interacción entre granulosa y teca, también cumple un papel esencial mediado en forma parácrina por factores de crecimiento.

Otro factor que regularía la foliculogénesis, sería el Factor de crecimiento de fibroblasto -7 (FGF-7 o KGF), secretado por las células mesenquimales precursoras de

las células de la teca, que estimula el crecimiento de los folículos preantrales de rata en cultivo. Este factor también interaccionaría con KITL en esta función [41]. Además, el IGF-I (Factor similar a Insulina-I) actuaría aumentando la respuesta a FSH en las células de la granulosa estimulando la expresión de su receptor en este tipo celular. También, IGF-I estimula la expresión de proteínas involucradas en la síntesis de esteroides como StAR [42], CYP11A1 [43], CYP17 en sinergismo con LH [44] y la enzima CYP19 [45].

### **Regulación endocrina del desarrollo folicular**

Al mismo tiempo que estos factores se encuentran actuando en forma paracrina ó autocrina, los folículos preantrales responden a gonadotrofinas. La aparición de los receptores a FSH coincidiría con el hecho de que alrededor de los días 11 y 19 de edad, los niveles de FSH son elevados y se observa también un rápido crecimiento folicular. Luego de la pubertad, las gonadotrofinas permiten la supervivencia y el desarrollo de un número limitado de folículos antrales que llegarán al estadio de preovulatorio. Este proceso se encuentra regulado por gonadotrofinas secretadas de forma cíclica.

En resumen, podemos dividir al crecimiento folicular en tres fases: ***crecimiento preantral, crecimiento tónico y crecimiento gonadotrófico-dependiente.***

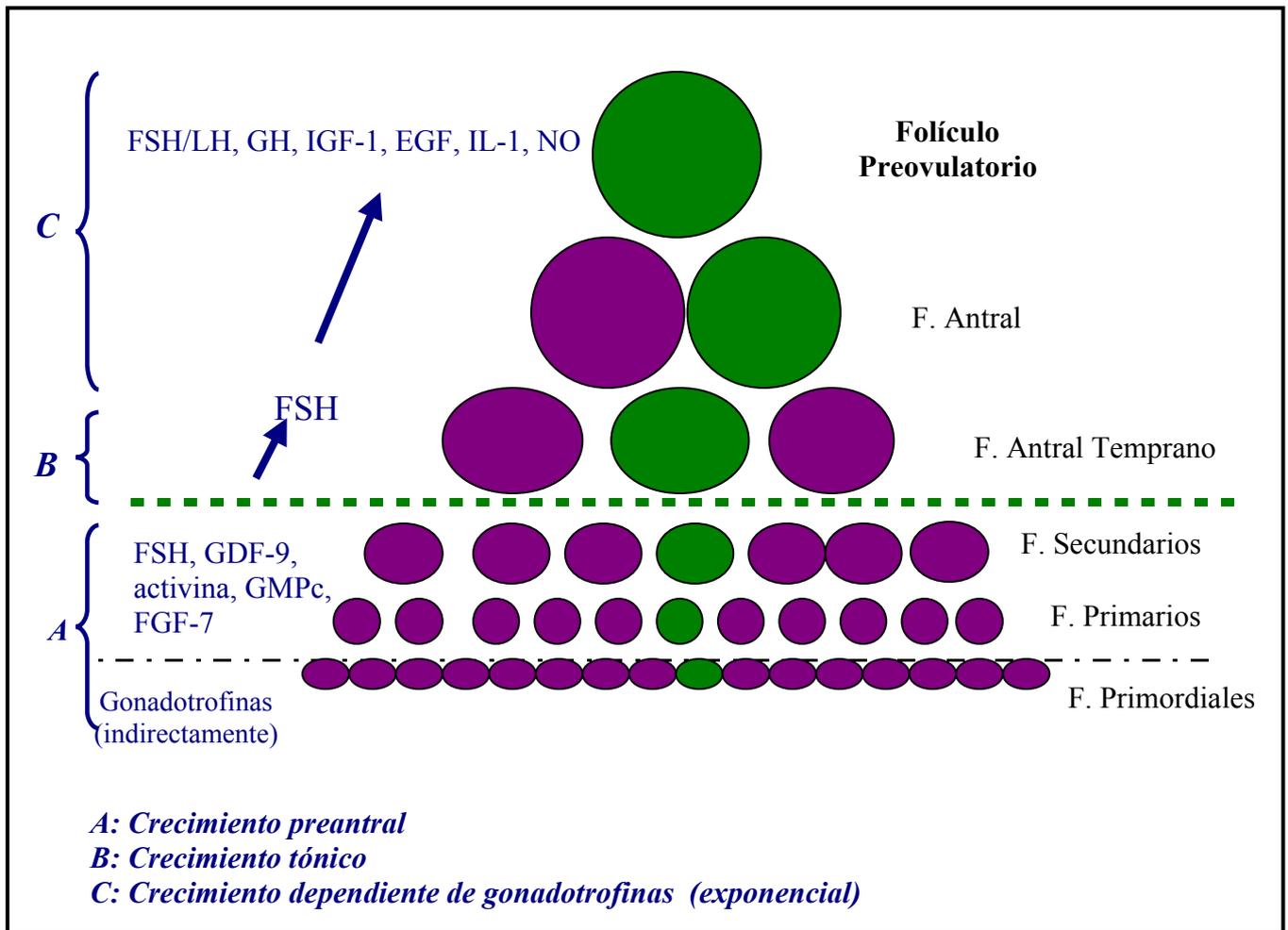
La primera fase de ***crecimiento preantral***, que abarca el pasaje de folículos primordiales a secundarios maduros y cuyo componente significativo es el crecimiento y diferenciación del ovocito, en un comienzo es independiente de gonadotrofinas (pasaje de primordial a primario) (*Figura 6*). Luego (de primario a secundario), comenzaría a actuar la FSH pero en bajos niveles secretados por la hipófisis. Respecto a esto, se observó que en ratas hipofisectomizadas el pool de folículos primordiales disminuye en forma más lenta [46], así como en humanos que poseen elevados niveles de FSH sérica, se produce un aumento en la pérdida de folículos primordiales [47].

La fase de ***crecimiento tónico*** corresponde a la diferenciación de preantrales (secundarios) a antrales y está caracterizado por un aumento de 600 veces en el número de células de la granulosa, acompañado por un incremento simultáneo de más de 15 veces el diámetro total folicular (debido también al crecimiento del antro). Probablemente se requieran bajos niveles tónicos de gonadotrofinas para el crecimiento de los folículos, pero el sostén gonadotrófico es necesario si el folículo progresa más

allá del desarrollo preantral temprano (*Figura 6*). Esta fase contrasta con estadios posteriores del desarrollo cuando la atresia depende íntimamente de los cambios cíclicos en los niveles circulantes de FSH.

La fase *gonadotrófico-dependiente*, se caracteriza por un crecimiento exponencial con un aumento de 160 veces la población de las células de la granulosa y estos estadios tardíos son los que dependen absolutamente de la secreción pulsátil de gonadotropinas, en particular los folículos de mayor tamaño que necesitan el sustento de estas hormonas si van a alcanzar el tamaño ovulatorio. Durante este tiempo ocurre la selección y dominancia folicular [48]. Mientras los folículos en crecimiento son insensibles a cambios hormonales cíclicos, los folículos “seleccionables” son más receptivos en cuanto a estos cambios. Estos folículos son muy sensibles a la administración de gonadotropinas exógenas en cuanto a la proliferación de las células de la granulosa, la cual aumenta considerablemente en comparación a otros folículos en crecimiento [49] (*Figura 6*). El término “selección” fue usado por primera vez por Goodman y Hodgen [50] para indicar el ajuste final que sufre la cohorte de folículos en crecimiento y que hace que pasen a formar parte del grupo de folículos posiblemente seleccionables para ser ovulados.

*Como ya lo hemos descrito, el proceso cíclico de la foliculogénesis ovárica se caracteriza por una notable proliferación y diferenciación de los componentes del folículo en maduración. Se presume que existe un “ajuste fino” in situ dado por la existencia de factores moduladores intraováricos, además del indiscutible papel desempeñado por las gonadotropinas y esteroides gonadales que explicaría las diferencias observadas en la proporción y el grado de desarrollo de los folículos ováricos.*



**Figura 6: Factores hormonales involucrados en la supervivencia y desarrollo de los folículos en roedores.** En este esquema se indica que el desarrollo folicular requiere diferentes factores que actúan en estadios específicos [1].

## APOPTOSIS

Durante las últimas dos décadas, la necesidad de entender la forma en que las células mueren, hizo que el estudio de la **apoptosis** o **muerte celular programada** sea uno de los campos que más avanzó en las ciencias biológicas [51]. Ahora nos encontramos en condiciones de asegurar que el cuerpo utiliza este mecanismo como parte de su proceso de desarrollo: para la eliminación de ciertas estructuras y para la formación de nuevos órganos [52;53]. Además la apoptosis continúa teniendo un papel fundamental en la vida postnatal manteniendo la homeostasis de los tejidos, removiendo células senescentes,

dañadas o que podrían ser desfavorables para el organismo [54;55].

Hay tejidos como el músculo, donde la apoptosis en condiciones fisiológicas es mínima. Sin embargo otros tejidos poseen altas tasas de renovación celular, donde la continua mitosis es contrarrestada por una alta apoptosis. Los órganos del sistema inmune, el intestino, el útero, y *el ovario* son claros ejemplos de este hecho.

Es interesante destacar que la denominación de *muerte celular programada* abarca numerosos procesos de muerte celular que comparten alguna de las características que poseen las células que mueren por apoptosis. Existen numerosos mecanismos de muerte celular, pero en este estudio nos limitamos al proceso de apoptosis ya que es la forma de muerte celular que generalmente se encuentra en los estudios sobre ovario en situaciones tanto fisiológicas como patológicas.

La *apoptosis* consiste en una serie de eventos ordenados que ocurren en tejidos que sufren cambios como consecuencia de su desarrollo ó debido a respuestas frente a estímulos fisiológicos alterados. Este *suicidio* celular ocurre en células con niveles normales de ATP, requiere de síntesis de ARNm y proteínas, afecta a células individualmente, involucra pérdida de tamaño celular, condensación de la cromatina y la formación de *cuerpos apoptóticos* que consisten en fragmentos nucleares rodeados de membrana plasmática. Esos cuerpos apoptóticos son eliminados por fagocitosis y de esta forma no se liberan los componentes citoplasmáticos al medio extracelular, impidiéndose un proceso inflamatorio.

Además de estos cambios, ocurren cambios morfológicos a nivel nuclear. Una de las características es la fragmentación que sufre el ADN como consecuencia de la activación de señales intracelulares que concluyen en la activación de endonucleasas produciendo clivajes en el ADN de forma regular entre las unidades nucleosomales. Como resultado de esta activación se generan fragmentos en un tamaño múltiplo de 200 pares de bases que constituyen un patrón característico de este proceso [56].

Diversos estudios han demostrado que muchas hormonas y factores de crecimiento son importantes para la proliferación celular y cumplen una función en la supresión de la apoptosis ó la supervivencia celular [57]. Cuando las células dejan de recibir estas hormonas tróficas o factores de crecimiento, ocurre la apoptosis. Sin embargo, la inducción de la apoptosis es específica del tipo celular, ya que factores apoptóticos ó antiapoptóticos poseen distintas acciones dependiendo según el tipo

celular sobre el que actúen y es el balance entre estos factores el que determinará el destino celular: muerte ó supervivencia.

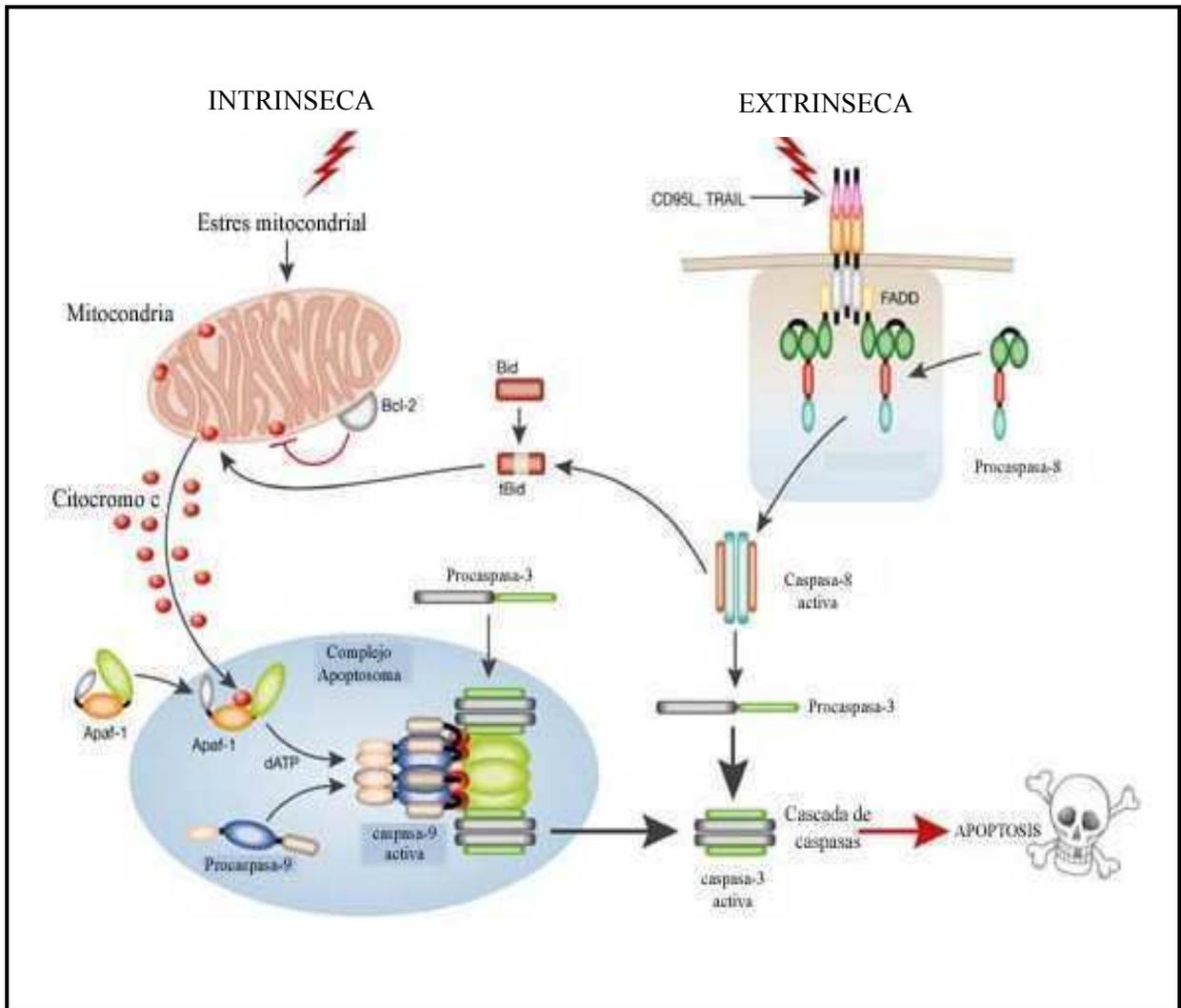
Como hemos mencionado, en los distintos sistemas existen dos caminos por los cuales muchas células son inducidas a la apoptosis: el primero es la remoción de factores esenciales de supervivencia para la célula y el segundo se produce por la acción de un factor dominante que inducirá la muerte celular actuando como ligando y uniéndose a un receptor. Ambas condiciones llevan a la inducción y/ó activación de varios genes asociados a la muerte celular y/ó proteasas capaces de iniciar apoptosis. Algunos de los efectores intracelulares identificados en las células de la granulosa son: Fas, Bcl-2, Bcl-x, Bax y p53. En células de la granulosa se conoce el efecto que produce en el incremento de la apoptosis, la remoción de factores promotores de crecimiento como esteroides, gonadotrofinas ó factores de crecimiento [58;59].

Dos vías han sido descritas en los procesos apoptóticos: 1) *La de receptores de muerte o extrínseca* [60;61] y 2) *La mitocondrial o intrínseca* (Figura 7).

Ambas vías comparten una familia de proteínas que actúan a lo largo de este proceso: las *caspasas*. Estas proteínas pertenecen a una familia de proteasas ricas en cisteína y son responsables de la mayoría de los clivajes proteolíticos que ocurren durante la apoptosis. Las caspasas son traducidas como zimógenos inactivos que deben ser activadas mediante su clivaje. El mecanismo mediante el cual las caspasas son activadas, las divide en dos categorías diferentes. El primer grupo incluye las denominadas "**Caspasas iniciadoras**" (caspasa-2, 8, -9 y -10) que inician la cascada y poseen un dominio que facilita su autocatálisis mediante el ensamblaje de complejos multiproteicos [62;63]. Una vez procesadas las caspasas iniciadoras, activan a la segunda categoría de caspasas, "**Caspasas efectoras**" (caspasa-3,-6,-7) que son responsables de los clivajes que desintegran la célula [64-67] e hidrolizan selectivamente un amplio espectro de polipéptidos que incluyen proteínas quinasas, proteínas involucradas en la transducción de señales, componentes del citoesqueleto e inhibidores de las deoxiribonucleasas [68]. El resultado de la activación de estas proteínas no solo es la pérdida de la homeostasis celular, si no también facilita la ruptura y empaquetamiento de las células en los mencionados cuerpos apoptóticos eliminados por fagocitosis durante el último paso de la eliminación celular de este proceso [69;70].

En la vía extrínseca actúan los receptores de muerte que se encuentran en la membrana plasmática de la célula y pertenecen a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) [64;71]. Entre los receptores más conocidos, se encuentra el **CD 95/Fas**. La activación de estos receptores, luego de interactuar con su respectivo ligando, generan dos tipos de respuesta celular: uno es a través de la expresión de altos niveles de una caspasa, caspasa 8; y el otro se da mediante un clivaje de **BID** (ligando proapoptótico) dado por esta misma caspasa, liberando un fragmento activo que interactúa con la proteína **BAX** (proteína proapoptótica formadora de canales) y favorece la liberación del **Citocromo c** de la mitocondria. Una vez liberado, se adhiere a la proteína **Apaf-1** (Factor activador de proteasas apoptóticas) causando un cambio conformacional y permitiendo que Apaf-1 interactúe con procaspasa-9 que a su vez activará a las caspasas efectoras 3 y -7.

En la vía mitocondrial se han identificado numerosas proteínas que podrían prevenir o promover la apoptosis [72]. Algunas de estas pertenecientes a la familia del gen bcl-2 (Bcl-2, Bax, Bod, Bad, Bcl-x corto y largo, etc), son importantes reguladores de la apoptosis ovárica [73-76]. Interactúan formando dímeros que modifican la membrana mitocondrial causando un aumento de la movilización de BAX a la mitocondria y liberación de Citocromo c, el cual interviene en el proceso anteriormente descrito. Se ha demostrado la participación de algunas de estas proteínas pro o antiapoptóticas asociadas a la atresia folicular [77;78].



**Figura 7:** Apoptosis: una decisión de vida o muerte. (Modificado de Williams y Mc Farlane, 2004) [79]

### Caspasa-3 y función de PARP en la atresia folicular

En particular, la *caspasa-3* es la principal caspasa efectora que actúa en la muerte celular programada [80-82]. Boone y col. [83] han realizado uno de los primeros trabajos describiendo el papel de esta proteasa en la atresia folicular en el ovario de rata. Este grupo indujo la atresia folicular mediante la privación de gonadotrofinas y la regresión del cuerpo lúteo, mediante la administración de Prostaglandina  $F_{2\alpha}$ . Se observó que en folículos sanos y en cuerpo lúteo no apoptótico, la caspasa-3 se localiza en células de la teca y en células luteales, respectivamente. Sin embargo, las células de la granulosa de estos folículos parecen no expresar esta proteasa. Es interesante

observar que en folículos atrésicos se encontró esta enzima localizada en células de la granulosa, sugiriendo que su expresión es regulada por gonadotrofinas y que se induciría mediante el proceso apoptótico en células de la granulosa de folículos atrésicos. Este grupo no encontró diferencias en la localización e intensidad de la caspasa-3 en cuerpo lúteo sano o atrésico.

Sin embargo, Peluffo y col. [84-86] han demostrado que durante la preñez, en la rata, la caspasa-3 ha aumentado su actividad previamente a la disminución en la producción de Progesterona que indica la regresión funcional del cuerpo lúteo, a pesar de que no se observó un aumento en el porcentaje de células apoptóticas hasta luego del parto. También se observó un aumento en la actividad de esta caspasa-3 cuando la luteólisis fue inducida con el tratamiento de PGF2 $\alpha$  en ratas preñadas.

A pesar del efecto de las gonadotrofinas sobre la caspasa-3 descrito anteriormente, Yacobi y col. [87] han demostrado en el año 2004 en folículos preovulatorios de rata en cultivo, que las gonadotrofinas tendrían un rol dual en la activación de esta enzima, siendo estímulos anti-apoptóticos en células de granulosa y pro-apoptóticos en células de teca intersticiales.

Esta enzima se sintetiza como una pro-caspasa de 33 kDa que tras su activación, es clivada generando un fragmento de 11 kDa y uno de 20 kDa. Este último, a su vez es nuevamente clivado generando la subunidad madura de esta proteína de 17 kDa [87].

Existe un número limitado de sustratos que son clivados por la caspasa-3 durante el proceso de apoptosis. Entre ellos, destacamos **PARP** (Polimerasa Poli-ADP ribosa Polimerasa) [83] y actina [88] los cuales son inhibidores de la enzima DNasa I, endonucleasa responsable de la fragmentación del ADN durante la apoptosis [89;90].

### **Atresia folicular**

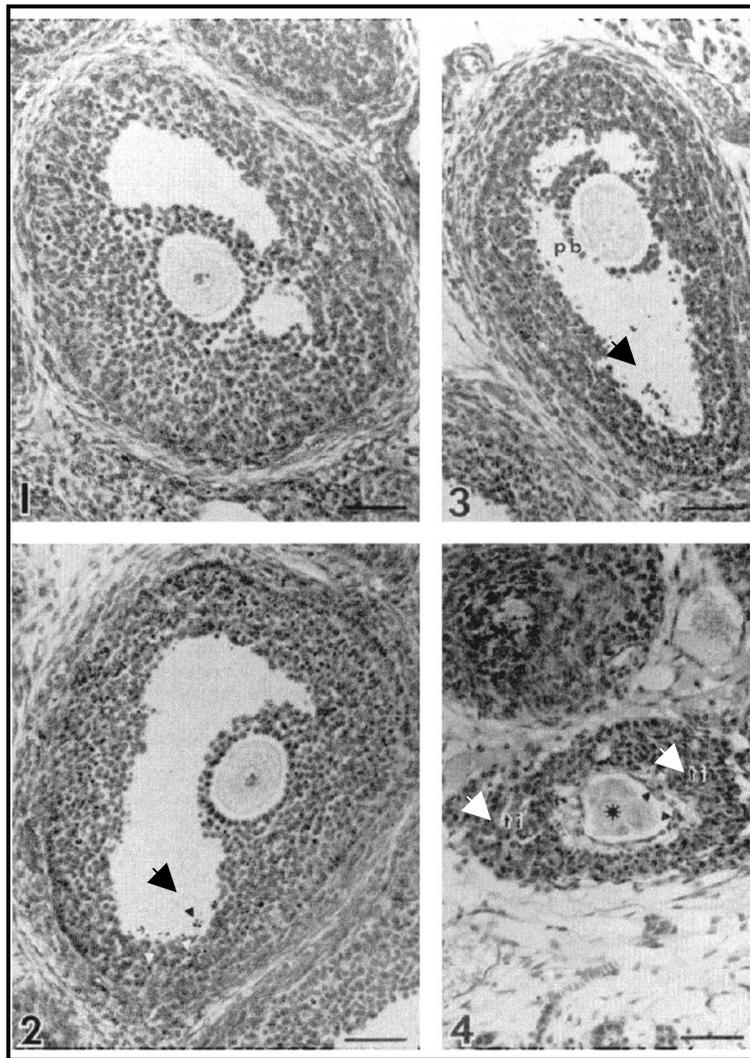
La atresia folicular es uno de los mecanismos característicos en vertebrados mamíferos y no mamíferos. Se calcula que más del 99.9% de los folículos, en humanos, sufren cambios degenerativos durante el normal funcionamiento ovárico. El proceso por el cual los folículos son eliminados, se denomina **atresia** (*Figura 8*). Este fenómeno se produce por apoptosis y tiene lugar en las células de la granulosa y en el ovocito. Esto podría resultar en una ventaja evolutiva, siendo seleccionados aquellos folículos que contengan ovocitos saludables para que finalmente lleguen exitosamente a ser ovulados. Esta selección será posible durante un ciclo reproductivo, si los folículos son expuestos a FSH en un estadio crítico de desarrollo, como explicamos anteriormente.

Dentro del folículo, el tipo celular que evidencia el proceso de apoptosis más claramente, es el de células de la granulosa (*Figura 8*, círculos blancos). Sin embargo, hay algunas especies como cerdos, pollo y rata donde también se da este proceso en las células de la teca, aunque de forma más tardía [77;91].

En modelos *in vitro* como *in vivo*, se ha demostrado en el ovario la presencia de varios factores atretogénicos entre los que encontramos: GnRH-I, IL-6, andrógenos, TNF- $\alpha$ , Ligando Fas, etc. [78;92;93]. En cambio entre los factores involucrados en la supervivencia folicular, se encuentran entre otros [59], el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF), Factor de Crecimiento similar a Insulina tipo I (IGF-I), Factor Transformante tipo I (TGF- $\beta$ ). También las hormonas esteroideas son factores supresores o estimuladores de la apoptosis dependiendo del tejido en el que actúan. Claros ejemplos son los glucocorticoides que estimulan la apoptosis en el timo [94], los andrógenos que en altas concentraciones estimulan la apoptosis en ovario pero no en testículo [95] y los estrógenos que inhiben la apoptosis en ovario [96]. Es interesante observar que la relación andrógenos/estrógenos es elevada en el fluido folicular de folículos atrésicos [97].

Las gonadotropinas son consideradas como factores de supervivencia folicular. Se ha demostrado que los folículos atrésicos tempranos son rescatados por la administración exógena de gonadotropinas [98], así como también la administración de FSH en ratas hipofisectomizadas inmaduras disminuye la apoptosis folicular en células de la granulosa [59].

***Esto son solo algunos ejemplos de los múltiples factores que existen regulando este proceso de atresia. Como ya hemos descrito, el destino de los folículos (crecimiento/ovulación o atresia) depende del delicado balance en la expresión y acción de factores que promueven la proliferación, el desarrollo y diferenciación de las células del folículo ovárico y de aquellos que promueven la apoptosis de las mismas llevando al folículo a la atresia.***



**Figura 8: Histología de los diferentes estadios de atresia en el ovario de la rata.**

**1:** Folículo sano; **2:** Estadio I de atresia, la flecha indica núcleos de células de granulosa picnóticos; **3:** Estadio 2 de atresia donde el fluido folicular contiene restos celulares (flechas). **4:** Estadio 3 de atresia: \* indica oocito fragmentado. Las células de la teca interna están hipertrofiadas (flechas) y se observan pocas células de la granulosa. El folículo se encuentra colapsado. Barra 50 $\mu$ m [99].

## ESTEROIDOGENESIS

Los esteroides sexuales poseen un rol fundamental en el crecimiento y diferenciación de distintos tejidos reproductivos entre los cuales se encuentran el útero, las glándulas mamarias, el esqueleto y cerebro. Además, los esteroides producidos en el ovario poseen efectos locales, los cuales son esenciales para que el ovario funcione

normalmente. Los progestágenos, andrógenos y estrógenos son producidos a partir del colesterol en el ovario, como se detallará mas adelante, y sintetizados de forma secuencial, sirven a su vez de sustrato para la síntesis de otra hormona esteroidea en el proceso de *esteroidogénesis*. Debido a su importancia en el funcionamiento del ovario, cualquier variación en los niveles de esteroides puede llevar a situaciones patológicas. Un claro ejemplo es el Síndrome de ovario poliquístico (PCOS), el cual se caracteriza por un exceso en los niveles de andrógenos ováricos (o adrenales), un desarrollo folicular anormal e infertilidad ligado en gran parte a la anovulación que se observa en este síndrome [100].

Las principales células productoras de esteroides en el ovario son las células de la granulosa, células de la teca y células del cuerpo lúteo, las cuales poseen el complemento enzimático necesario para la síntesis de esteroides.

Hemos nombrado anteriormente que todos los esteroides que se producen en el ovario son derivados del colesterol, el cual proviene de tres fuentes: 1) de lipoproteínas que se encuentran en la circulación, 2) a partir de síntesis de novo y 3) de almacenamientos intracelulares en forma de ésteres de colesterol. Existen numerosos trabajos que sugieren que el colesterol que juega un papel fundamental en la producción de hormonas esteroideas, es el colesterol que se incorpora a las células esteroidogénicas, y no aquel que es sintetizado *de novo* [101;102]. Las células esteroidogénicas se encuentran rodeadas de ésteres de colesterol los cuales también se encuentran almacenados en estas células, y el colesterol es transportado en forma de estos ésteres por lipoproteínas de baja densidad o de alta densidad (LDL y HDL respectivamente). En general, la HDL posee un rol menor en el aporte de colesterol, excepto en el caso de roedores que parece ser la de mayor importancia

La anatomía vascular de los componentes celulares del ovario influye en cuanto a la posible utilización de las lipoproteínas como fuente de colesterol. Es por esto que en el cuerpo lúteo con una abundante vascularización y un endotelio altamente vascular, se ve facilitado el contacto de las lipoproteínas con sus receptores ubicados en las células luteales. Asimismo, las células de la teca interna tienen acceso a las lipoproteínas ya que se encuentran muy vascularizadas, contrariamente a lo que sucede con las células de la granulosa, las cuales se encuentran aisladas de los capilares sanguíneos debido a la membrana basal que funciona como barrera a distintas moléculas, entre ellas la LDL.

El colesterol es transportado al interior de la célula por un proceso de endocitosis mediado por receptores asociados a la membrana plasmática. Luego, para el inicio de la síntesis de esteroides, el colesterol debe atravesar el espacio acuoso que se encuentra entre la membrana externa rica en colesterol de la mitocondria y la membrana interna pobre en colesterol, y de esta forma ponerse en contacto con la proteína **CYP11A (P450 scc o citocromo del clivaje de la cadena lateral del colesterol)**. Este proceso es llevado a cabo por la **Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR)** [103]. Esta proteína transportadora, de 30 kDa, sería la mediadora ante una inducción aguda de la esteroidogénesis. Se describirá en forma detallada más adelante.

Se han descrito otras tres proteínas implicadas en la respuesta esteroidogénica aguda: la Proteína transportadora de esteroides 2 [104;105], el Polipéptido activador de la esteroidogénesis [106;107] y una proteína homóloga de la endozepina o del inhibidor de la fijación del diazepam [108;109].

Como se puede observar en la Figura 9, el primer paso de conversión del colesterol, consiste en la ruptura de la cadena lateral del *Colesterol* (unión C-20,22) resultando en un compuesto de 21 carbonos, la *Pregnenolona*. Este clivaje es llevado a cabo por la enzima **P450scc o CYP11A** que forma parte de un complejo enzimático ubicado en las membranas internas de la mitocondria y es considerado **un paso limitante en la velocidad de síntesis de esteroides** dependiendo de la biodisponibilidad del colesterol [110].

La *pregnenolona* es el intermediario común en la biosíntesis de todas las clases de hormonas esteroideas producidas por el ovario. Una vez sintetizada, abandona la mitocondria y en el retículo endoplasmático liso (REL) es rápidamente convertido en *Progesterona* debido a la gran cantidad de enzima **3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa/delta4-delta5 isomerasa (3 $\beta$ -HSD)**. La progesterona es el primer compuesto con actividad biológica que es secretado por células de la teca y en menor medida por células de la granulosa. Las principales responsables de su secreción son las células luteales durante la fase lútea del ciclo y primera parte de la preñez.

El complejo enzimático, componente también de las membranas del retículo endoplasmático liso, que interviene en el siguiente paso, es el compuesto por la enzima

**17 $\alpha$  hidroxilasa /C-17,20 liasa (CYP17).** Este es otro punto de regulación de la **síntesis folicular de esteroides**. Ambas reacciones que posee esta enzima, ocurren en forma concertada sin aparición del 17 $\alpha$  hidroxyl intermediario en forma libre. Tanto la pregnenolona como la progesterona pueden ser utilizados como sustrato de este complejo enzimático para dar *dehidroepiandrosterona (DHEA)* y *androstenediona*, respectivamente. Dado que las células teca-intersticiales poseen alta actividad de estas enzimas, se las considera la principal fuente celular de andrógenos foliculares. La vía de síntesis de andrógenos dada a través de la pregnenolona, se denomina vía *delta 5*, siendo la vía *delta 4* la que se desarrolla utilizando a la progesterona como sustrato (*Figura 9*).

Tanto la androstenediona como la testosterona son los precursores inmediatos en la síntesis de esteroides estrogénicos, *estróna* y *17 $\beta$ -estradiol* respectivamente, ya que son capaces de sufrir aromatización, siendo el 17 $\beta$ -estradiol aproximadamente 10 veces más potente que la estróna. Este proceso de aromatización es llevado a cabo por otro complejo enzimático localizado también en la membrana del retículo endoplasmático liso al cual se lo denomina **aromatasa (CYP19)**, debido al hecho de sintetizar compuestos aromáticos. Las células de la granulosa constituyen la mayor fuente de estrógenos. Aunque estas células son capaces de producir progesterona en forma independiente, la síntesis de estrógenos requiere la cooperación entre las células de la granulosa y las células tecales vecinas. La participación de estos dos tipos celulares y de ambas gonadotropinas (LH y FSH) sostiene la *hipótesis de dos células/dos gonadotropinas* que se explicará de forma detallada más adelante [48].

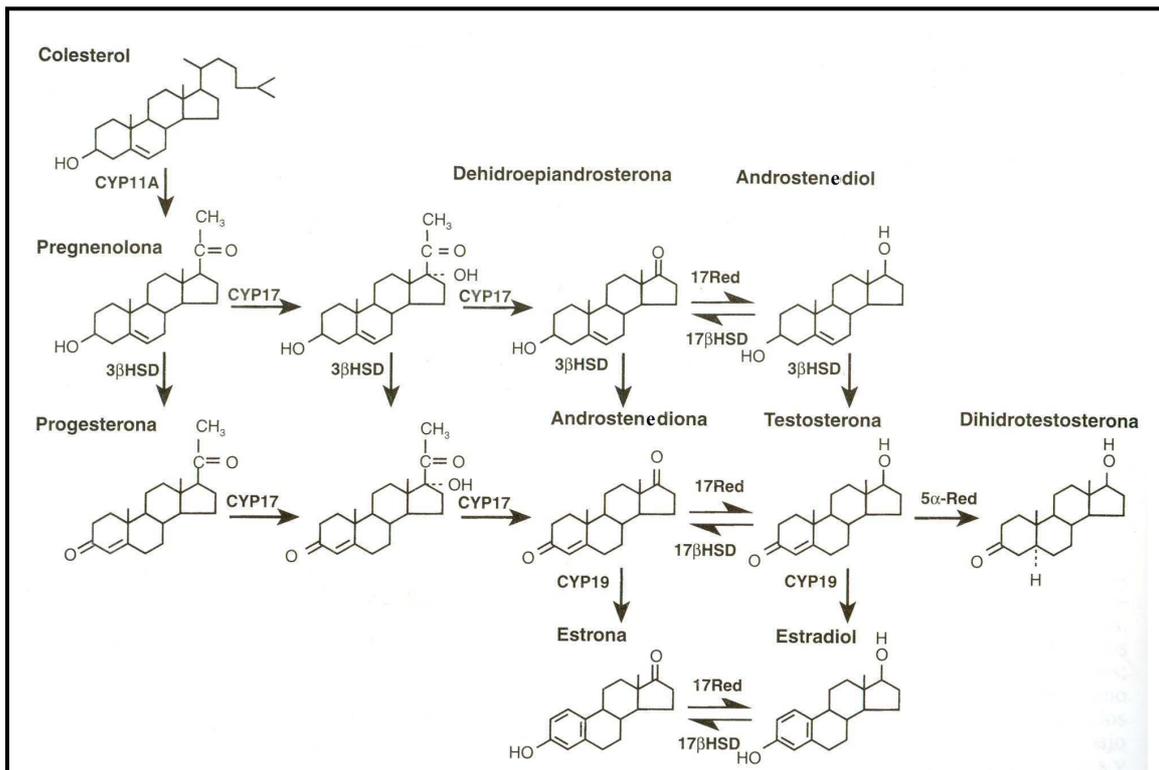


Figura 9: Esquema general de la síntesis de estrógenos y andrógenos [48].

### Metabolismo de esteroides ováricos

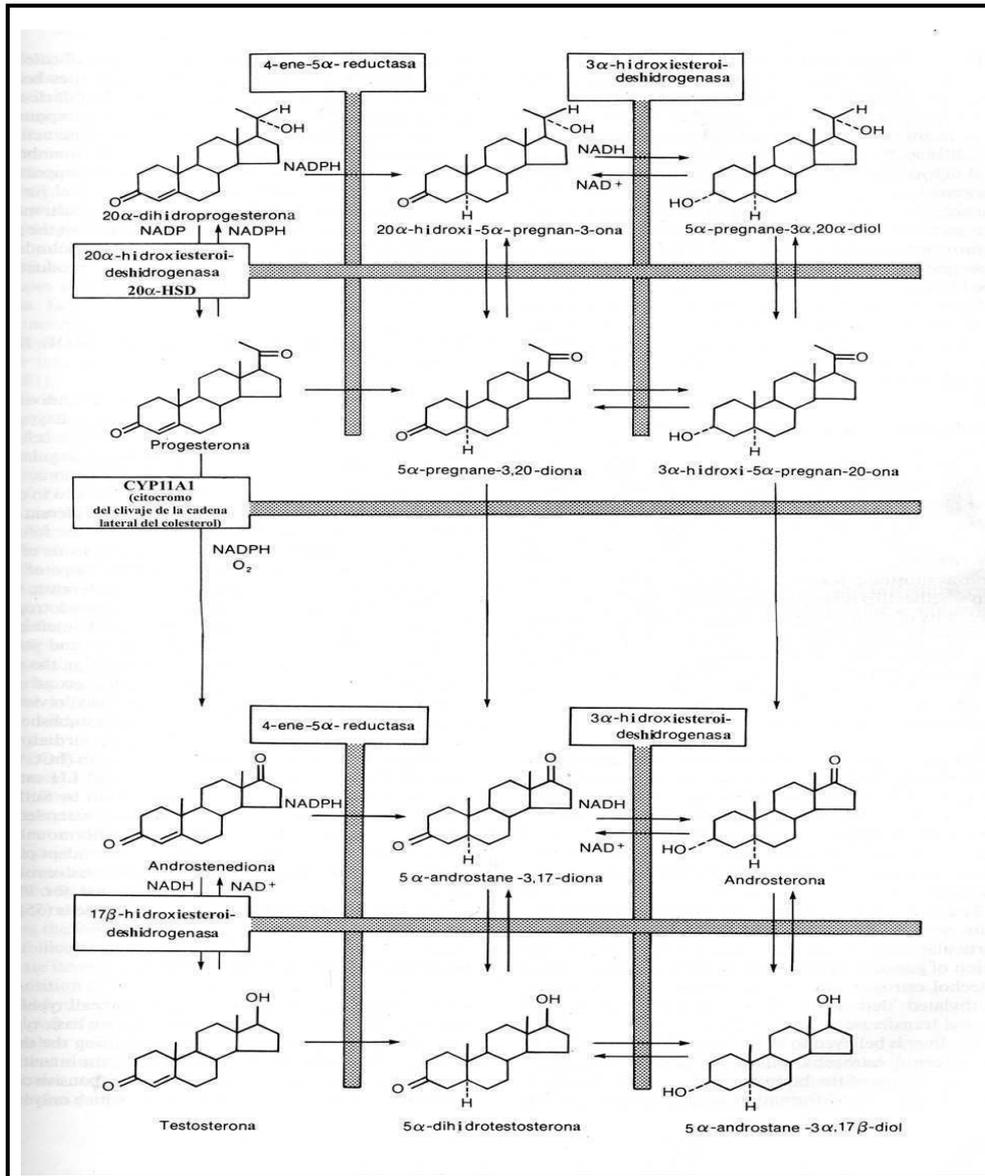
Tanto los progestágenos como los andrógenos sufren reducciones como consecuencia de ser metabolizados. En estas reacciones se encuentran enzimas involucradas, **reductasas**, como **5 $\alpha$ - ó 5 $\beta$ -reductasa**, para el caso de los andrógenos, y **20 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa** encargada del metabolismo de los progestágenos.

El grupo de esteroides C-20, como la progesterona y 17 $\alpha$  hidroxiprogesterona, pueden sufrir reducción enzimática, mediado por las **20 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasas**, obteniéndose sus correspondientes 20-hidroxiderivados (*Figura 10*) [111]. Estas enzimas están ubicadas en el citosol y la secreción de progesterona dada por las células de la granulosa se encuentra modulada por cambios en la conversión de progesterona a sus metabolitos, reacción reversible cuyo sustrato es la progesterona y en la cual se obtiene como producto su metabolito 20 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (*Figura 10*) [112]. La enzima 20 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa del cuerpo lúteo de roedores, está sujeta a regulación hormonal y de esta forma influye en la potencia biológica de los esteroides C-21 producidos por este órgano, ya que la 20 $\alpha$ -hidroxiprogesterona es considerada

inactiva como factor progestacional [112]. Dado que los esteroides  $20\alpha$  reducidos son sustratos pobres para la enzima CYP17, la actividad de la  $20\alpha$ -hidroxiesteroide dehidrogenasa cumpliría un rol importante determinando la disponibilidad de sustrato para la conversión a andrógenos en células foliculares.

Como hemos nombrado anteriormente, la otra enzima involucrada en el metabolismo de esteroides es la  **$5\alpha$ -reductasa** localizada en el REL. Esta enzima puede actuar antes ó después del clivaje ocasionado por la C17,20-liasa afectando, en cada caso, progestágenos y andrógenos. Si la reacción se da antes del clivaje, convierte progesterona y  $20\alpha$ -hidroxiprogesterona en compuestos  $5\alpha$ -reducidos. En cambio, si la reducción ocurre después, la enzima actúa sobre los andrógenos androstenediona y testosterona para dar androstanediona y dihidrotestosterona, [111], los cuales a su vez por acción de la enzima  $3\beta$ -HSD se transformarán en androsterona y  $5\alpha$ -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol, respectivamente (*Figura 10*). Estos últimos, denominados andrógenos 5 alfa reducidos, no son susceptibles a sufrir reacción de aromatización ya que poseen su anillo A en forma saturada. Por lo tanto no son sustrato para la producción de estrógenos y actúan a altas concentraciones como inhibidores de las aromatasas en células de la granulosa [113].

La actividad de estas enzimas reductoras es muy elevada en ovario de ratas inmaduras y disminuye luego de la primera ovulación [114;115].



**Figura 10: Metabolismo de esteroides.** Tomado y Modificado de Physiology of Reproduction [111].

### Proteína Reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR)

La proteína StAR fue descrita por primera vez por Orme-Johnson y col. [116;117] como una fosfo-proteína de 30 kDa inducida por ACTH en células adrenocorticales de rata y ratón y también como una proteína inducida por LH, en células de cuerpo luteo de rata y células de Leydig de ratón.

Esta proteína es sintetizada como un precursor de 37 kDa que es rápidamente transportado a la mitocondria, y su incorporación está asociada con su procesamiento a una forma de 30 kDa.

Numerosos trabajos habían confirmado la estrecha relación entre la síntesis de esteroides y la síntesis de esta proteína de 30 kDa [118]. Sin embargo, fue en 1994 cuando se demostró su función en relación a la esteroidogénesis mediante la clonación de esta proteína [119]. En este trabajo se demostró que las células MA-10 (células de tumorales de Leydig de ratón) en las cuales se expresaba esta proteína aumentaba la síntesis de esteroides en ausencia de estímulos como ACTH (Hormona liberadora de adenocorticotrofina). Además, la transfección de otro tipo celular como COS-1 con el ADNc codificante para el precursor de esta proteína, daba como resultado un aumento en la conversión de colesterol a pregnenolona [120]. Caron y col. [121] generaron ratones knock out para la proteína StAR los cuales presentaban genitales masculinos externos, impedimento para un crecimiento normal y morían prematuramente, como resultado de insuficiencia adrenocortical. Además, los niveles de corticosterona y aldosterona de estos animales, se encontraron disminuídos. Existe una enfermedad, Hiperplasia congénita gonadal (CAH), que es letal para el que la posee y se caracteriza por la incapacidad de sintetizar esteroides. Se demostró que la causa de esta enfermedad era un mutación en el gen codificante para la proteína StAR [122].

La proteína StAR posee dos dominios claves para su función. El dominio carboxilo-terminal (C-terminal) involucrado en la deabsorción de esteroides de la membrana externa de la mitocondria (rica en esteroides) para transportarlos hacia la membrana interna de la mitocondria (pobre en esteroides). El dominio amino-terminal (N-terminal) confiere a la proteína la señal para que luego de que sea sintetizada en el retículo endoplásmico, viaje hacia la mitocondria donde ejercerá su función final. Sin embargo, este dominio no posee función alguna en el transporte de esteroides [123].

Los transcriptos de esta proteína han sido detectados en ovario, testículo y riñón y no han sido encontrados en otros tejidos. Aparentemente, la expresión de esta proteína está restringida a tejidos donde ocurren oxidaciones de esteroides a nivel de la mitocondria, sujetos a una regulación aguda de parte de AMP cíclico [124].

La regulación hormonal de la síntesis de esteroides en forma aguda ó en forma crónica, es mediada por AMPc [125;126]. El efecto agudo es la movilización y transporte del colesterol a la membrana interna de la mitocondria. En contraste, los efectos crónicos involucran transcripción de genes que codifican enzimas esteroidogénicas. Sin embargo estudios realizados en la respuesta aguda esteroidogénica con cicloheximida, inhibidor de síntesis de proteínas, sugirieron la síntesis de novo de una proteína reguladora que facilitaría el traslado del colesterol desde la membrana externa hacia la membrana interna de la mitocondria [127].

Actualmente se sabe que la regulación de la esteroidogénesis en presencia del complejo P450<sub>scc</sub> es determinada por la proteína denominada *Proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis (StAR)*.

### **StAR en el ovario**

Orly y col. [128] realizaron un trabajo muy completo en cuanto al patrón de expresión de la proteína StAR durante el desarrollo folicular en ovario de rata. En ese trabajo han demostrado que la expresión de StAR y de su mensajero posee una respuesta bifásica en ovarios de ratas inmaduras tratadas con PMSG/hCG. Se observó un primer pico de expresión en respuesta a la administración de PMSG el cual duró 24 hs, y un segundo aumento ante la aplicación de hCG. En cuanto a la localización celular de esta proteína, se observó que nueve horas luego de la administración de PMSG, StAR se localiza en células intersticiales, algunas células de la teca y en folículos atrésicos. Cerca del momento de la inyección de hCG, pero antes de su aplicación, la expresión de StAR disminuye considerablemente en el compartimiento teco-intersticial y apenas luego de la administración de hCG, los niveles de la proteína aumentan en todo el intersticio del ovario. En folículos antrales, StAR se expresa en todo el intersticio ovárico. Es muy interesante observar que en este estadio de la fase folicular, durante el proceso de luteinización, se detectan altos niveles de StAR en

células de la granulosa, donde anteriormente no se encontraba expresión alguna. Más interesante aún es el hecho de que la expresión de StAR está restringida a folículos periovulatorios, mientras que los folículos que no están destinados a ovular, carecen totalmente de StAR en la capa de células de la granulosa [128]. Estas observaciones evidenciaron que esta proteína se expresa de forma variable de acuerdo al momento y estímulos bajo los cuales se encuentra el desarrollo folicular [128]. De similar forma, Thompson y col. [129] describen en ovarios de ratas juveniles, la localización de StAR en células tecales que rodean a folículos preantrales, antrales y preovulatorios. Sin embargo, contrariamente a lo que comunica Orly y col., estos autores observan expresión de la proteína en células de la granulosa antes de la estimulación con gonadotrofinas. Sin embargo, este último trabajo administra una dosis de gonadotrofinas considerablemente mayor que la utilizada en el trabajo de Orly y col.

Esta proteína también ha sido ampliamente estudiada en cuerpo lúteo de distintos organismos. En cuerpo lúteo humano se ha observado que tanto el mensajero como la proteína están altamente expresados en la fase lútea temprana y media, declinando su expresión en fase tardía. Además, los niveles de esta proteína se correlacionan con los niveles séricos de progesterona y la supresión de LH provoca una marcada disminución de StAR en el cuerpo lúteo [130;131].

### **CYP11A1**

La enzima **CYP11A1 o Citocromo P450<sub>scc</sub> (Enzima de la ruptura de la cadena lateral del colesterol)** junto a sus dadores de electrones: adrenoxina y adrenoxina reductasa, localizadas en la membrana interna de la mitocondria, cataliza la conversión del colesterol (esteroide de 27 carbonos) a pregnenolona (esteroide de 21 carbonos). Como hemos mencionado, **este es el primer paso limitante en la síntesis de esteroides**. Este citocromo se encuentra presente en la glándula adrenal y en las gónadas y está regulado por hormonas provenientes de la hipófisis dentro del llamado eje hipotálamo-hipofisario-gonadal [132].

Defectos parciales en este citocromo provocan pseudohermafroditismo en machos y en hembras y los individuos tienen alteraciones en las características sexuales secundarias [133-136]. El polimorfismo de esta enzima también se encuentra ligado al Síndrome de ovario poliquístico (PCOS) y además mutaciones en el gen que codifica a esta enzima, causarían hiperplasia congénita adrenal, caracterizada por una deficiencia en la síntesis de esteroides y acumulación de lípidos en los tejidos esteroidogénicos [137].

### **CYP11A1 en el ovario**

Este citocromo ha sido inmunolocalizado en folículos y cuerpo lúteo de especies diferentes entre las cuales se encuentran: humanos [138], bovinos [139;140], ovejas [141] y rata [142]. En particular, en folículos ováricos de humanos, bovinos y rata, esta enzima se localiza principalmente en las células de la teca interna. Las células de la granulosa en humanos no presentan expresión de esta enzima y en la rata se expresa solo en las células de granulosa de animales inmaduros tratados con gonadotropinas [143]. Es importante destacar que la CYP11A1 comienza a expresarse en mayor proporción luego de alcanzada la ovulación [144]. En el ovario de la rata, las células intersticiales también la expresan [145;146].

Como ya mencionamos, la mayor expresión de esta enzima se encuentra en el cuerpo lúteo de las especies nombradas anteriormente. Si bien el CYP11A1 está localizado principalmente en las células de la teca interna del folículo ovárico, ambos tipos celulares del cuerpo lúteo derivados tanto de la granulosa como de la teca folicular, expresan CYP11A1 [143]. Orly y col [128;147] demostraron que en ovarios de ratas prepúberes tratadas con gonadotropinas, el ARN mensajero de la CYP11A1 aumenta significativamente a partir de las 30 horas de aplicadas las gonadotropinas y este aumento continúa a los largo del tiempo luego del tratamiento. En cuanto a la expresión proteica de este citocromo, en el mismo trabajo se describe un aumento leve de la expresión de esta proteína luego de la administración de gonadotropina coriónica equina (PMSG o eCG), siendo mayor el aumento que se observa luego de la administración de hCG.

Los factores que producen un aumento en la síntesis de progesterona como la hCG y eCG, también estimulan la expresión de la CYP11A1 en ovario de ratas [143]. Además la administración de prolactina *in vitro* en células luteales y células de la

granulosa, aumenta el efecto estimulador de hCG sobre los niveles del ARN mensajero de esta enzima [148]. A pesar de que la expresión de la enzima es menor en células foliculares comparado a células que forman el cuerpo lúteo, tanto las células de la granulosa como de la teca humanas aumentan la expresión de CYP11A1 en respuesta a forskolina, un análogo del segundo mensajero, AMP cíclico [143]. Otro regulador importante que actúa a través de la vía de cAMP, es la hormona FSH. La adición de FSH a células de la granulosa bovina, porcina y de rata, aumentan la actividad del citocromo CYP11A1 [143], la cual es paralela a un aumento en la expresión del mismo. Entre otros factores que estimulan la expresión de esta enzima, se encuentran el EGF o Factor de crecimiento epidermal, y el IGF-1, los cuales actúan o no en sinergia con FSH [43;149]. En cambio, un estimulador del camino de la proteína quinasa C, produce una inhibición del nivel de proteína y su transcripto cuando la misma es estimulada por FSH [150].

### **CYP17**

La enzima **Citocromo P450 17 $\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa (CYP17)** se encuentra localizada en el retículo endoplásmico liso. **Esta enzima es clave en el camino de síntesis de hormonas esteroideas, como los glucocorticoides y esteroides sexuales.** La CYP17 es una única enzima que cataliza dos reacciones: 1) la 17 $\alpha$ -hidroxilación de esteroides de 21 carbonos (C21) como pregnenolona y progesterona (actividad 17 $\alpha$ -hidroxilasa) y 2) y la lisis de 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona y 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona [151] (actividad 17, 20 liasa). Estas reacciones en conjunto dan como producto esteroides de 19 carbonos (C19) como dehydroepiandrosterona (DHEA) y androstenediona (AD) respectivamente. En particular, la actividad de 17 $\alpha$ -hidroxilasa se requiere para la síntesis de cortisol, el glucocorticoide que se produce en mayor cantidad en muchos animales, y la actividad de 17,20-liasa, es requerida para la producción de andrógenos en todos los animales [152]. Debido a que esta enzima posee dos actividades, se la considera un **regulador cualitativo** de la esteroidogénesis, que va a determinar que clase de esteroide va a ser producido. Cuando la enzima CYP17 está ausente, como en la zona glomerulosa de la glándula adrenal, los productos serán compuestos de 21 carbonos y 17 deoxiesteroides, como la aldosterona. Si la actividad 17 $\alpha$ -hidroxilasa está presente, los productos serán compuestos de 21 carbonos y serán 17 hidroxiesteroides, como el cortisol. Pero, como en el caso del ovario, si ambas

actividades se encuentran presentes, los productos serán compuestos de 19 carbonos los cuales son precursores de los esteroides sexuales [153]. Al principio se pensaba que la 17 $\alpha$ -hidroxilasa y 17,20-liasa eran enzimas distintas que se regulaban de forma independiente. Sin embargo, Hall y col. [154] y otros grupos [155;156] demostraron que el citocromo CYP17 catalizaba ambas reacciones en un solo sitio activo. Esto fue demostrado mediante la transfección de células no esteroideogénicas con vectores que expresaban el citocromo CYP17 bovino o humano y como resultado, estas células adquirieron ambas actividades. Además, mediante estudios genéticos se determinó la existencia de un solo ARN mensajero para CYP17 idéntico en la glándula adrenal y las gónadas de humanos [157] codificado por un único gen. Por lo tanto, la regulación diferencial de estas actividades, debería residir en algún punto regulatorio río abajo de la expresión de este gen (i.e traducción del ARN mensajero, modificaciones post-traduccionales o estabilidad del mismo).

La deficiencia de la enzima CYP17, **normalmente presente en gónadas y corteza adrenal**, lleva a una producción de cortisol, andrógenos y estrógenos alterada, acompañada de una producción exacerbada de mineralocorticoides [158]. Como consecuencia las mujeres afectadas por esta deficiencia sufren de hipertensión y ausencia de un correcto desarrollo sexual, lo cual les produce amenorrea primaria. Al igual que las mujeres, los hombres también sufren de hipertensión y dependiendo de los casos hay falta de órganos sexuales masculinos externos y esbozos de órganos sexuales femeninos [159].

En un principio se pensaba que esta enzima se encontraba presente exclusivamente en las células esteroideogénicas de roedores y humanos [160]. Más tarde se encontró la presencia de su ARN mensajero, proteína y/o actividad en otros tejidos de la rata como hígado, cerebro, estómago y riñón.

En humanos, la enzima CYP17 también se encontró en glándula adrenal y otros tejidos no gonadales [161].

Para su funcionamiento, esta enzima recibe electrones de NADPH a través de una flavoproteína llamada Oxidoreductasa (OR). Esta proteína es necesaria para ambas actividades de la CYP17 y altas relaciones molares de OR a P450C17, favorecería la actividad de liasa [108;160]. Además de estas enzimas, el citocromo b5 aumentaría selectivamente la reacción de 17,20 liasa y serviría como proteína alternativa en la

transferencia de electrones, tomando la función de OR en determinadas circunstancias [162;163].

### **CYP17 en el ovario**

En el ovario la expresión de esta enzima esta restringida a la capa de células de la teca y células intersticiales, estando ausente en células de la granulosa de los folículos ováricos. Gracias a la presencia exclusiva de esta enzima, las células de la teca se transforman en el único tipo celular en el folículo productor de andrógenos y además, se considera a la CYP17 un marcador de este tipo celular [164]. La expresión de la CYP17 es importante en folículos antrales y folículos preovulatorios donde ha sido encontrada su expresión en mayor grado. Tanto en roedor como en humano, la expresión de esta enzima es baja en células luteales [165]. Tanto la enzima como el ARN mensajero de la CYP17 poseen una expresión baja en folículos antrales tempranos, la cual aumenta hasta cuatro veces en folículos preovulatorios y disminuye a menos de un 10% luego del aumento de LH preovulatorio [142].

En cuanto a la regulación de esta enzima, Stouffer y col. [166] han demostrado en monos macacos que la expresión del ARN mensajero de la CYP17 es alta antes de la inyección de Gonadotropina coriónica humana (hCG) y declina de forma tiempo-dependiente luego de la administración de la misma. Esta disminución en la expresión del ARN mensajero de la CYP17 fue acompañada por una disminución intrafolicular de androstenediona y dehidroepiandrostenediona, evidenciando una disminución también en la actividad de la enzima. Hay numerosos estudios previos a este trabajo que demuestran la disminución de la CYP17 luego del estímulo ovulatorio en distintos animales como bovino [167;168], porcino, hámster y rata [169;170]. También se ha observado que tanto los progestágenos como los estrógenos inhiben la actividad de la enzima [171], pero aún no está claro si esta regulación por parte de los esteroides sería en parte responsable de la inhibición que se observa durante el período peri-ovulatorio.

Se ha demostrado que en ovario de rata, la expresión de CYP17 está claramente regulada por LH [142;148]. En estos mismo trabajos observan que las células necesitan estar en presencia de LH durante aproximadamente 20 horas para observar una estimulación de la expresión de esta enzima por acción de LH [148]. Existen numerosos trabajos que demuestran una dependencia aguda de la expresión de la CYP17 tecal por AMPc en humanos, bovinos, ratas y cerdos [142;167;172-175]. Otro regulador de la

expresión de esta enzima, es el IGF-1 o factor de crecimiento similar a insulina. En células de rata teca-intersticiales, IGF-1 no posee efecto en ausencia de LH o hCG, pero en presencia de estas hormonas estimula el ARN mensajero de la CYP17 [44]. Además de estos factores, el GDF-9 o Factor de diferenciación del crecimiento, estimula el contenido de CYP17 en ovario de rata, así como también su tinción en células de la teca [176]. Por el contrario, el factor TGF- $\beta$  o Factor de crecimiento transformante inhibe la expresión de esta enzima en células de la teca humanas y de rata. Además, otros factores, como activina, inhibina y prostaglandinas, contribuyen a la regulación de la enzima CYP17 [168].

### **Hipótesis dos células-dos gonadotrofinas**

Como hemos mencionado anteriormente la síntesis de estrógenos requiere la cooperación entre las células de la granulosa y las células tecaes vecinas y la participación de ambas gonadotrofinas (FSH y LH).

Las células de la granulosa inmaduras poseen receptores de FSH que estimula la aromataza, pero no poseen receptores de LH. Estos últimos son estimulados por FSH, de manera que sí se encuentran presentes en células de la granulosa de folículos maduros. El otro componente celular involucrado, las células tecaes, poseen receptores de LH que estimulan la síntesis de andrógenos, pero no poseen receptores de FSH [113].

Si bien las células teco-intersticiales son la fuente de andrógenos C19, las células de la granulosa constituyen el sitio primario de aromatización (*Figura 11*). En concordancia, células de la granulosa aisladas demuestran que la FSH, pero no la LH, estimula la síntesis de estrógenos ante un adecuado sustrato de andrógenos capaces de ser aromatizados en estas células. Por el contrario, células tecaes aisladas no producen cantidades significativas de estrógenos en ninguna circunstancia experimental. En resumen, los andrógenos, principalmente la androstenediona, estimulados por LH en las células de la teca [177;178] difunden a través de la membrana basal a las células de la granulosa donde son el principal sustrato para la síntesis estrogénica estimuladas por FSH [48] (*Figura 11*).



ovulación [179;180]. En el modelo de ratón knock out para el receptor de esta hormona no se observa ovulación, aunque si se da el proceso de luteinización requerido para la formación del cuerpo lúteo [181;182].

Los receptores de esta hormona han sido localizados en las células tecaes de folículos antrales pequeños y en células de la granulosa de folículos preovulatorios expuestos previamente a LH/hCG [183;184]. En cuanto a sus efectos, la progesterona aumenta la actividad de enzimas esteroideogénicas en células de la granulosa tratadas con gonadotropinas, así como también su misma síntesis [185]. En particular en las células de la granulosa, la progesterona aumenta la respuesta a FSH [186]. Además inhibe: la síntesis de estradiol estimulada por FSH [186;187], la transición de los folículos primordiales al estadio de primarios [188] y la mitosis estimulada por insulina [189;190].

La progesterona, también, cumple una importante función durante la lactancia. El crecimiento de la glándula mamaria ocurre hacia el final de la gestación cuando los niveles plasmáticos de progesterona son elevados y los de estrógenos se encuentran en aumento. Se observó que la progesterona, entre otras hormonas, estimula la formación del alveolo en la glándula mamaria [191].

En el cuerpo lúteo de roedores, no se ha detectado la expresión del receptor clásico de progesterona y se ha demostrado que esta posee una alta afinidad por los receptores de glucocorticoides [192;193]. Además, recientemente se han identificado receptores de membrana de progesterona en CL de rata [194] los cuales se unen con alta afinidad y especificidad a la progesterona.

Por el contrario, en cuerpo lúteo de primates se detectaron ambas isoformas del receptor clásico de progesterona (A y B) [184;195;196].

### **Andrógenos**

Dado que los andrógenos se aromatizan a estrógenos, es difícil discernir si los efectos observados, se deben a acciones de los andrógenos *per se*, o estos efectos son producidos por los estrógenos. Los receptores de andrógenos se encuentran en células de la granulosa, estromales, tecaes humanas [197] y más recientemente se ha observado en oocitos de ratas, cerdos, y ratón [198;199]. En primates, su expresión es elevada en granulosa de folículos preantrales y antrales [200;201] en la rata se encuentra en

foliculos antrales tempranos y antrales pequeños [202;203] y en humanos está presente en foliculos secundarios y dominantes [197].

Respecto a los efectos de los andrógenos, los mismos parecen estimular el crecimiento folicular en estadios tempranos de la foliculogénesis. Esto se ha observado en foliculos antrales de ratón [204], en ovejas preñadas y en primates a los cuales se les administra andrógenos. En estas especies se ha observado un aumento del número de foliculos preantrales y antrales pequeños acompañados de hipertrofia de células de la teca [205]. También se observó en células de la granulosa porcinas que los andrógenos potencian la acción de factores como el GDF9 *in vitro* [206].

A pesar de los efectos que favorecen el desarrollo folicular que hemos nombrado, los andrógenos también poseen efectos adversos sobre la foliculogénesis. En la rata, los andrógenos alteran el desarrollo folicular a través de un aumento de la atresia [207-209]. En el ratón se observó que una inyección de dihidrotestosterona disminuye el número de foliculos antrales disminuyendo la fertilidad en el mismo [210]. También se observó una inhibición del receptor de LH estimulado por FSH en células de la granulosa [211;212] y una estimulación de la apoptosis en este tipo celular en la rata [96]. Estos son solo algunos de los efectos de los andrógenos sobre el desarrollo folicular.

### **Estrógenos**

Existen numerosas variantes de los receptores de estrógenos en el ovario. La forma predominante en el ovario es la isoforma  $\beta$  [213-215] y los efectos que nombraremos a continuación serán los que responden a la unión de los estrógenos a este tipo de receptor. En general el estradiol estimula la proliferación de células de la granulosa y modula la acción de FSH sobre las mismas [216]. Además, la administración de estrógenos a ratas hipofisectomizadas estimula la proliferación de células de la granulosa de foliculos antrales pequeños y reduce la atresia [217]. Es interesante destacar que los estrógenos facilitan la diferenciación de células de la granulosa interviniendo en el sistema de receptor de FSH, LH y prolactina ya que estimulan la acumulación de cAMP [218]. Se ha observado que los foliculos antrales que poseen algún impedimento en expresar la enzima aromatasa, se caracterizan por poseer una alta relación andrógenos/estrógenos en el fluido folicular, evento por el cual los foliculos entran en el proceso de atresia [219;220]. Con esto se demuestra la gran importancia que posee esta relación en el correcto desarrollo folicular.

En resumen, el estradiol estimula el crecimiento folicular, disminuye la atresia, induce la expresión, entre otros, de genes específicos como ciclina D2 [221], y aumenta el número de oocitos liberados luego de la inducción de la ovulación.

El modelo murino knock out para este tipo de receptor, posee una tasa de ovulación disminuida y una menor cantidad de células de la granulosa del cúmulus [222].

## **ANGIOGENESIS EN EL OVARIO**

El desarrollo de la vasculatura es fundamental para la diferenciación y la organogénesis durante la embriogénesis. En el adulto, es esencial en el proceso de cicatrización y funciones reproductivas [223-225]. Además, la angiogénesis está asociada a numerosas patologías [225;226]. Por lo tanto, la comprensión de la regulación del desarrollo y reestructuración de los vasos sanguíneos es fundamental para entender la fisiología ovárica. El proceso de neovascularización comprende la formación de nuevos vasos sanguíneos y abarca dos procesos diferentes: *Vacuologénesis* y *Angiogénesis*. La primera hace referencia a la formación *de novo* de vasos sanguíneos y la observamos en mayor medida durante la embriogénesis, mientras que angiogénesis es la formación de capilares nuevos a partir de vasos preexistentes. Este mecanismo se da tanto en condiciones fisiológicas como patológicas y esta dicotomía es evidente en el ovario.

La angiogénesis consiste en tres pasos: 1) la ruptura de la membrana basal de los vasos preexistentes, 2) la migración de las células endoteliales hacia un estímulo angiogénico y 3) la proliferación de las células endoteliales para la formación del nuevo vaso [227;228].

Estos procesos requieren de la coordinación de numerosos factores específicos del endotelio vascular como factores de crecimiento, citoquinas y además de influencias del ambiente como la hipoxia. Cualquier variación en la organización de estos factores, afecta la fisiología ovárica.

En el ovario la angiogénesis posee un rol fundamental en la folículoogénesis, ovulación y formación y función del cuerpo lúteo. Los tejidos reproductivos sufren gran cantidad de procesos angiogénicos acoplados a la evolución cíclica e involución de las distintas estructuras. Ya hemos descripto como en el ovario la ciclicidad es gobernada por la secreción de gonadotropinas llevando a la secreción de esteroides gonadales. Por lo tanto, esto implicaría que la periódica angiogénesis en el sistema reproductivo esté

coordinada por gonadotropinas y/o esteroides. Esto haría que la expresión de factores angiogénicos en el ovario, sea hormono-dependientes.

Tanto los folículos como el cuerpo lúteo producen factores angiogénicos entre los que podemos nombrar a los que pertenecen a la familia del factor de crecimiento fibroblástico (*FGF*), el factor de crecimiento vascular endotelial (*VEGF*) y recientemente se ha identificado otra familia de proteínas denominadas angiopoyetinas (*ANGPTs*) [229].

## **VEGF**

En trabajos realizados en los últimos años se ha demostrado el rol fundamental del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en la regulación tanto normal como patológica de la angiogénesis [230]. Este factor es importante en la supervivencia del endotelio, estimula la mitosis en el mismo [231] y posee un rol fundamental en el mantenimiento y aumento de la permeabilidad de los capilares [228]. El hecho de que la pérdida de un solo alelo de este factor lleve a la muerte embrionaria, nos señala su característica de ser un factor irremplazable en el desarrollo y diferenciación del sistema vascular.

En los humanos existen cinco formas moleculares diferentes de distintas cantidades de aminoácidos: 121 (VEGF<sub>121</sub>), 145 (VEGF<sub>145</sub>), 165 (VEGF<sub>165</sub>), 189 (VEGF<sub>189</sub>), 206 (VEGF<sub>206</sub>). En cambio en murinos existen tres isoformas: VEGF<sub>120</sub>, VEGF<sub>164</sub>, VEGF<sub>188</sub>. En el humano las especies VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub> son proteínas de secreción, solubles, mientras que las restantes son proteínas de membrana. Cabe destacar que la familia de proteínas de VEGF comprende varios miembros entre los cuales se encuentra: VEGF-A, el factor de crecimiento placentario (PlGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y dos proteínas similares al VEGF [231]. Las formas moleculares nombradas pertenecen a la isoforma A (VEGF-A) y la forma molecular preponderante en el ovario es VEGF<sub>165</sub> [232].

Como ya hemos nombrado, VEGF es un importante mitógeno de las células endoteliales, induciendo en estas la proliferación, la migración y la formación de estructuras tubulares [233;234]. Para que se lleven a cabo estas acciones, el VEGF induce la expresión de proteínas como por ejemplo, el activador de plasminógeno (PA) y colagenasas, las cuales poseen actividad degradante facilitando la migración de las células endoteliales [231;235]. Este factor secretado por las células que rodean al

endotelio vascular, actúa de forma paracrina modulando las actividades del endotelio vascular adyacente. Además el VEGF induce la formación de fenestraciones en las células endoteliales de pequeñas venas y capilares aumentando la permeabilidad, paso crucial para la angiogénesis [236].

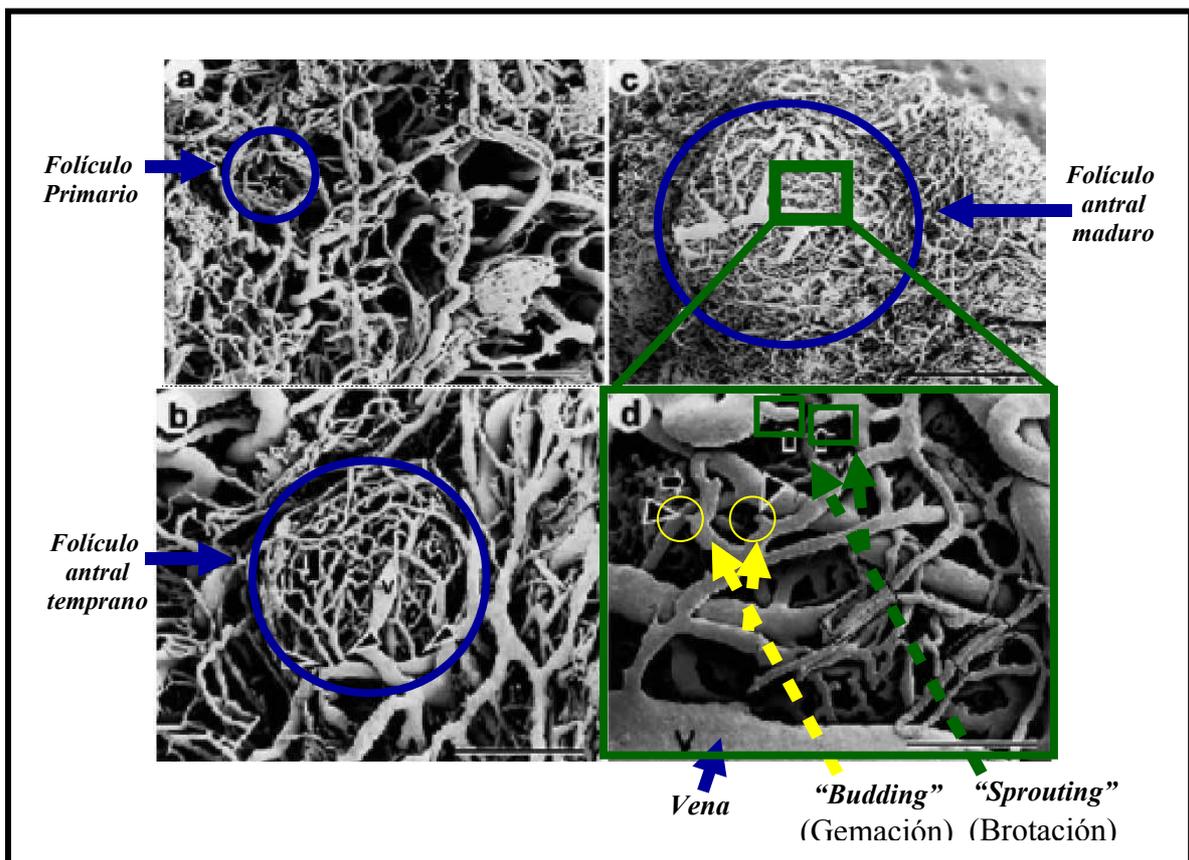
## **VEGF EN LA FOLICULOGENESIS**

La angiogénesis folicular se inicia durante la foliculogénesis temprana y el proceso continúa durante todo el crecimiento folicular. La expresión y regulación de VEGF en los folículos ováricos depende del tamaño folicular. Los folículos preantrales no poseen vasculatura y el mismo es adquirido cuando comienza a formarse el antro folicular. Al principio las células de la teca adquieren esta red vascular, mientras que las células de la granulosa permanecen avascular, y una vez que la capa tecal se encuentra completamente establecida, se terminan de formar dos redes vasculares que se localizan en la teca interna y externa. En esta capa celular, los vasos sanguíneos aumentan en número y tamaño a medida que el folículo crece pero no atraviezan la membrana basal que separa la capa tecal de la capa de granulosa (*Figura 12*). De esta forma la capa de células de la teca representa la primera fuente de nutrientes y gases tanto para las células de la granulosa como para las células germinales. Este aumento de la vasculatura de los folículos asegura el suministro de gonadotropinas a los mismos y por lo tanto se encontraría involucrado en la selección del folículo preovulatorio (*Figura 12*) [237].

Una vez producida la ovulación, es tal el desarrollo vascular que observamos en la formación del cuerpo lúteo que podríamos compararla con la angiogénesis que se observa en tumores [238]. La regresión de capilares y disminución de la vasculatura, se encuentra involucrada tanto en el desarrollo folicular, como en la luteólisis. Es así que los folículos cuyos capilares degeneran por algún motivo, no pueden continuar su desarrollo y entran en el proceso de atresia. También durante la regresión luteal junto a los cambios funcionales y estructurales que observamos, la vasculatura degenera junto a las células esteroideogénicas.

En los ovarios de organismos que se encuentran en edad reproductiva, no encontramos expresión de la proteína VEGF en el folículo primordial o en el folículo primario. En cambio, VEGF se expresa en el citoplasma de las células de la granulosa y las células tecales de los folículos antrales y preovulatorios, siendo la intensidad de esta proteína menor en las células de la granulosa comparada a las células tecales internas en

los folículos que se encuentran en desarrollo [239;240]. Esto sugiere que la secreción paracrina de VEGF sería esencial para la angiogénesis folicular. En el cuerpo lúteo, VEGF se expresa en ambos tipos celulares, granulosa y tecales luteínicas y como es esperable, esta proteína no se encuentra en folículos atrésicos o en cuerpos lúteos en regresión [241;242].



**Figura 12: Angiogenesis folicular.** Desarrollo de la vasculatura durante el desarrollo folicular [243].

### Regulación de VEGF

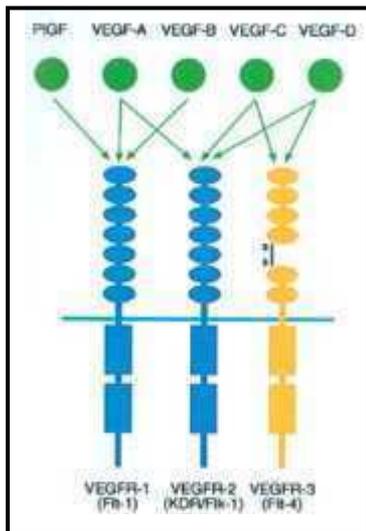
La expresión del mensajero y/o de la proteína de VEGF es estimulada por LH en células de la granulosa de numerosas especies y la exposición a elevados niveles de gonadotropinas aumenta no solo su expresión, sino también la de sus receptores tanto en folículos de porcinos como de rata [244-246]. Además, se demostró en células humanas granulosa-luteínicas que FSH, PGE2, AMP cíclico, y un activador de la proteína quinasa C, estimulan el ARN mensajero de VEGF [247], pero la hipoxia es la principal inductora del factor VEGF [232].

VEGF también se encuentra regulado por esteroides como los estrógenos. Mueller y col. [248] han demostrado la acción directa de los estrógenos sobre este gen sugiriendo el rol de estos esteroides en la regulación de VEGF durante la foliculogénesis.

### **Receptores de VEGF**

Los efectos de VEGF están mediados por al menos tres tipos de receptores pertenecientes a la familia de receptores tirosin-quinasa descritos principalmente en las células endoteliales, 1) *Flt-1 o VEGFR-1*; 2) *Flk-1 o KDR o VEGFR-2*; 3) *Flt-4 o VEGFR-3* (Figura 13). La angiogénesis es estimulada por el receptor KDR, mientras el receptor Flt-1 parecería tener un rol más tardío en este proceso [231]. Numerosos estudios señalan que ambos tipos de receptores poseen diferentes caminos de transducción de señales y por lo tanto difieren en la respuesta biológica desencadenada tras su activación [249].

Aparentemente la activación del receptor KDR mediaría la proliferación de las células endoteliales y la supervivencia y permeabilidad vascular, mientras Flt-1 poseería un rol inhibitorio secuestrando el factor de VEGF y de esta forma impediría su interacción con el receptor KDR [250]. Estos receptores se encuentran en las células endoteliales ubicadas entre las células estromales y en las que conforman la red capilar alrededor de las células tecaes de los folículos en crecimiento. Por esta razón, el endotelio parece ser el primer sitio de acción del VEGF [251]. Hasta donde se conoce, en la rata el ARN mensajero del receptor KDR se expresa en el endotelio de folículos preantrales y antrales tempranos y la proteína del mismo se encuentra en células de la granulosa, tecaes y endoteliales de folículos preovulatorios y en células del cuerpo lúteo [18;240].



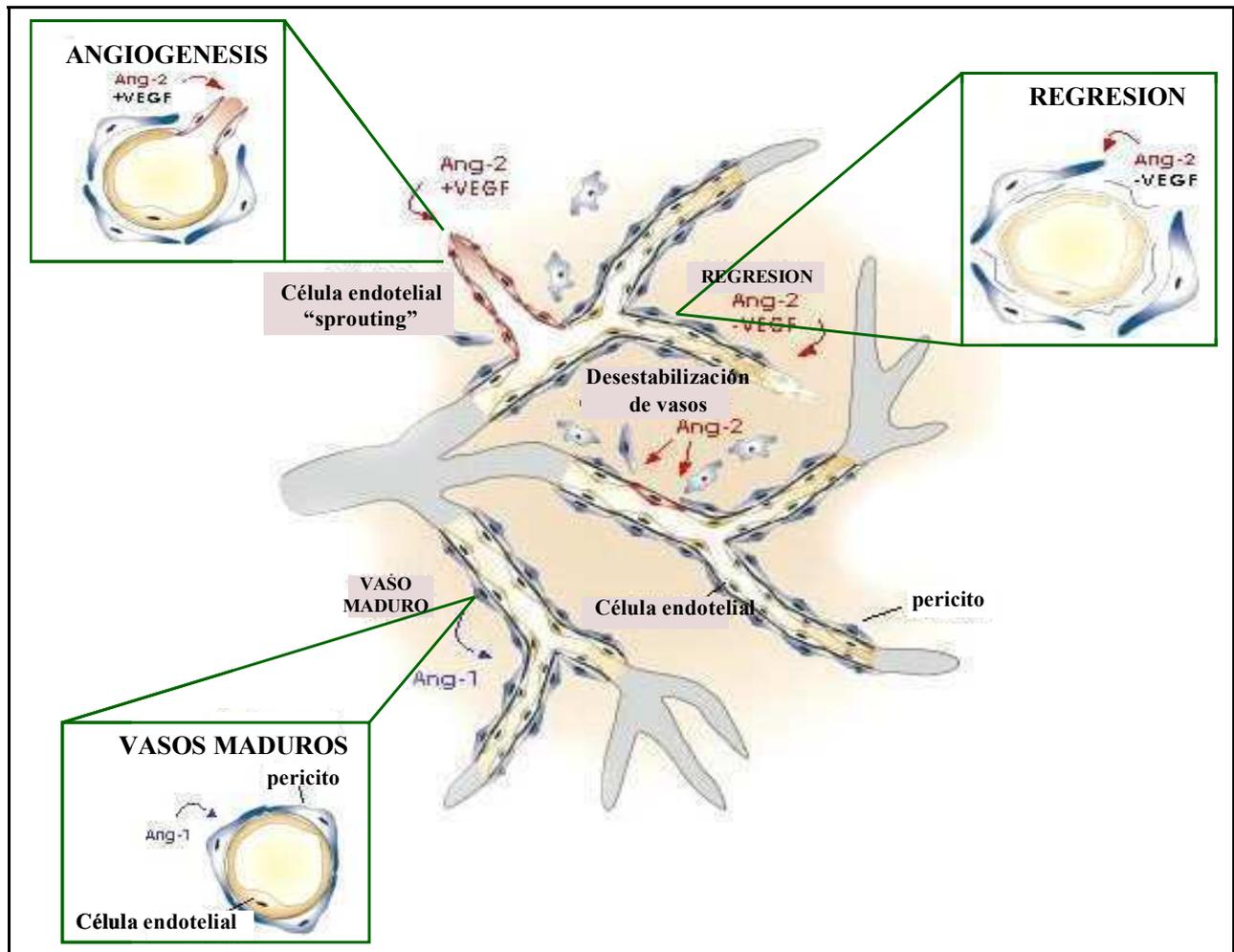
**Figura 13: Diferentes isoformas de VEGF y sus receptores.** Tomado y Modificado de Yancopoulos y col, 2002 [252].

## ANGIOPOIETINAS

Como hemos nombrado anteriormente, las angiopoietinas pertenecen a una familia recientemente identificada de factores angiogénicos. Estas actúan de forma coordinada y complementaria con VEGF-A principalmente durante los estadios tardíos de la angiogénesis. En ratón se han descrito 3 angiopoietinas (Angpt1, Angpt2 y Angpt3), mientras que en humanos, ha sido identificado, un cuarto tipo de angiopoietina (ANGPT4) [227;253]. De esta familia, la angiopoietina 1 y 2 son las más estudiadas hasta el momento y, funcionalmente la ANGPT2 parece ser un antagonista natural de la ANGPT1. Mientras la Angpt1 se expresa en una gran variedad de tejidos, la Angpt2 se encuentra principalmente en el tracto reproductivo femenino, placenta, ovario y útero [254].

Contrariamente a lo que hemos descrito para el factor VEGF, Angpt1 posee poca capacidad de inducir la mitosis en las células endoteliales, sugiriendo que esta proteína no poseería las clásicas funciones de los otros factores angiogénicos, si no que actuaría de forma coordinada con VEGF-A en la maduración endotelial y la estabilización vascular de los vasos (*Figura 14*) [254]. Si bien estas proteínas no son factores mitogénicos, cumplen un rol esencial en el proceso de angiogénesis. La **Angpt2** desestabiliza los vasos preexistentes, y estos como consecuencia pierden la matriz celular que los contiene, de esta forma facilita la entrada de factores angiogénicos como el VEGF para la estimulación de la proliferación de las células endoteliales y su migración. Por su parte, la **Angpt1** recluta células periendoteliales

promoviendo la maduración de los vasos y manteniendo su integridad (Figura 14) [227;253].



**Figura 14:** Actuación de VEGF, ANGPT-1 y 2 en la formación, estabilización y regresión de vasos sanguíneos.

### ANGIOPOIETINAS EN LA FOLICULOGENESIS

Es poco lo que sabemos acerca de las angiopietinas en el ovario.

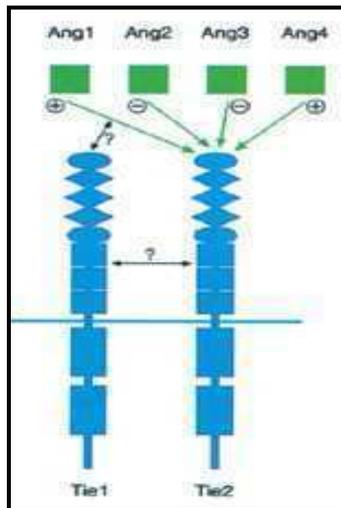
La Angpt1 se encuentra asociada a los vasos sanguíneos y su expresión es simultánea a la vasculogénesis del cuerpo lúteo. Esto concuerda con la hipótesis de que esta angiopietina tendría una función más tardía en la angiogénesis que VEGF. Además, en el ovario de ratón, el ARN mensajero de esta proteína está presente en la capa de células tecales de los folículos preovulatorios y luego en las células del cuerpo lúteo que derivan de la granulosa [227].

Por otro lado, la *Angpt2* se encuentra en los folículos preovulatorios asociada a los vasos sanguíneos en la teca interna y luego se expresa en células de la granulosa, siendo también su expresión abundante en el cuerpo lúteo en el estadio de formación temprana del mismo [227]. En esta fase colaboraría con VEGF en la invasión de los vasos durante la luteogénesis. También es interesante destacar que el ARN mensajero de la *Angpt2* se expresa uniformemente en gran cantidad en los folículos atrésicos donde no encontramos VEGF, especialmente en las células de la granulosa. Por lo tanto, con los datos que poseemos hasta el momento, ANGPT2 tendría distintos roles según la presencia o ausencia de VEGF: en presencia de VEGF, la ANGPT2 promovería el desarrollo de vasos bloqueando la acción de ANGPT1, en cambio, en ausencia de VEGF, contribuiría a la regresión de los vasos sanguíneos inhibiendo la acción de angpt-1 [255]. En resumen, mientras ANGPT1 estabiliza los vasos sanguíneos, la ANGPT2 bloquea esta acción permitiendo a los vasos a permanecer en un estado más plástico donde serían más sensibles a las señales estimuladoras del VEGF-A [254].

### **Receptores de angiopietinas**

Estas proteínas se unen a dos receptores del tipo tirosin-quinasa, *Tie-1* y *Tie-2*, diferentes a los receptores de VEGF (*Figura 15*). Específicamente, ANGPT1 se une y activa al receptor Tie-2, en el cual induce la fosforilización, mientras la ANGPT2 posee la misma afinidad por este receptor, pero no logra activarlo y el mismo no se fosforila según observaciones realizadas en experimentos realizados *in vitro* [18]. Más aún, altas concentraciones de ANGPT2 bloquean la acción de ANGPT1, razón por la cual, hemos dicho anteriormente que esta proteína representaría un antagonista natural de ANGPT1/Tie-2.

Existen pocos datos acerca de estos receptores. Se sabe que en primates no humanos como marmoset, la expresión de Tie-2 se observa en las células endoteliales en los folículos terciarios [227;256]. Además, este receptor ha sido localizado también en células de la granulosa de folículos primordiales, disminuyendo su nivel en los folículos secundarios con expresión limitada a las células del cúmulus en los folículos terciarios [256].



**Figura 15: Angiopoietinas y sus receptores.** Tomado y Modificado de Yancopoulos y col, 2002 [252].

Las angiopoietinas poseen diferente regulación que el factor VEGF. La hipoxia o VEGF no inducen a la proteína ANGPT1 o al receptor Tie-2 [257], mientras que los factores PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), EGF (factor de crecimiento epidermal) y TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante) inhiben la expresión del ARN mensajero de Angpt1.

Los mecanismos de regulación de ANGPT2 también difieren respecto de los que regulan ANGPT1. En las células endoteliales la ANGPT1, ANGPT2, y TGF- $\beta$  disminuyen la expresión del ARN mensajero de la Angpt2. Sin embargo, a diferencia de la Angiopoietina1, y de forma similar a VEGF, la hipoxia aumenta los niveles del ARN mensajero de Angpt2 [18].

Cabe destacar que existen otros factores reguladores de este proceso angiogénico pero que hasta el momento parecen poseer menor importancia que los citados en este trabajo. Sin embargo, recientemente se ha descrito otro factor que actuaría en coordinación con el VEGF, ANGPT1 y ANGPT2, denominado **EG-VEGF** (factor de crecimiento del endotelio vascular derivado de glándula endócrina) [258].

*Estos factores, como hemos descrito, son regulados por gonadotrofinas, esteroides gonadales y factores producidos de forma local a través de mecanismos endocrinos, paracrinos o autocrinos, y actúan de una forma coordinada durante la angiogénesis ovárica. Como tantos otros procesos, cualquier falla en la integración de uno o más de estos factores, afectaría de forma adversa al desarrollo folicular, la ovulación, el funcionamiento del cuerpo lúteo y generaría situaciones patológicas en el ovario.*

## **HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROFINAS (GnRH)**

La dilucidación de la estructura de la *Hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH)* data de 1971 [259]. Esta hormona ha sido encontrada en varias especies y actualmente han sido identificadas 13 formas distintas [260]. En particular, GnRH-I, única isoforma expresada en cerebro de primate, cumple una función radical en la reproducción en mamíferos. También ha sido identificada otra isoforma, GnRH-II, la cual se encuentra expresada en altos niveles en otros órganos, sugiriendo otras funciones además de la conocida en la regulación neuroendocrina [21].

Este neuropéptido es sintetizado y liberado por las células neurosecretoras del hipotálamo, más específicamente en el núcleo arcuato en el hipotálamo medio basal. Este recibe factores estimuladores como Epinefrina y Norepinefrina (que aumentan su secreción) ó factores inhibidores como dopamina, serotonina y opioides endógenos (que disminuyen su secreción).

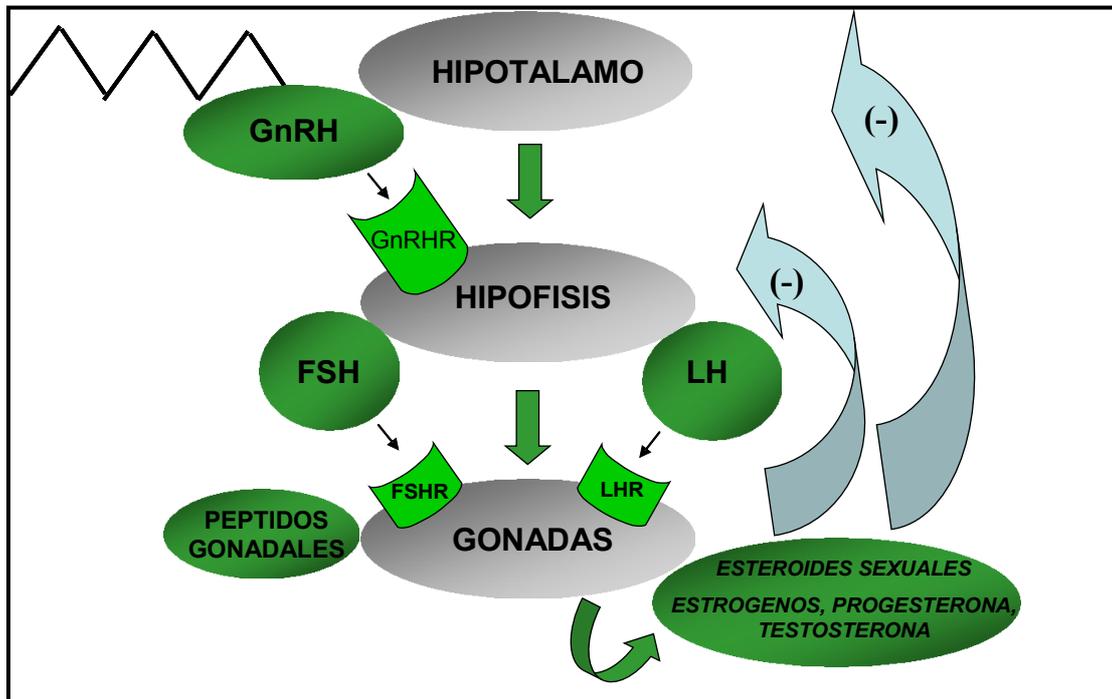
### **Regulación neuroendócrina del ovario ejercida por GnRH**

La liberación de GnRH desde el hipotálamo se da de forma pulsátil y es volcada al sistema circulatorio portal hipotálamo-hipofisario para luego ser transportada a la hipófisis anterior. Este modo de secreción se observa en todas las especies de mamíferos y existe una sincronía notable entre los pulsos de GnRH en sangre portal y los pulsos de LH en sangre periférica [261-263]. ***Por lo tanto, el control de secreción de GnRH desde las terminaciones nerviosas representa el controlador clave de la secreción de gonadotrofinas hipofisarias y por ende de todo el proceso reproductivo.***

La acción estimuladora de la secreción de gonadotrofinas es ejercida mediante la unión y activación de este péptido (GnRH-I) a su receptor en células gonadotropas de la hipófisis. De esta forma, GnRH-I estimula la síntesis y secreción de la Hormona Folículo Estimulante (FSH) y de la Hormona Luteinizante (LH), las cuales promueven la síntesis de esteroides y la gametogénesis gonadal en ambos sexos.

Este sistema *hipotalámico-hipofisario* coordina el proceso que destina a un folículo a ser ovulado mediante el control del ciclo menstrual en la mujer y estral en la rata.

En resumen, GnRH regula la síntesis, el almacenamiento de las gonadotropinas y la activación o movimiento de los pools de reserva de gonadotropinas para su secreción.



**Figura 16: Eje Hipotálamo-Hipófiso-Gonadal y GnRH.** La secreción de GnRH desde el hipotálamo ocurre de forma pulsátil controlando la síntesis y secreción de las gonadotropinas. Tomado y Modificado de Glode y col. [264]

### GnRH en el ovario

Ambas isoformas de GnRH anteriormente nombradas, GnRH-I y GnRH-II, fueron localizadas en varios compartimentos del ovario humano y se encuentran reguladas por esteroides gonadales y gonadotropinas.

En estudios realizados utilizando la técnica de hibridación *in situ*, se ha localizado el ARN mensajero de GnRH-I en células humanas de la granulosa de folículos ováricos primarios, secundarios y terciarios [260;265;266]. Transcritos pertenecientes a estas isoformas fueron detectados principalmente en células de la granulosa luteinizadas, en células ováricas epiteliales, así como también, en carcinomas ováricos [267-271]. Al igual que GnRH fue encontrado en tejido ovárico, han sido detectados receptores para GnRH. Hasta la actualidad han sido identificados dos tipos de receptores en mamíferos, receptores Tipo I y receptores Tipo II. La secuencia

nucleotídica de estos receptores, demostraron ser idénticas a las secuencias de los receptores que se expresan en los gonadotropos [253;272].

Los receptores para GnRH en el ovario, fueron caracterizados en células de la teca interna, granulosa y cuerpo lúteo de numerosas especies [266;273;274], como también receptores de alta afinidad en células de la granulosa y luteales de rata [275].

En ovario de rata, solo han sido identificados hasta el momento proteínas similares a GnRH [276], transcriptos del receptor de GnRH [266;277] y mediante la técnica de hibridación *in situ*, el ARN mensajero de GnRH ha sido localizado en células de la granulosa de rata [265].

En humanos, en cambio, Choi J.H., y colaboradores [278] han descrito la localización a nivel proteico de los factores GnRH-I, GnRH-II y el receptor de GnRH (GnRHR, que se une a ambas formas de GnRH), en ovarios de mujeres premenopáusicas. Estas proteínas no se encontraron en los estadios foliculares que abarcan desde folículos primordiales hasta antrales tempranos inclusive. En cambio, fueron localizados en las células de la granulosa de folículos preovulatorios de forma predominante. En el cuerpo lúteo, se detectaron principalmente en células luteales derivadas de células de la granulosa.

### **Señalización del receptor de GnRH en el ovario**

Los estudios realizados acerca del mecanismo de transducción de señales que se dispara tras la activación del receptor de GnRH-I demuestran que el mismo es un receptor de los denominados *acoplados a proteínas G* y que tras su activación, estimula múltiples clases de estas proteínas, tanto en células de la hipófisis como en los distintos tipos celulares del ovario. Esto sugeriría la activación de distintos caminos intracelulares y la ejecución de efectos específicos según el tipo celular o según el tejido. A esto se atribuiría, en mayor medida, la variedad de respuestas y efectos controversiales que se observan en los estudios que serán descritos más adelante.

Respecto al mecanismo de acción de este péptido en el ovario, ha sido demostrada su asociación a proteína G con la consecuente activación de fosfolipasa C (PLC), formación de mono, bis y tris-fosfatos (InsP, InsP<sub>2</sub>, InsP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). Los inositoles trifosfatos (InsP<sub>3</sub>) actúan con receptores específicos en el retículo endoplasmático induciendo un aumento rápido en la concentraciones de calcio

intracelular. Por su lado, el DAG activa la proteína quinasa C (PKC) la cual estimula una serie de proteínas denominadas *proteínas quinasas activadoras de mitogénesis* (MAPK) involucradas en proliferación y diferenciación celular. También se han observado acciones a través de las proteínas fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) y fosfolipasa D (PLD) [279;280] estimulando el metabolismo del ácido araquidónico [281;282]

La relación entre el metabolismo de los fosfoinositoles activado por GnRH y la síntesis de esteroides en células de la granulosa ha sido demostrada utilizando tanto agonistas de GnRH como antagonistas del mismo. Se ha observado que la acción de GnRH sobre la esteroidogénesis es mimetizada utilizando activadores de la PKC o ionóforos de calcio [283]. También los productos del ácido araquidónico han demostrado estar involucrados en la mediación de los efectos que GnRH tiene sobre la producción de progesterona en células de la granulosa [284;285].

La naturaleza de la señalización a través de proteínas G iniciadas por el receptor de GnRH depende, en gran medida, del contexto celular. Un ejemplo es el hecho de que el receptor humano de GnRH expresado en células ováricas de hámster y en una línea celular, COS-7, se acopla a la proteína G<sub>αq/11</sub> [286]. Por el contrario, este mismo receptor se acopla selectivamente a la proteína G<sub>αi</sub> en algunos tumores del tracto reproductivo y sus líneas celulares derivadas [287-289] contrariamente a lo observado en células de hámster o la línea celular COS-7.

***En síntesis, la ejecución de efectos específicos según el tipo celular o según el tejido y además, la variedad de respuestas que se observan debido a la acción de GnRH, se debería a la activación de distintos caminos intracelulares por unión de esta hormona a su receptor.***

### **Regulación de GnRH y sus receptores en el ovario**

Existen numerosos trabajos que resumen la regulación de GnRH y sus receptores en tejido ovárico.

La expresión del *receptor de GnRH-I (GnRHR)* ha sido demostrada en varios tipos celulares del ovario humano [268-270;290;291]. Además, estudios cuantitativos de los ARN mensajeros evidenciaron que los niveles de estos son mucho menores en el ovario que en la hipófisis de primates [291;292].

Es muy interesante observar que la expresión génica de los receptores de GnRH en el ovario depende del grado de desarrollo folicular y del estadio estral en el caso del roedor. La expresión es mayor en folículos de Graff y folículos atrésicos, siendo esta

menor en folículos preantrales, antrales pequeños y cuerpo lúteo [277]. En folículos atrésicos la expresión aumenta en el día del proestro de forma coincidente con el pico de LH preovulatorio y estos niveles se mantienen elevados a lo largo del pico preovulatorio seguidos de una disminución en el metaestro. [277].

En cuanto a la regulación de su expresión, hay numerosas evidencias de la regulación ejercida por los ligandos GnRH-I y II. En células granulosa luteínicas, la administración de GnRH-I y II ejerce una regulación diferencial sobre la expresión de GnRHR. Luego del tratamiento con GnRH-I, se observa un cambio bifásico en los niveles del receptor de GnRH-I dependiendo de la dosis utilizada, contrariamente a la represión observada al tratar las células con GnRH-II independientemente de la concentración del mismo [271].

En particular, en células de la granulosa obtenidas de folículos preovulatorios de rata, GnRH induce un aumento, mientras LH disminuye los niveles del ARN mensajero del receptor [277].

*En síntesis, la expresión espacial y temporal del receptor de GnRH en células ováricas a través del ciclo estral, demuestran que esta hormona cumpliría funciones en importantes procesos de la reproducción, como la ovulación, así como también en eventos asociados al desarrollo folicular, como ser el proceso de atresia folicular.*

### **Evidencias de los efectos de GnRH en ovario**

Ha sido ampliamente demostrada la acción antigonadotrófica de GnRH-I en el ovario de rata en cultivos primarios de células de la granulosa donde se observó una supresión de la esteroidogénesis estimulada por FSH y LH. Este efecto se daría, entre otros, inhibiendo la producción de AMPc estimulada por FSH y consecuentemente la activación de la proteína quinasa [293;294]. En células humanas granulosa luteínicas, el tratamiento con GnRH-I o su agonista, también produce una inhibición de la esteroidogénesis basal y la estimulada por FSH [270;295;296] a través de la inhibición de la enzima aromatasa. Sin embargo, GnRH presenta efectos controversiales como ser

la estimulación de la actividad de aromatasa en el mismo tipo celular pero utilizando concentraciones menores del agonista [270;296-299].

Sridaran y col., demostraron que la administración de un agonista de GnRH-I inhibe la esteroidogénesis luteal en ratas preñadas, a través de la inhibición de la proteína StAR, la proteína similar al receptor de benzodiazepina receptor (PBR) y la enzima P450sc [300]. Además, GnRH inhibe tanto *in vivo* [301] como *in vitro* [113;301-303], la secreción luteal de progesterona inducida por LH/hCG y desensibiliza los receptores de LH en este tipo celular [304].

GnRH también ejerce efectos estimuladores como en células de la granulosa sobre la producción de estrógenos, progesterona,  $20\alpha$ -OH progesterona y prostaglandinas [298;305]. La acción de GnRH estimuladora más consistente, es la inducción de la ovulación en ratas hipofisectomizadas [306].

La respuesta celular a la unión de GnRH a su receptor ovárico, tanto en células de la granulosa como en células luteales, parece ser similar a la observada en células hipofisarias, involucrando el camino de transducción de señales de fosfolipasa C (PLC), movilización de  $Ca^{2+}$ , fosforilación de proteínas y metabolismo de ácido araquidónico. Además, la acción antigonadotrófica de GnRH sobre las células ováricas parece depender y estar mediada por  $Ca^{2+}$  [280].

La exposición prolongada ó continua a GnRH ó a sus agonistas determina una supresión profunda de la liberación de gonadotrofinas conocida como *downregulation* y como consecuencia la inhibe la producción de hormonas sexuales [307]. Se han propuesto dos mecanismos para explicar la acción antigonal de GnRH: uno es el de la desensibilización, que implicaría desacople de la unión hormona-receptor y el otro se refiere a una disminución en el número de receptores disponibles, debida a la internalización de los complejos [308]. También, se ha demostrado que el GnRH y sus agonistas actúan en tejidos extrahipofisarios como placenta, mama y ovario [309-311]. La acción antigonal de los análogos de GnRH ha sido descrita en células de granulosa y cuerpo lúteo de rata [56;312-314], observación que avalaría el hecho de que

los péptidos sintetizados localmente cumplirían una función local, autocrina ó paracrina sobre la función gonadal.

### **La historia de GnRH en nuestro laboratorio**

El primer trabajo realizado en nuestro laboratorio acerca de la acción directa de GnRH sobre la función gonadal fue publicado en el año 1993 [310]. El interés por estudiar este factor originariamente sintetizado y secretado por el hipotálamo, surgió del uso frecuente de análogos de GnRH en protocolos de fertilización *in vitro*. Estos análogos se utilizan con el fin de inhibir la secreción endógena de gonadotrofinas, más precisamente, el pico preovulatorio de LH y así controlar en estas pacientes la ovulación mediante la administración de gonadotrofinas exógenas. De lo contrario, la secreción espontánea de esta hormona induciría la ovulación y llevaría a la cancelación de estos ciclos de estimulación en estos tratamientos. Se observó que cuando se utilizaban estos análogos en los protocolos de hiperestimulación ovárica, se requerían mayores dosis de gonadotropina humana (hMG, Gonadotropina humana de Mujeres post-Menopáusicas) en comparación a aquellas mujeres en las cuales el tratamiento consistía en la aplicación de hMG y clomifeno. En nuestro laboratorio se postuló que la menor respuesta a hMG era debida a una acción inhibitoria de GnRH actuando directamente en el ovario.

En este primer trabajo, se demostró que las altas dosis de agonistas de GnRH necesarias para estimular el ovario, estarían relacionadas a un efecto inhibitorio de este agonista sobre los receptores de LH y la actividad de la enzima aromatasa. Se realizaron cultivos de células granulosa-luteínicas obtenidas de pacientes incluidos en programas de fertilización *in vitro*, y se observó que la expresión de los receptores de LH aumentaba en la células de la granulosa luego de 48 hs de cultivo y que en presencia de Acetato de Leuprolide (LA, análogo de GnRH) (*Figura 17*) se inhibía este aumento. Se concluyó que LA inhibe el reciclado del receptor de LH en estas células. También LA produjo una inhibición en la producción de estradiol por parte de estas células, con un aumento en la producción de progesterona. En el cuerpo lúteo de ratas a las cuales se les administraba LA, también se observó un efecto inhibitorio en cuanto a la producción de progesterona y un aumento en la actividad de la enzima aromatasa [310].

El siguiente trabajo de nuestro laboratorio fue realizado en 1997 [313] y se amplió el estudio del efecto del agonista de GnRH sobre el desarrollo folicular y el proceso de apoptosis (atresia folicular). En este trabajo se observó que en ratas prepúberes estimuladas con gonadotropinas, el tratamiento *in vivo* con LA afectaba la capacidad luteal de síntesis de esteroides y aumentaba la apoptosis en el ovario, interfiriendo con el reclutamiento folicular y el proceso de luteinización.

El próximo paso en esta línea de investigación fue analizar los efectos que LA producía en folículos antrales tempranos, los cuales sufren de apoptosis espontánea luego de 24hs de cultivo en ausencia de hormonas o factores de crecimiento. Interesantemente, en este trabajo se observó que la presencia de LA en los cultivos, era capaz de prevenir la supresión de la apoptosis espontánea de estos folículos ejercida por factores como FSH, FGF o IGF-1, interfiriendo en el mecanismo de acción de estos factores de crecimiento [315].

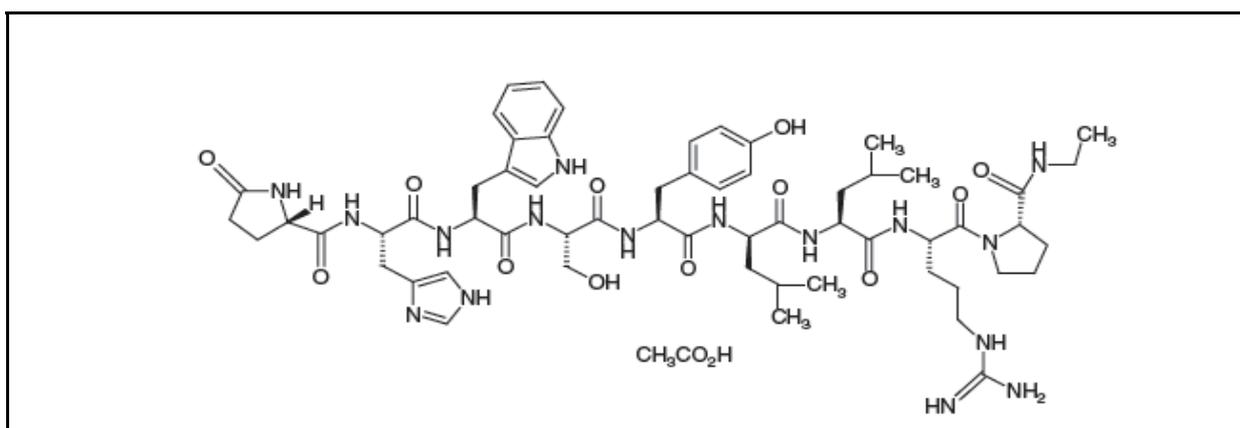
Casi simultáneamente con el trabajo anterior se investigó el efecto *in vivo* de GnRH sobre el desarrollo folicular inducido por gonadotropinas en ratas y se analizaron los posibles mecanismos moleculares involucrados en el proceso inhibitorio ejercido por GnRH [78]. Se observó una inhibición en el desarrollo folicular inducido por gonadotropinas en ratas tratadas *in vivo* con el análogo de GnRH, como también un aumento en el proceso de apoptosis en folículos preantrales y antrales. En cuanto a la apoptosis, fue interesante observar que el tratamiento con GnRH reducía la estabilidad de una proteína inhibidora de la apoptosis, Bcl-xL, y que esta reducción también se vio reflejada en una disminución de la relación Bcl-xL: Bcl-xS (proteína proapoptótica). Es interesante destacar que el desbalance entre ambas proteínas, se correlacionó con la acción apoptótica de GnRH encontrada en este trabajo.

Recientemente [92], el laboratorio publicó otro trabajo analizando fracciones citosólicas y mitocondriales de folículos provenientes de ratas estimuladas con gonadotropinas tratadas *in vivo* con el análogo de GnRH y/o con un antagonista de GnRH, Antide. En principio se observó que LA disminuía el peso del ovario de las ratas, aumentaba el número de folículos preantrales y atrésicos y disminuía el número de folículos antrales tempranos y preovulatorios. Aún más interesante fue observar que la proteína Bax, inductora de la apoptosis, se encontraba predominantemente en la

fracción mitocondrial de las células, mientras el citocromo c, estaba mayoritariamente localizado en el citosol. Este resultado nos demostró que luego del tratamiento con GnRH, la proteína proapoptótica Bax, localizada en el citoplasma de los folículos sanos, se redistribuía yendo hacia la mitocondria y la proteína proapoptótica, citocromo C, se trasladaba de la mitocondria al citoplasma. La administración de antide revirtió los efectos observados por la administración de LA. Se sabe que [316;317] ante un estímulo proapoptótico, la proteína Bax transloca desde el citoplasma a la mitocondria donde, mediante la formación de un poro en la membrana de esta, induce la liberación del citocromo C, favoreciendo el proceso de apoptosis [316;317].

Como hemos descrito, el co-tratamiento con el antagonista de GnRH, Antide, revirtió los efectos observados por la administración de LA sobre los parámetros estudiados en este trabajo. Más aún, en los animales tratados con Antide solamente, se observó que el antagonista posee una acción per sé en el ovario, como por ejemplo, aumento del peso de los ovarios de las ratas y del número de folículos preovulatorios y, una disminución del número de células apoptóticas en folículos antrales tempranos y preovulatorios comparado al grupo de animales que solo había sido tratado con gonadotropinas. Además, el Antide inhibió la movilización de BAX del citoplasma a la mitocondria y retuvo el citocromo C en la mitocondria comparado al tratamiento con gonadotropinas. Estas observaciones fueron sumamente importantes, ya que demuestran que bloqueando el receptor de GnRH, existe un efecto estimulador *in vivo* del desarrollo folicular, sugiriendo la presencia de una proteína endógena ovárica similar a GnRH que poseería un rol inhibitorio de la función ovárica.

GnRH	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly	NH <sub>2</sub>
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Leuprolide	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	DLeu	Leu	Arg	Pro	Gly	NEt



**Figura 17:** Diferencia entre la secuencia aminoacídica de GnRH y LA. Estructura química del Acetato de Leuprolide, LA [318].

*Este breve resumen sintetiza la investigación que se llevó a cabo en el laboratorio respecto de GnRH y su relación con el desarrollo folicular, así como también la forma en la que surgió esta línea de investigación.*

**Hemos descrito hasta aquí los procesos que tienen lugar durante el desarrollo, muerte u ovulación de un folículo ovárico. También hemos nombrado numerosos factores que intervienen en estos procesos, haciendo de esto un mecanismo sumamente complejo compuesto de distintas etapas. Como podemos observar, cada una de estas posee un alto grado de regulación dada por la coordinación, interacción, regulación a nivel de expresión o actividad de múltiples factores.**

*Hasta ahora se conocen, como hemos citado, numerosos efectos de GnRH sobre la función gonadal. Esto se ha observado, in vivo e in vitro, en células foliculares y células luteales. Sin embargo, no existen evidencias hasta el presente de la acción de GnRH y de la forma en que este factor interactúa con la acción de las gonadotrofinas sobre las enzimas y la producción de hormonas esteroideas. Además, tampoco se sabe acerca del efecto de GnRH sobre las proteínas claves que regulan la angiogénesis ovárica.*

# ***HIPOTESIS Y OBJETIVOS***

---

---

## HIPÓTESIS

En este trabajo la hipótesis planteada surgió a partir de las observaciones que hemos descrito en la introducción respecto de GnRH-I y su acción en el ovario. En la misma hemos relatado como comenzamos a investigar la relación entre la Hormona Liberadora de Gonadotrofinas (GnRH) y el desarrollo del folículo ovárico. El interés por estudiar este factor surgió del amplio uso de los análogos de GnRH-I en la clínica, en particular el *Acetato de Leuprolide* o *LA*. Este se utiliza en protocolos de fertilización asistida con el fin de inhibir la secreción de gonadotrofinas endógenas. Como se mencionó, se experimenta una disminución en la respuesta ovárica frente a la administración de gonadotrofinas exógenas. Postulamos al GnRH-I como un factor intraovárico que actuaría de forma local inhibiendo procesos esenciales involucrados en el desarrollo de los folículos ováricos y en la selección del/de los folículos dominantes.

La hipótesis planteada en esta tesis es que el GnRH-I interfiere en los procesos de síntesis y metabolismo de esteroides y en la angiogénesis ovárica. Además nos planteamos la siguiente pregunta: *¿el efecto de GnRH-I sobre estos parámetros lleva al folículo a entrar en el proceso de atresia folicular mediado por apoptosis de las células foliculares?*

## **OBJETIVO GENERAL DEL TRABAJO**

Ante esta hipótesis, el objetivo que nos planteamos en la presente investigación fue examinar el efecto de la administración de un análogo de GnRH-I, Acetato de Leuprolide, LA, sobre la síntesis y metabolismo de esteroides, la angiogénesis y la apoptosis ovárica en ratas prepúberes estimuladas con gonadotrofinas.

### **Objetivos específicos**

Los objetivos específicos de este trabajo sobre la síntesis y metabolismo de los esteroides ováricos fueron los siguientes:

**1.** Estudiar el efecto *in vivo* a distintos tiempos de la administración del análogo de GnRH-I, acetato de leuprolide, LA, a ratas prepúberes estimuladas con PMSG (gonadotropina de yegua preñada), sobre los siguientes parámetros esteroideogénicos:

- a.** el contenido folicular y niveles séricos de Progesterona, Androsterona, Testosterona y Estradiol y el contenido folicular de 20 $\alpha$ -Hidroxiprogesterona
- b.** los niveles séricos de Progesterona
- c.** la expresión génica del ARN mensajero y los niveles proteicos foliculares de la StAR
- d.** la localización celular en el ovario de la proteína StAR
- e.** los niveles proteicos foliculares del citocromo 11A1
- f.** los niveles séricos de Androsterona
- g.** la expresión génica el ARN mensajero y los niveles proteicos foliculares de CYP17

**2.** Estudiar el efecto *in vitro* del tratamiento de folículos ováricos con acetato de leuprolide, LA, sobre los siguientes parámetros esteroideogénicos a distintos intervalos de tiempo (8, 12, 24 y 48 hs):

- a.** el contenido de androsterona folicular

**b.** el nivel de expresión proteica de las enzimas StAR y CYP17

**3.** Analizar el efecto *in vivo* de acetato de leuprolide sobre los siguientes parámetros involucrados en la angiogénesis ovárica:

**a.** los niveles de expresión proteica de las proteínas VEGF y ANGPT-1 y sus receptores Flk-1 y Tie-2

**4.** Analizar el efecto *in vivo* de acetato de leuprolide sobre:

**a.** la actividad, procesamiento y distribución celular de la proteína efectora de la apoptosis caspasa-3

# ***MATERIALES Y METODOS***

---

---

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Animales**

En todos los experimentos que conforman esta tesis se emplearon ratas vírgenes prepúberes (*Rattus norvegicus*, 23-25 días) de la cepa Sprague Dawley, del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME-CONICET). Todos los experimentos y protocolos que se realizaron fueron aprobados por el comité de ética del IByME y llevados a cabo de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorios del NIH (Instituto Nacional de la Salud, USA). Los animales se encontraban en el bioterio en condiciones controladas de temperatura (21-23°C) y con un fotoperíodo de 12 hs luz: 12 hs oscuridad (las luces se encienden a las 7.00 hs y se apagan a las 19.00hs), recibiendo alimento balanceado y agua *ad libitum*.

### **Tratamientos**

#### **Obtención de ratas superovuladas**

A los animales utilizados en los experimentos, se les administró subcutáneamente 25 UI/rata de la gonadotropina PMSG (eCG, Gonadotropina coriónica equina), la cual posee actividad de FSH. Con este tratamiento se induce el múltiple desarrollo y reclutamiento folicular, motivo por el cual denominaremos a estos animales, animales superovulados o hiperestimulados.

Para los experimentos que realizamos sobre la síntesis y metabolismo de los esteroides, los animales recibieron una única dosis de PMSG y fueron sacrificados a distintos tiempos luego de esta inyección a los cuales se realizaron los diferentes ensayos.

En cambio, los animales que fueron utilizados para los ensayos del estudio de la angiogénesis ovárica y los ensayos de apoptosis fueron sacrificados 48 hs luego de recibir también, una única inyección de 25 UI/rata.

#### **Administración de los análogos de GnRH-I, acetato de leuprolide (LA) y antide (ANT)**

Los animales que se utilizaron para el análisis de la *esteroidogénesis*, se dividieron en dos grupos:

- 1) Control (grupo tratado con solución fisiológica)
- 2) LA (grupo tratado con acetato de leuprolide)

El tratamiento se realizó de la siguiente manera: todos los animales recibieron la dosis de PMSG de 25 UI simultáneamente con una dosis de LA de 2µg/rata. Los mismos fueron sacrificados a distintos tiempos luego del tratamiento según se detalla en cada experimento. El rango de tiempos de sacrificio comprende: 0, 2, 4, 8, 12, 24 y 48 hs, estando el tiempo 0 conformado por aquellos animales que no recibieron inyección alguna (animales no estimulados).

Los animales que se utilizaron para el estudio de la *angiogénesis y apoptosis*, se dividieron en cuatro grupos experimentales:

- 1) Control (grupo tratado con solución fisiológica)
- 2) LA (grupo tratado con acetato de leuprolide)
- 3) ANT (grupo tratado con antide, antagonista de GnRH-I)
- 4) LA+ANT (grupo tratado con ambos análogos, LA y ANT)

En este caso, el tratamiento se realizó de la siguiente manera: todos los animales recibieron una única inyección subcutánea de PMSG simultáneamente con la/las inyecciones correspondientes a cada tratamiento, es decir, con solución fisiológica (grupo Control) o con uno o ambos análogos (demás grupos). El tratamiento con el/los análogos se realizó cada 12 hs a las dosis correspondientes durante 48hs, mientras los animales del grupo control recibieron inyecciones de solución fisiológica.

El grupo LA recibió inyecciones subcutáneas de acetato de leuprolide de 0,5 µg/rata (1µg/rata/día) y para el grupo ANT, la dosis fue de 5 µg/rata (10 µg/rata/día). El grupo LA+ANT recibió una inyección de cada uno de los análogos a las dosis indicadas anteriormente.

Los animales fueron sacrificados por decapitación, aspiración de CO<sub>2</sub> o dislocación cervical 3 hs luego de la última inyección (los animales recibieron en total cinco inyecciones).

#### **Extracción de esteroides de suero**

La sangre extraída de las ratas tratadas se dejó 2 hs en cuarto frío para la formación de coágulos, se extrajo el suero y se centrifugó 15 minutos a 1500 rpm. Se agregó 2 ml de éter, se agitó 30 segundos y se colocó 30 minutos a  $-70^{\circ}$  C. Se obtuvo una fase acuosa congelada y el sobrenadante etéreo se trasvasó y evaporó a sequedad. Se repitió la extracción con éter realizada anteriormente sobre la fase acuosa y nuevamente se evaporó a sequedad el sobrenadante. El remanente obtenido luego de la evaporación, se resuspendió en 200  $\mu$ l de buffer RIA (radioinmunoensayo).

### **Aislamiento de folículos antrales o preovulatorios**

Los ovarios de ratas (6 ovarios por tratamiento) pertenecientes a los grupos correspondientes se desgrasaron y los folículos antrales ( $>200$   $\mu$ m de diámetro) y preovulatorios ( $>400$   $\mu$ m de diámetro) se aislaron por microdissección bajo la lupa utilizando agujas finas. Se realizaron 3 pooles foliculares de 100 o 60 folículos cada uno para la realización de RT-PCR, western blot o extracción de esteroides. De la misma forma se procedió cuando los folículos fueron colocados en cultivo para la realización de los experimentos in vitro. Cada experimento se realizó al menos tres veces.

### **Cultivo de folículos**

Luego de realizado el aislamiento de folículos, se incubaron 60 folículos por pocillo en medio libre de suero a  $37^{\circ}$ C en 0,5ml de medio DMEM:F12 (1:1 vol/vol), conteniendo 10 mM HEPES, con el agregado de: fungizona (250  $\mu$ g/ml) y gentamicina (10 mg/ml). Los folículos se gasearon al inicio del cultivo con 95% $O_2$ -5%  $CO_2$  y se incubaron durante 8, 12, 24 y 48 hs con FSH (20 ng/ml) en presencia o ausencia de LA (100 ng/ml) como se describió anteriormente [315;319].

### **Extracción de esteroides foliculares para la realización de RIA**

Los pooles foliculares se homogeneizaron en acetona (1:10, peso/vol) y se centrifugaron a 1600 xg durante 10 min., los sobrenadantes fueron trasvasados a tubos cónicos y se evaporó a sequedad. El remanente se resuspendió en 1 ml de agua destilada y luego se incubaron a  $50^{\circ}$  C 10 min, en agitación. De esta resuspensión se realizaron dos extracciones con éter dietílico (1:2,5 vol/vol) para lo cual se agitaron las muestras durante 2 min. luego del agregado del éter. Las fracciones etéreas se separaron por

congelamiento durante 20 min. a  $-70^{\circ}\text{C}$ , y la fase etérea se trasvasó, se evaporó y resuspendió en 1,4 ml de metanol agregándosele 0,6 ml de agua destilada. Se realizó una nueva partición con n- hexano para lo cual se homogeneizó 2 min. y se descartó la fase superior. Finalmente se agregó a la fase inferior, 2 ml de diclorometano y luego de su homogeneización se descartó la fase superior acuosa dejándose evaporar la inferior. Los residuos se resuspendieron en buffer RIA y fueron conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta realizar las correspondientes mediciones.

### **Radioinmunoensayo (RIA)**

En las mediciones de Progesterona, Testosterona y Estradiol, se utilizó un antisuero provisto por el Laboratorio del Dr. Niswender (Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, Fort Collins, CO) en una dilución apropiada para ligar el 37% del  $^3\text{H}$ -esteroide utilizado como trazador (25 pg, aproximadamente 10.000 cpm). Luego de la incubación de 16 hs a  $4^{\circ}\text{C}$ , se separó la hormona libre de la unida al anticuerpo por medio del agregado de 0,2 ml de una suspensión de carbón 0,5% y dextrano 0,05% en el buffer de ensayo:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  40mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  39,5 mM,  $\text{NaCl}$  155 mM, azida sódica 0,1% y gelatina 1% pH 7,0 (buffer RIA) y posterior centrifugación. Los sobrenadantes completos fueron transferidos a viales de conteo, a los que se les agregó 2ml de solución centellante. La radiactividad se determinó en un contador de centelleo líquido Beckman LS 1801, con una eficiencia del 62%.

En el caso de las mediciones realizadas de androsterona, se utilizó un anticuerpo provisto por el Dr. G. Barbe (Department of Physiology, University of Western Ontario, London, ON, Canada). El procedimiento del ensayo fue similar al descrito para la medición de progesterona, siendo la solución de carbón utilizada en este caso del 0,05% en el mismo buffer de ensayo y se utilizó de la misma un volumen de 2ml para cada muestra. Bajo estas condiciones las variaciones intra- e inter-ensayo fueron de 8,0% y 14,2% para la progesterona; 7,2% y 12,5% para el estradiol; 7,3% y 13,2% para la testosterona y 8,1% y 14,5% para la androsterona, respectivamente.

### **Extracción de ARN para la realización de RT-PCR**

Para la realización de RT-PCR se procedió a extraer el ARN total de los folículos aislados de los ovarios de los grupos control y LA (100 folículos por grupo) en los

distintos períodos de tiempos a estudiar. Siguiendo las instrucciones del reactivo TRIZOL<sup>®</sup> (GIBCO-BRL, Grand Island, NY), se procedió de la siguiente manera: los folículos fueron homogeneizados en TRIZOL<sup>®</sup> (1ml/50-100 mg de tejido), incubados a temperatura ambiente durante 5 minutos y se les agregó 0,2 ml de cloroformo/ml de TRIZOL<sup>®</sup>. Luego de agitar vigorosamente e incubar a temperatura ambiente, se centrifugó a 12.000 xg durante 20-30 minutos a 4°C. A la fase acuosa obtenida se le agregó 0,6ml de alcohol isopropílico, se incubó a -20°C y se centrifugó a 12.000 xg durante 20-30 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con etanol 75%. Luego de centrifugar a 12.000 xg durante 5-10 minutos, se dejó secar el pellet durante 1-2 minutos. El mismo se resuspendió en 30 µl de agua libre de RNAsas y se calculó la concentración de ARN en el espectrofotómetro midiendo absorbancia a 260 y 280 nm.

Se utilizaron 2,5µg del ARN total obtenido durante la extracción de los diferentes grupos y tratamientos para la transcripción reversa a ADNc. Luego de tratar al ARN con la enzima DNAsa, se realizó la transcripción utilizando la enzima transcriptasa reversa (Moloney murine leukemia virus (Promega, Madison, WI)) y oligonucleótidos como primers (Biodynamics) durante 1h a 37°C en un volumen de reacción de 20µl.

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando los pares de primers descritos en la tabla 1 en un volumen final de reacción de 50µl. La mezcla de reacción consistió en primers en una concentración de 1 nM de cada oligo, 200 mM de la mezcla de deoxy-nucleótidos trifosfato incluyendo: [<sup>32</sup>P]-dCTP (3000 Ci/mmol), 20 U de la enzima RNasin, y 2.5 U Taq-DNA polimerasa in buffer de PCR (Promega, Madison, WI). La reacción de PCR consistió en la desnaturalización a 94°C durante 1,5 minutos, apareamiento a 60°C durante 30 segundos, un paso de extensión a 72°C durante 2 minutos y una extensión final de 5 minutos a 72°C. El número de ciclos utilizados para cada gen fue optimizado hasta llegar a la fase exponencial de amplificación. Tanto el número de ciclos como los primers utilizados en cada caso están detallados en la tabla. Los productos se visualizaron utilizando geles de agarosa 1,7% teñidos con bromuro de etidio durante 15 min. para aumentar la sensibilidad. Luego se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta y se tomaron radiografías. Las bandas fueron

cuantificadas utilizando el software apropiado (Scion Image) y la expresión de los genes fueron normalizados con el gen que se utilizó de control interno en cada ensayo ( $\beta$ -actina o L19).

**Tabla 1**

Gen	Primer sense (5'-3')	Primer antisense (5'-3')	Nº de ciclos	Producto
StAR	GACCTTGAAAGGCTCAGGAAGAAC	TAGCTGAAGATGGACAGACTTGC	22	980
CYP17	AACTGGATCCTGGCTTTCCT	CCTCTAAGATTGGGCTGTGG	30	647
$\beta$ -ACTINA	CGGAACCGCTCATTGCC	ACCCACACTGTGCCCATCTA	25	289
L-19	GAAATCGCCAATGCCAACTC	TCTTAGACCTGCGAGCCTCA	22	405
CYP17*	TCATCCCCACAAGGCTAAC	TGCAGTGCCCAGAGATTGAC		
StAR*	CTAGACCAGCCCATGGACAGA	ACCTTGATTCCTTGACATTTGG		

\* primers utilizados para la realización de la amplificación en tiempo real junto con la sonda con la siguiente secuencia para la CYP17: TGGAGAGTTTAGTGTCCCCA y GGCCTCCATGCGGTCCACCAG para la StAR, TaqMan<sup>®</sup> (Primer Express Software, Applied Biosystems, FosterCity, CA).

### **Amplificación en tiempo real (Real time PCR)**

La reacción de PCR en tiempo real fue realizada utilizando un kit TaqMan<sup>®</sup> PCR Core y el sistema ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems) como ha sido descrito anteriormente [320]. Simultáneamente a la realización de la reacción, fueron detectados los niveles del gen 18S ARN ribosomal para la normalización de nuestro gen blanco. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10 $\mu$ l el cual incluía 250 nmol/l de la sonda TaqMan<sup>®</sup> (marcada con el colorante FAM) del gen de CYP17, 300 nmol/l de los respectivos primers, 250 nmol/l de la sonda TaqMan<sup>®</sup> para el gen del 18S rARN (marcada en el extremo 5' con el colorante VIC) y 50 nmol/l de los primers para este mismo gen.

La reacción se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos con las siguientes condiciones: 2 min. a 50°C, 10 min. a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C (desnaturalización) y 1 min. a 60°C (apareamiento de primers y extensión). Se generó una curva estándar de cinco concentraciones decrecientes (dilución 1/10) a partir de un pool de ADNc de las distintas muestras para la cuantificación relativa del ARN mensajero. Finalmente, los valores obtenidos para el ARN de nuestro gen blanco en cada muestra se dividieron en los valores obtenidos para el 18S ARN en la misma muestra (el mismo procedimiento se llevó a cabo con la curva estándar realizada).

### **Extracción de proteínas foliculares y realización de Western Blot**

Los folículos aislados para la realización de los experimentos *in vivo*, así como también los folículos sometidos a cultivo para los experimentos *in vitro*, se homogenizaron en buffer de lisis (NP-40 1%, Tris 20 mM pH 8, NaCl 137 mM y glicerol 10%) suplementado con inhibidores de proteasas (PMSF 0,5mM; ZPCK 0,025 mM; TLCK 0,025 mM; TPCK 0,025mM). El lisado se centrifugó a 4°C a 10.000 x g durante 10 minutos y el pellet se descartó. La medición de proteínas en el sobrenadante se realizó por el método de Bradford [321].

Para la detección de las distintas proteínas analizadas en este trabajo, se sembraron 40-60 µg del extracto proteico de cada muestra en geles de poliacrilamida (10%, 12% o 15%) con SDS (SDS-PAGE), luego de ser hervidas durante 5 minutos en buffer (6% de SDS, 15% de β-mercaptoetanol, 60% glicerol, 0,006% azul bromofenol, 0,18M Tris-base, pH 6,8). Las proteínas se separaron por electroforesis a 25 mA durante 2 hs, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en buffer Tris-base 0,025 M (pH 8,3), glicina 0,192 M, metanol 20% a 80V durante 2 hs a 4°C. Los sitios de unión remanentes sobre las membranas se bloquearon con una solución de TBS y detergente tween (TTNBS 0,05%) y leche descremada en una concentración de 0,05g/ml durante 1 h a temperatura ambiente o incubando toda la noche. Luego las membranas fueron incubadas con los correspondientes anticuerpos (*Star*, 1:2000; *CYP11A*, 1:2500; *CYP17*, 1:5000; *VEGF*, 1:100; *ANGPT-1*, 1:100; *Flk-1*, 1:100; *Tie-2*, 1:100; *Caspasa-3*, 1:500; *PARP*, 1:200, *β-actina*, 1:2000) durante toda la noche y luego de sucesivos lavados con TTNBS, se incubaron las membranas con sus correspondientes anticuerpos secundarios acoplados a la enzima peroxidasa (IgG de conejo acoplado a peroxidasa,

1:1000 y IgG de cabra acoplado a peroxidasa, 1:1000 diluido en Tween 20 0,1%) durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente las membranas fueron incubadas con el reactivo de quimioluminiscencia (Amersham Pharmacia) durante 1 minuto. El contenido proteico se analizó en las distintas muestras mediante la realización de densitometría de las bandas obtenidas para la proteína de interés. La densidad de cada muestra se normalizó con la densidad de la banda obtenida para la proteína  $\beta$ -actina en la misma muestra. En su defecto, se utilizó una banda detectada en el patrón del rojo Ponceau que no posee variación frente a los distintos tratamientos. Los datos de la densidad óptica se expresaron como unidades arbitrarias $\pm$ SEM (n=3).

### **Técnica de Inmunohistoquímica**

Los ovarios fueron extraídos de los animales perteneciente a los distintos tratamientos y fijados en formalina 4% durante 12 hs, tras los cual se incluyeron en parafina. Los cortes del taco de parafina fueron realizados cada 50- $\mu$ m con un grosor de 3 micrones cada una y montadas en portaobjetos. De esta forma se evitó contar al mismo folículo dos veces acorde a los descripto por Woodruff et al [322].

La secciones de tejido se desparafinaron en xileno y se rehidrataron realizando lavados con alcoholes con graduación decrecientes (100%-75%). La actividad de la enzima peroxidasa endógena se bloqueó con peróxido de hidrógeno en buffer PBS y la unión no especifica a otros epitopes se bloqueó incubando las secciones con BSA 2% (seroalbúmina bovina) durante 20 minutos. Luego las secciones se incubaron con los anticuerpos *anti-StAR* (1:2000), el anticuerpo *anti-caspasa-3* (1:100) durante toda la noche a 4°C. Al otro día, luego de lavados sucesivos con PBS las secciones fueron incubadas con el anticuerpo secundario IgG anti-conejo biotinilado durante 1 h y luego durante 30 minutos con el complejo ABC: avidina-peroxidasa biotinilada (Vectastain ABC system, Vector Laboratories, Burlingame, CA). La marca positiva fue visualizada con el sustrato de la enzima peroxidasa, diaminobencidina (DAB) en buffer de revelado (Roche, Diagnostics, Germany). La reacción se detuvo con agua destilada, las secciones se tiñeron con hematoxilina durante 1 minuto y se procedió a la deshidratación previamente a realizar el montaje con el medio apropiado (PMYR, Buenos Aires, Argentina).

### **Determinación de la actividad de caspasa-3**

La actividad de la enzima caspasa-3 se determinó utilizando un ensayo colorimétrico basado en la detección espectrofotométrica de un cromóforo: p-nitroanilina (p-NA) el cual se produce por clivaje del sustrato de la caspasa-3 marcado DEVD-pNA. Los folículos fueron homogeneizados en buffer de lisis (50mM HEPES, pH 7,4; 100 mM NaCl; 0,1% CHAPS; 1mM DTT; 1 mM EDTA) con el agregado de inhibidores de proteasas (PMSF, SIGMA). El lisado fue centrifugado y la concentración de proteínas se determinó en el sobrenadante por el ensayo de Bradford [321]. La reacción enzimática se llevó a cabo en el buffer de ensayo (50mM HEPES, pH 7,4; 100 mM NaCl; 0,1% CHAPS; 10 mM DTT; 0,1 mM EDTA; 10% glicerol) conteniendo 50 µg de proteína y 200 µM DEVD-pNA. Cada muestra se dividió en tres partes: una contenía el inhibidor de la enzima Ac-DEVD-CHO 100 nM con sustrato y extracto proteico y dos partes contenían el sustrato y el extracto sin inhibidor. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 3 hs y se procedió a la lectura de la absorbancia cada 10 minutos. El valor del blanco de reacción (ausencia de extracto) fue sustraído de todas las muestras. Siguiendo las instrucciones del ensayo, los resultados fueron seleccionados luego de 90 minutos de reacción, tiempo a partir del cual los valores del blanco y de la muestra que poseía el inhibidor de la enzima no variaron a lo largo del tiempo.

### **Análisis de datos**

Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces y se utilizaron cinco animales por grupo experimental en cada repetición. Las incubaciones en los experimentos *in vitro*, se realizaron utilizando tres pools de folículos provenientes de distintos animales para cada condición de incubación. En las determinaciones de esteroides séricos, la cantidad de animales utilizados fue detallada en cada caso entre paréntesis en la correspondiente tabla en la sección de resultados. Para la semi-cuantificación de la expresión de la caspasa-3 por inmunohistoquímica, se analizaron 5 campos seleccionados al azar en cada sección de ovario. Se estudio un total de seis secciones/ovario y cinco fueron los ovarios analizados.

Los resultados se expresaron utilizando la media o promedio  $\pm$  error estándar (SEM) de los resultados obtenidos en los tres experimentos (n=3). Los geles mostrados fueron obtenidos de experimentos representativos. El análisis estadístico utilizado fue el

t-test cuando se compararon dos grupos experimentales solamente. Además, se utilizó Análisis de Varianza de un factor (one-way ANOVA), cuando se compararon más de dos grupos experimentales con una variable a analizar. Cuando las comparaciones se realizaron entre más de dos grupos y, además incluyeron dos variables como tiempo y tratamiento, se utilizó el Análisis de Varianza de dos factores (two-way ANOVA). Si las diferencias halladas por el ANOVA, eran significativas, se realizaron post-tests, Scheffé, Bonferroni, Tukey o Student-Newman-Keuls para detectar a que grupos experimentales se debían estas diferencias. Valores de probabilidad menores a 0,05 fueron considerados significativos.

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa Sigma Stat 8.0 y Graph Pad Prism 4.

# ***RESULTADOS***

---

---

## RESULTADOS

### *1.1. Efecto in vivo del agonista de GnRH-I (LA) sobre los niveles de esteroides en la foliculogénesis de rata*

#### **a. Medición de los niveles de esteroides ováricos en suero y en tejido folicular**

En el presente experimento se analizaron los niveles séricos y el contenido folicular de los distintos esteroides en ratas prepúberes tratadas con PMSG (grupo Control) y en ratas tratadas con PMSG+LA (1µg/rata/día) (grupo LA). Todos los animales recibieron una dosis de PMSG de 25 UI simultáneamente con una dosis de LA (1µg/rata/día). El LA se administró cada 12 hs durante 48hs y los animales se sacrificaron 3 hs luego de la última inyección. Los resultados los podemos observar en las Tablas 1 y 2.

Al analizar los niveles séricos de esteroides de los animales pertenecientes a ambos grupos, se pudo observar que el tratamiento con LA disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ), tanto los niveles de testosterona como los de estradiol respecto de los animales del grupo Control. Por el contrario, los niveles de progesterona no variaron de forma significativa entre ambos grupos (Tabla 1).

Sin embargo, en cuanto al contenido folicular de estos esteroides, se detectó un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en el contenido de progesterona en el grupo LA respecto del grupo Control, el cual también, se vió reflejado en un aumento de los niveles de su metabolito inactivo, 20α-hidroxi-progesterona, luego del tratamiento con LA (Tabla 2). En cuanto a los andrógenos estudiados, se observó que tanto el contenido de testosterona (detectado previamente en suero de estos animales) como el de androsterona, se encuentran disminuídos significativamente ( $p < 0,05$ ) a nivel folicular. Es importante tener en cuenta los valores de androsterona ya que este es el andrógeno reducido sintetizado en mayor proporción en el ovario de ratas inmaduras, los cuales presentan alta actividad de enzimas reductasas [323].

**Tabla 1.** Niveles de esteroides ováricos en suero de ratas superovuladas tratadas 48 hs con LA

	<b>P4</b>	<b>T</b>	<b>E2</b>	<b>A</b>
<b>Control</b>	13,08 ± 2,04 ng/ml <sup>a</sup> (N=8)	1,530 ± 0,12 ng/ml <sup>a</sup> (N=8)	531,3 ± 52,2 pg/ml <sup>a</sup> (N=11)	61,8 ± 3,5 ng/ml <sup>a</sup> (N=9)
<b>LA</b>	13,48 ± 1,09 ng/ml <sup>a</sup> (N=9)	0,303 ± 0,06 ng/ml <sup>b</sup> (N=8)	141,3 ± 27,3 pg/ml <sup>b</sup> (N=11)	27,6 ± 1,9 ng/ml <sup>b</sup> (N=9)

Los diferentes superíndices indican diferencias significativas entre los grupos estudiados (p<0,05)

N indica la cantidad de animales utilizados para la medición e los respectivos esteroides

**Tabla 2.** Niveles e esteroides en folículos ováricos de ratas superovuladas tratadas 48 hs con LA

	<b>P4</b>	<b>T</b>	<b>E2</b>	<b>A</b>	<b>20αOH-P4</b>
<b>Control</b>	65,56 ± 2,16 pg/folic. <sup>a</sup> (N=3)	20,80 ± 4,39 pg/folic. <sup>a</sup> (N=3)	8,9 ± 1,9 pg/folic. <sup>a</sup> (N=3)	914,8 ± 41,51 pg/folic. <sup>a</sup> (N=3)	89,0 ± 24,92 pg/folic. <sup>a</sup> (N=3)
<b>LA</b>	303,9 ± 53,36 pg/folic. <sup>b</sup> (N=3)	4,43 ± 1,26 pg/folic. <sup>b</sup> (N=3)	2,5 ± 0,4 pg/folic. <sup>b</sup> (N=3)	334,5 ± 31,3 pg/folic. <sup>b</sup> (N=4)	362,97 ± 43,52 pg/folic. <sup>b</sup> (N=3)

Los diferentes superíndices indican diferencias significativas entre los grupos estudiados (p<0,05)

A: Androsterona

N=3 o N=4 indica tres o cuatro pools de folículos (60) obtenidos de seis ovarios de distintas ratas del grupo Control y LA respectivamente

## **b. Medición de los niveles séricos de Progesterona en función del tiempo de administración de LA**

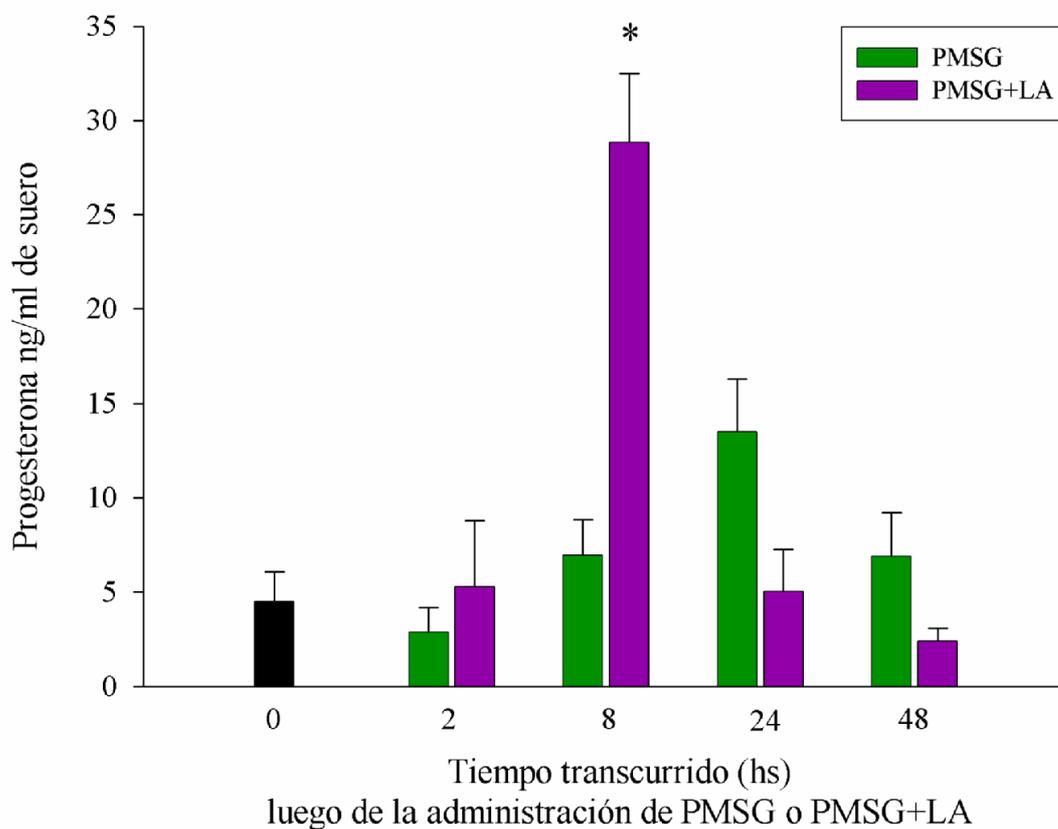
Para estudiar la regulación dinámica que ejerce LA en parámetros de la síntesis de esteroides que responden a estímulos de forma aguda, como la proteína StAR, se realizaron estudios a distintos tiempos luego de la administración de una dosis única de LA. Los animales prepúberes fueron tratados con PMSG (grupo Control) o PMSG+LA (grupo LA). Estos animales fueron sacrificados a las 2, 8, 24 y 48 hs luego de la administración de una sola dosis de LA (2µg/rata) simultánea a la inyección de PMSG.

Se observó un aumento muy significativo en los niveles de progesterona sérica cuando los animales fueron sacrificados 8 hs luego del tratamiento con LA comparado al correspondiente grupo Control (Control 8hs) (C:  $6,96 \pm 1,9$  vs LA:  $28,85 \pm 3,4$  ng/ml de suero,  $p < 0,001$ ) (*Figura 1*). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos a las 2, 24, o 48 hs de tratamiento.

La estimulación producida por GnRH en la síntesis de progesterona que observamos en nuestros experimentos, concuerdan con estudios *in vitro* realizados en cultivo de células de la granulosa de ratas hipofisectomizadas y en cultivos de folículos en presencia de análogos de GnRH [298;324;325].

*Niveles séricos de Progesterona en función del tiempo de administración de LA*

**Figura 1**



Ratas prepúberes fueron estimuladas con PMSG (25UI) o PMSG+LA. Los animales recibieron una única dosis de LA (2µg/rata) y fueron sacrificados a diferentes tiempos: 2, 8, 24 y 48 hs luego de recibir el análogo. Tiempo 0 hs corresponde a animales que no recibieron tratamiento alguno. Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  SEM. El asterisco (\*) indica diferencias significativas entre grupos dentro de un mismo intervalo de tiempo ( $p < 0,001$ ).

*1.2. Efecto de LA en la expresión génica, localización y contenido folicular de la proteína esteroideogénica StAR y en el contenido folicular de la enzima CYP11A1.*

**a. Efecto de LA en la expresión génica de StAR (Proteína Reguladora de la Esteroidogénesis Aguda) en folículos de ovario de ratas hiperestimuladas**

La proteína StAR se encuentra localizada en la membrana interna mitocondrial y actúa en el transporte del colesterol desde el exterior de la mitocondria hacia el interior de la misma, para el inicio de la síntesis de esteroides. En este experimento, se realizó RT-PCR semi-cuantitativa con los primers descritos en Materiales y Métodos (ver tabla) y ARN total extraído de folículos ováricos de animales Control y LA a los distintos tiempos de estudio (0, 2, 4 y 8 hs).

Como podemos observar en la *Figura 2A*, con las condiciones utilizadas en este ensayo, se detectó expresión del ARN mensajero de la StAR en aquellos animales prepúberes que no recibieron tratamiento alguno (0 hs). Con la inyección de PMSG, los niveles de expresión son levemente mayores a las 2 hs, siendo el aumento mayor a las 4 hs respecto de los animales de sin tratamiento (0 hs).

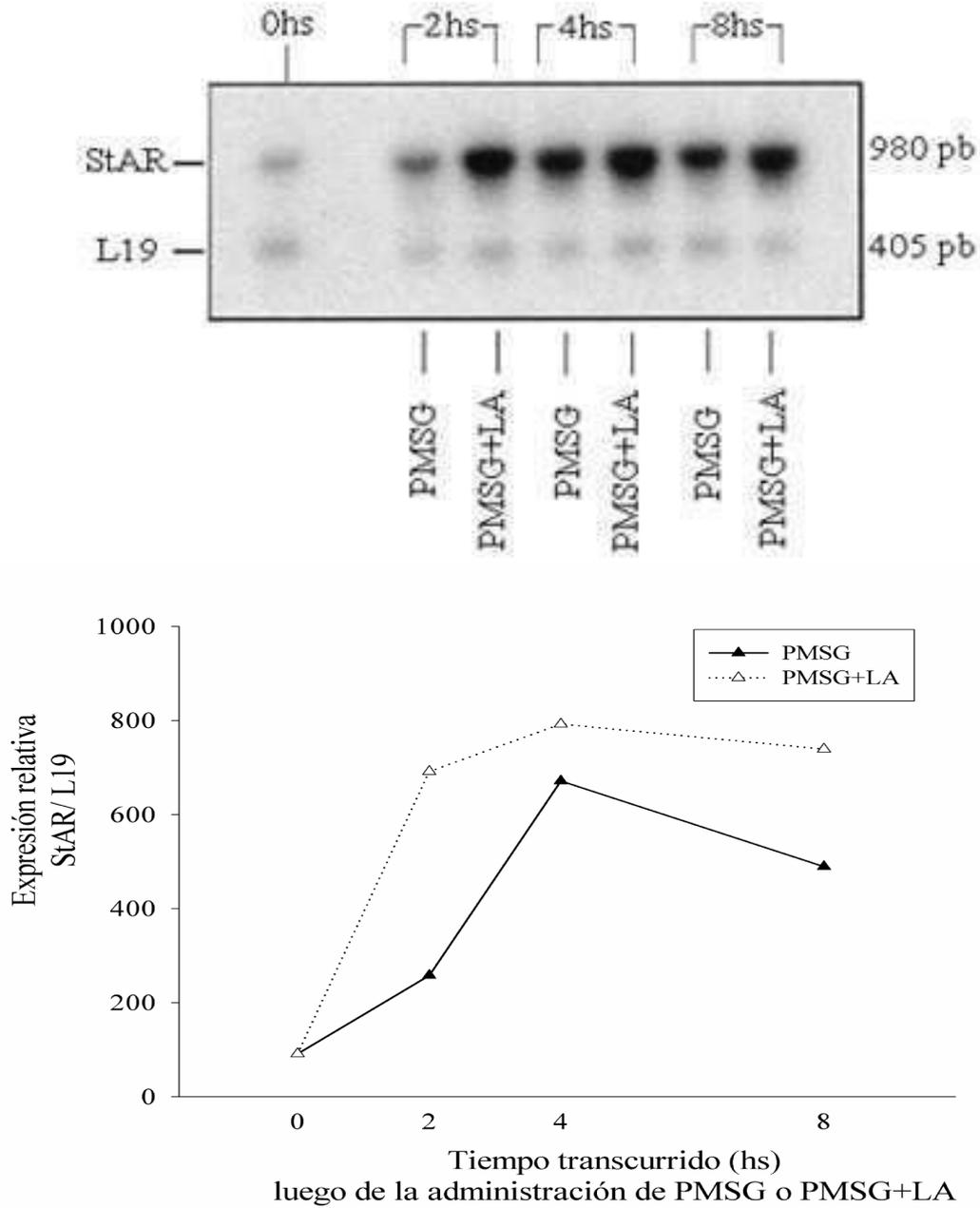
La expresión en el grupo LA sigue el mismo patrón descrito para el grupo Control. Sin embargo, con el co-tratamiento los aumentos respecto del tiempo 0 hs son mucho mayores que los observados en el grupo Control, y además los valores de expresión se mantienen superiores respecto de los del grupo Control en todos los tiempos estudiados.

El aumento en el ARN mensajero de la StAR descrito en el grupo Control en ratas prepúberes superovuladas coincide con los resultados obtenidos por Ronen-Fuhrmann y col. [128].

En una pasantía realizada en el Centro de Primates de la Universidad de Ciencias y Salud de Oregon (ONRPC-OHSU, USA), se analizaron los niveles del ARN mensajero de la StAR por PCR en tiempo real, técnica cuantitativa para la determinación de la expresión génica. Los animales del grupo Control y LA se sacrificaron a las 4 y 8 hs luego de los correspondientes tratamientos. Además, se utilizó un grupo de animales que no recibió ningún tratamiento (0hs). Mediante esta técnica, se detectó un aumento en la expresión de StAR a las 4 hs de tratamiento con LA comparado al grupo Control (*Figura 2B*).

*Efecto de LA en la expresión génica de StAR por RT-PCR semicuantitativa*

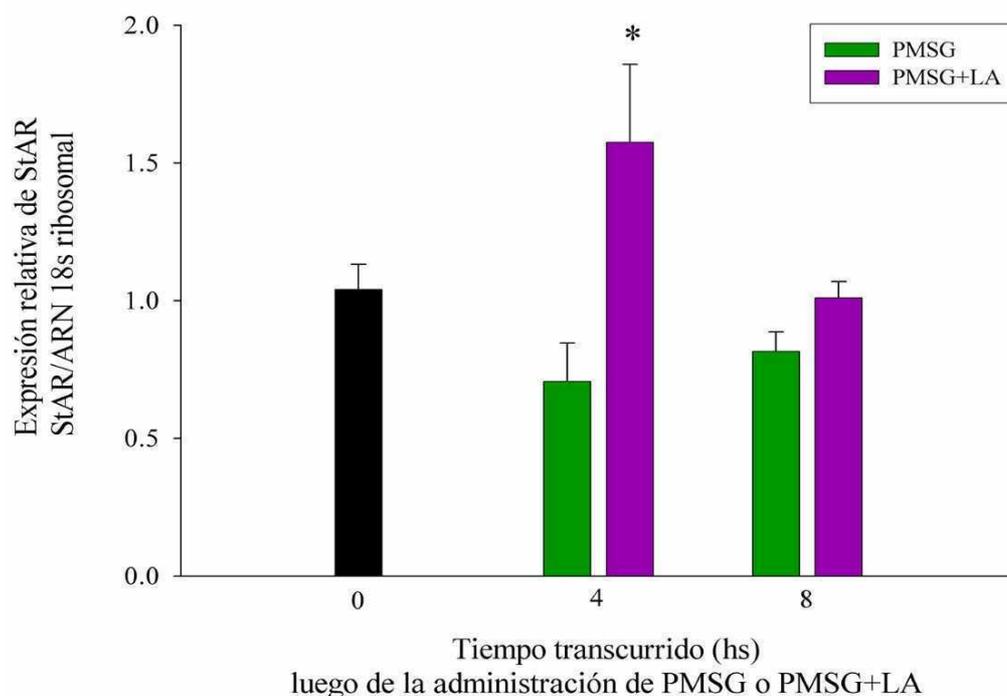
**Figura 2A**



Los folículos antrales se aislaron por microdissección luego del tratamiento con PMSG y PMSG+LA a distintos tiempos. Se extrajo el ARN total y se realizó RT-PCR para la StAR y L19 como control interno. El panel superior muestra las bandas correspondientes a la StAR y L19 en un gel de agarosa representativo. En el panel inferior se muestra la relación numérica de StAR/L19 de los valores obtenidos mediante densitometría de las bandas.

## Efecto de LA en la expresión génica de StAR por PCR en tiempo real

Figura 2B



Los folículos antrales se aislaron por microdissección luego del tratamiento con PMSG y PMSG+LA a distintos tiempos. Se extrajo el ARN total como se ha descrito en *Materiales y Métodos*, y se realizó RT-PCR en tiempo real para la StAR y 18s ARN ribosomal como control interno. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  SEM de la expresión relativa de StAR. 0 corresponde a folículos aislados de animales que no recibieron tratamiento alguno. El asterisco (\*) indica diferencias significativas entre grupos dentro de un mismo intervalo de tiempo ( $p < 0,05$ ).

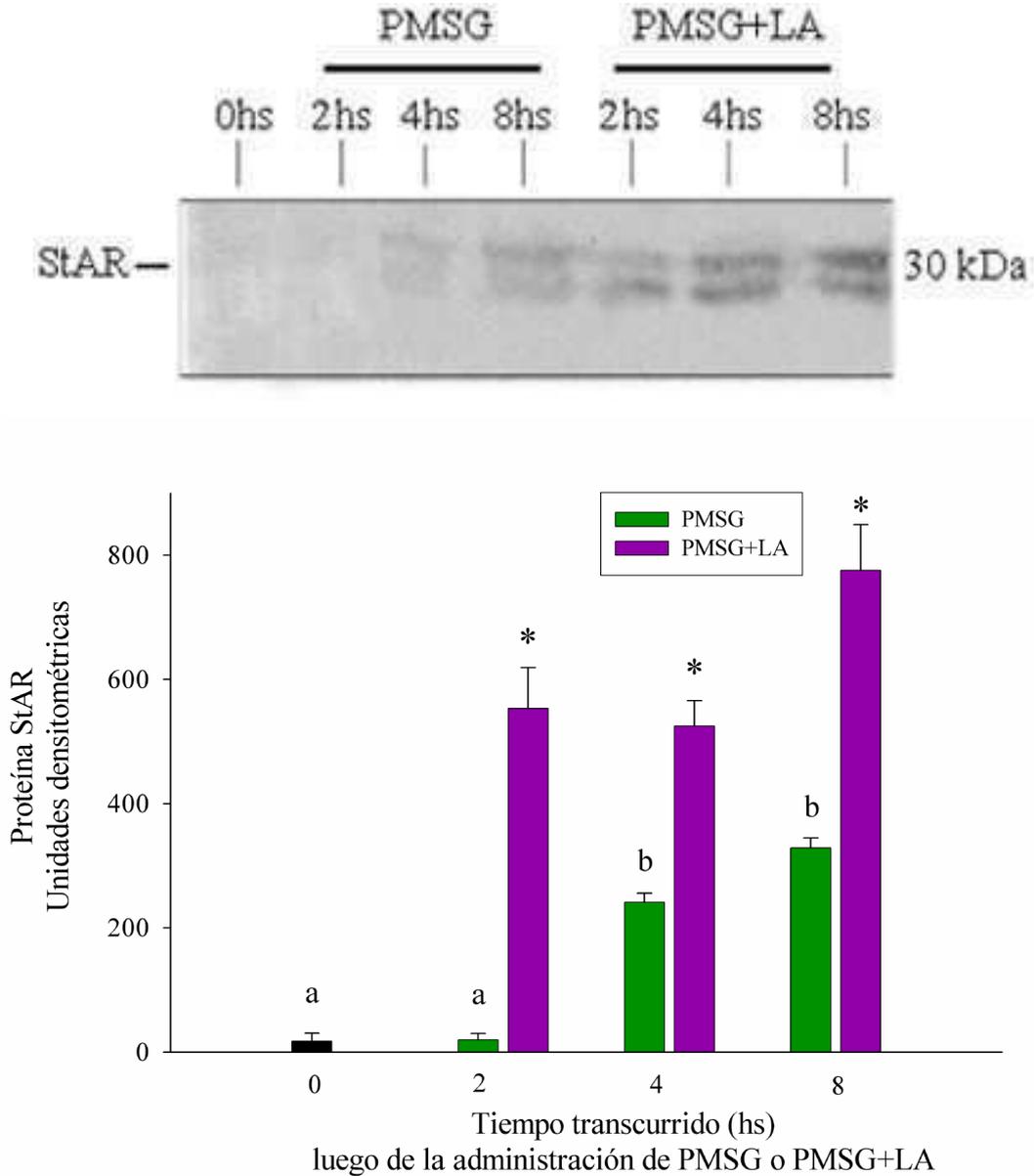
## **b. Determinación del contenido de la proteína StAR en folículos ováricos de ratas tratadas con LA**

Para dilucidar si el aumento en los niveles de progesterona se debía a una mayor disponibilidad de colesterol para la síntesis de pregnenolona, se analizó por western blot el contenido proteico de la enzima StAR en extractos proteicos de folículos ováricos aislados por microdissección. Estas determinaciones fueron realizadas en los mismos grupos experimentales que se han descrito anteriormente para la medición de los niveles de Progesterona sérica y expresión del ARN mensajero de esta proteína.

Los resultados mostraron que la inyección de PMSG produjo un aumento muy significativo ( $p < 0,001$ ) a las 4 y 8 hs luego del tratamiento, comparado con los animales que no recibieron gonadotrofinas (0 hs) (*Figura 3*). Además, la co-administración de PMSG y LA aumentó significativamente el contenido folicular de la proteína StAR a las 2, 4 y 8 hs (C2hs:  $20 \pm 10$ , C4hs:  $240,9 \pm 15,05$  y C8hs:  $328,6 \pm 16,4$ ; LA2hs:  $553 \pm 65,6$ ; LA4hs:  $525 \pm 40,7$  y LA8hs:  $776 \pm 73,5$ ;  $p < 0,05$ ) de tratamiento comparado a los animales que solo recibieron PMSG (*Figura 3*).

*Contenido de la proteína StAR en folículos ováricos de ratas tratadas con LA*

**Figura 3**



Los folículos antrales se aislaron por microdissección luego de los tratamientos a distintos tiempos. Se realizaron extracciones de proteínas totales y los extractos se corrieron en geles de poliacrilamida. Panel superior: inmunoblot representativo. Panel inferior: análisis densitométrico de los diferentes experimentos expresados como el promedio de las unidades densitométricas  $\pm$  SEM. El asterisco (\*) indica diferencias significativas entre grupos dentro de un mismo intervalo de tiempo con  $p < 0,05$ . a vs b indica diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) entre el grupo PMSG y los animales que no recibieron gonadotrofinas (0 hs).

### **c. Inmunolocalización de la proteína StAR en ovarios de ratas Control y LA**

Para estudiar la localización de la proteína StAR luego del tratamiento con LA a distintos tiempos, se realizó una inmunohistoquímica. Este experimento se llevó a cabo en cortes de ovarios pertenecientes al grupo tratado con PMSG (Control) y PMSG+LA (LA) sacrificados a las 2 y 8 hs luego de recibido el correspondiente tratamiento.

En los animales Control (*Figura 4 A y B*) la localización de la proteína StAR se observó en células de la teca y en el estroma de los folículos preantrales (FP) y antrales (FA), provenientes de aquellos animales sacrificados a las 8 hs luego del tratamiento (*Figura 4B*). No se observó marca positiva para la proteína StAR en las células de la granulosa a este tiempo (*Figura 4B*), ni tampoco se detectó inmunoreactividad para esta proteína a las 2 hs de tratamiento (*Figura 4A*).

Luego de las 8 hs de tratamiento, en el grupo LA (*Figura 4D*), la intensidad de marca para la StAR aumentó en células de la teca de FP y de FA respecto del mismo grupo a las 2 hs de tratamiento (*Figura 4C*) o respecto de las 8 hs del tratamiento solo con PMSG (*Figura 4B*). Además, en este mismo tiempo (8 hs), en el grupo LA, se comienza a detectar una leve intensidad de la proteína StAR en células de la granulosa de FA, no observándose lo mismo en FP (*Figura 4D*).

En los animales que no recibieron estimulación hormonal, no detectamos la expresión de StAR por este método de inmunohistoquímica en concordancia con lo observado por Ronen-Fuhrmann y col. [128]. Además, en el trabajo mencionado, se describe la presencia de la StAR principalmente en células de la teca, lo cual coincide con lo observado en nuestro laboratorio.



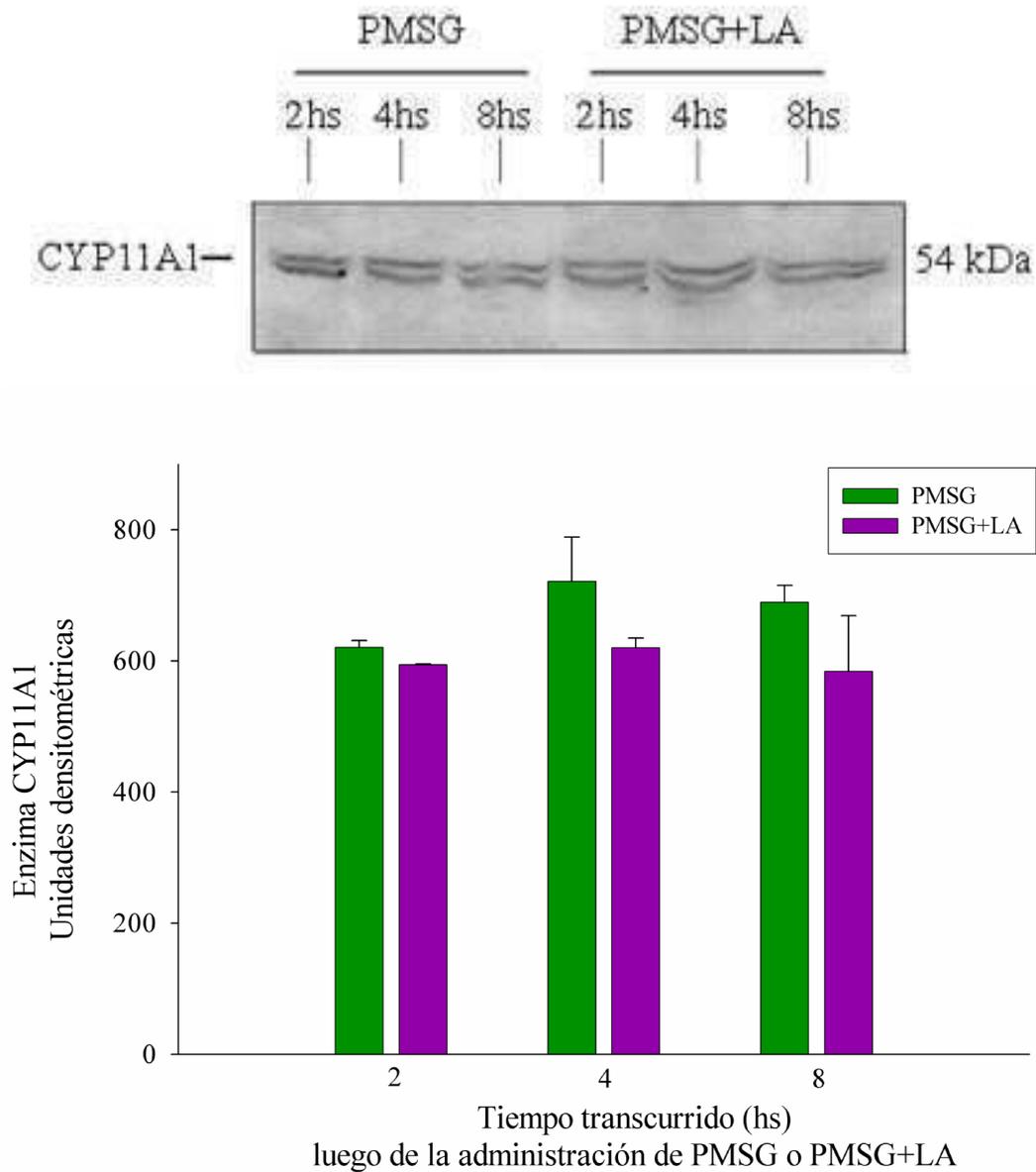
#### **d. Determinación del contenido del citocromo CYP11A1 (Citocromo de la ruptura de la cadena lateral del colesterol) en folículos ováricos de ratas Control y LA**

Además de estudiar la proteína StAR, se analizó el contenido folicular de la enzima CYP11A1 para evaluar si el aumento observado en la StAR estaba acompañado por un aumento en el contenido de este citocromo, siendo éste el responsable del paso siguiente en el camino biosintético de la progesterona. Contrario a lo esperado, no encontramos diferencias significativas en la expresión proteica del citocromo 11A1 dentro de los mismos grupos, Control o LA, o entre ambos grupos en ninguno de los tiempos analizados (*Figura 5*).

Los resultados observados en cuanto al contenido de StAR y CYP11A1, son consistentes con los estudios realizados por Ronen-Fuhrmann y col. [128] donde han descrito en ovario total obtenido de ratas superovuladas con PMSG, una inducción de StAR a las 8 hs luego del tratamiento con gonadotropinas y no han observado cambios en el contenido ovárico del citocromo.

*Contenido folicular del citocromo 11A1 (CYP11A1) luego de la administración de LA*

**Figura 5**



Los folículos antrales se aislaron por microdissección luego de los tratamientos a distintos tiempos. Se realizaron extracciones de proteínas totales y los extractos se corrieron en gels de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes como se ha descrito en Materiales y Métodos. Luego de la transferencia a membranas de nitrocelulosa, las bandas se visualizaron utilizando un anticuerpo anti-CYP11A1. En el panel superior se observa un inmunoblot representativo de tres experimentos independientes y en el panel inferior se muestra el análisis densitométrico de los diferentes experimentos expresados como el promedio de las unidades densitométricas  $\pm$  SEM.

## 2.1. Efecto *in vivo* de LA sobre los niveles de Androsterona y la enzima CYP17 (Citocromo P450 17 $\alpha$ -hidroxilasa/17,20-liasa)

### a. Medición de los niveles séricos de Androsterona en función del tiempo luego de la administración LA

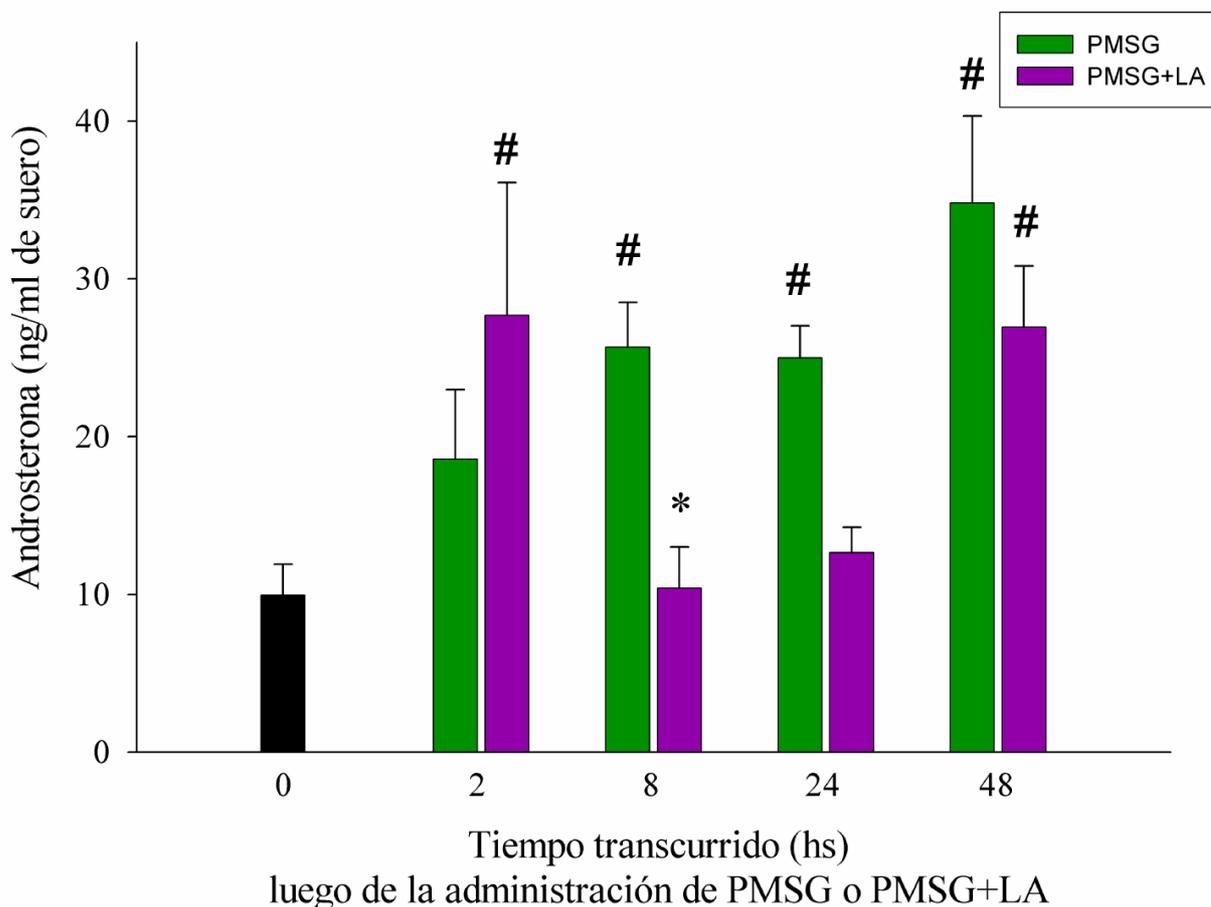
Dada la importancia de la síntesis de andrógenos y de su balance con los niveles de estradiol durante el desarrollo folicular, se ha determinado los niveles séricos de androsterona en animales tratados con PMSG y PMSG + LA a distintos tiempos.

Como observamos en la *Figura 6*, el tratamiento con PMSG produjo un aumento significativo en los niveles de androsterona a las 8 y 24 hs de tratamiento respecto de los animales que no recibieron gonadotropinas ( $p < 0,05$ ). Además, se observó un aumento muy significativo ( $p < 0,001$ ) a las 48 hs luego de la inyección de PMSG. También se observó un aumento significativo a las 2 hs de la administración del análogo comparado al grupo de animales sin estimular (0hs). En cambio, el co-tratamiento de PMSG y LA produjo una disminución significativa ( $P < 0,05$ ) en la síntesis de este andrógeno a las 8 hs cuando lo comparamos con el grupo Control.

En resumen, LA causó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en los niveles de androsterona sérica en aquellos animales sacrificados a las 8 hs luego del co-tratamiento comparado a los animales sacrificados al mismo tiempo que solo fueron inyectados con gonadotropinas. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Magoffin y col. [326] donde se observó que tanto GnRH como un análogo de GnRH producían una disminución en la producción de androsterona basal y estimulada por LH en cultivos de células intersticiales de ratas hipofisectomizadas.

*Niveles séricos de Androsterona en función del tiempo de administración de LA*

**Figura 6**



Ratas prepúberes fueron tratadas con PMSG o PMSG+LA. Los animales fueron sacrificados a diferentes tiempos: 2, 8, 24 y 48 hs luego de recibir el correspondiente tratamiento. Tiempo 0 hs corresponde a animales que no recibieron gonadotrofinas ni el análogo. Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  SEM. El asterisco (\*) indica diferencias significativas entre grupos dentro de un mismo intervalo de tiempo con  $p < 0,05$ . # indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto del grupo que no recibió tratamiento alguno (0 hs).

## **b. Medición de la expresión de ARN mensajero de la enzima CYP17 en folículos ováricos de ratas Control y LA**

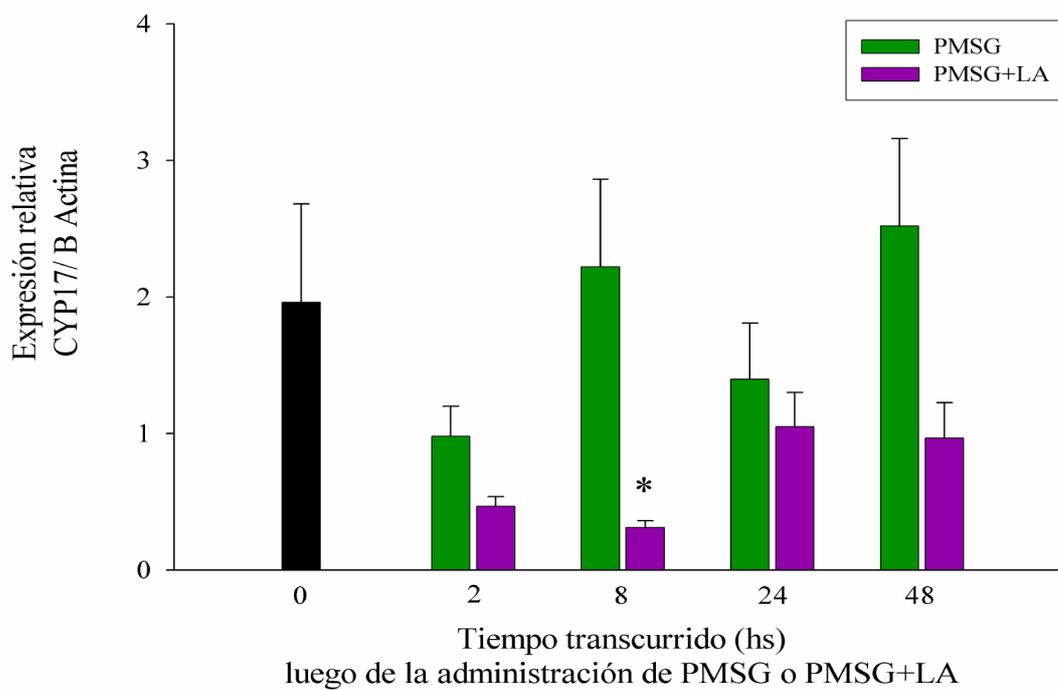
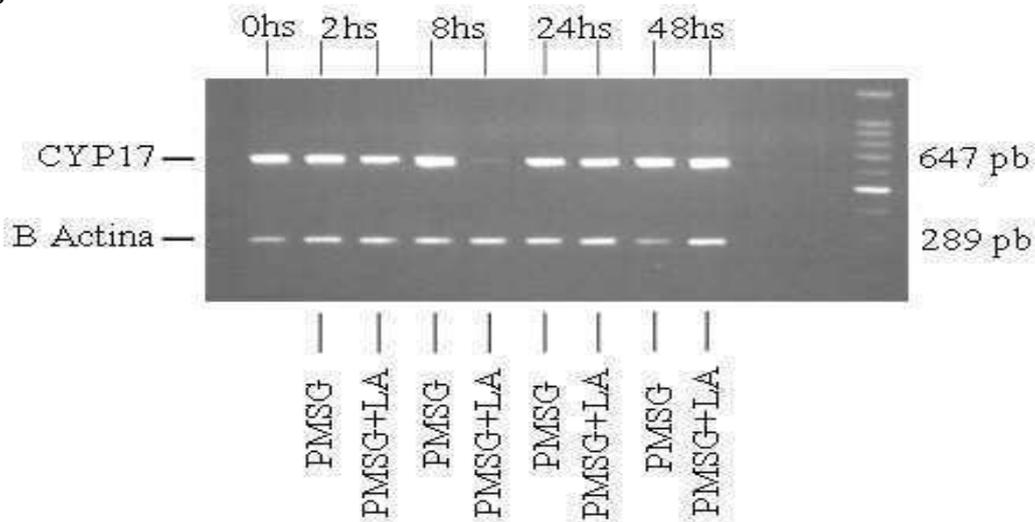
Luego de lo observado en cuanto a la síntesis de androsterona, se analizó la expresión de la enzima CYP17, que constituye un punto de regulación importante en la síntesis folicular de andrógenos. Cabe destacar, que la androsterona no es un producto inmediato de esta enzima, sino que se produce a partir de uno de sus metabolitos: la androstenediona que por acción de la enzima  $5\alpha$ -reductasa y  $3\beta$ -HSD se convertirá en androsterona.

En el presente experimento se realizó la técnica de RT-PCR semi-cuantitativa con ARN extraído de folículos ováricos de ambos grupos experimentales, con los primers y condiciones descritas en Materiales y Métodos para esta enzima (ver Tabla). En la *Figura 7A* se observa la expresión del ARN mensajero de la CYP17 en folículos ováricos de rata aislados a distintos tiempos luego del tratamiento con el agonista de GnRH-I, LA. Se observó que el tratamiento con LA produjo una disminución significativa en la expresión del ARN mensajero de esta enzima a las 8 hs comparado con los animales Control pertenecientes al mismo tiempo (*Figura 7A*). Los niveles de expresión dentro de los grupos no variaron de forma significativa. De manera similar, Hillier y col. [327] no observaron cambios en la expresión del ARN mensajero de esta enzima en ratas hipofisectomizadas tratadas con FSH.

Para constatar el efecto inhibitorio de LA sobre la expresión de la CYP17, se realizó PCR en tiempo real como se describió en Materiales y Métodos. Para ello, se extrajo ARN total de ovarios de animales que no recibieron gonadotrofinas (0 hs) y de animales Control y LA sacrificados a las 4 y 8 hs luego de los tratamientos. Como muestra la *Figura 7B*, se detectó un aumento significativo en la expresión de la CYP17 a las 4 hs, y una inhibición significativa a las 8 hs del tratamiento con LA comparado con el grupo Control, de forma coincidente a lo obtenido mediante la técnica semi-cuantitativa.

*Expresión de la enzima CYP17 en folículos ováricos de ratas tratadas con LA por RT-PCR semicuantitativa*

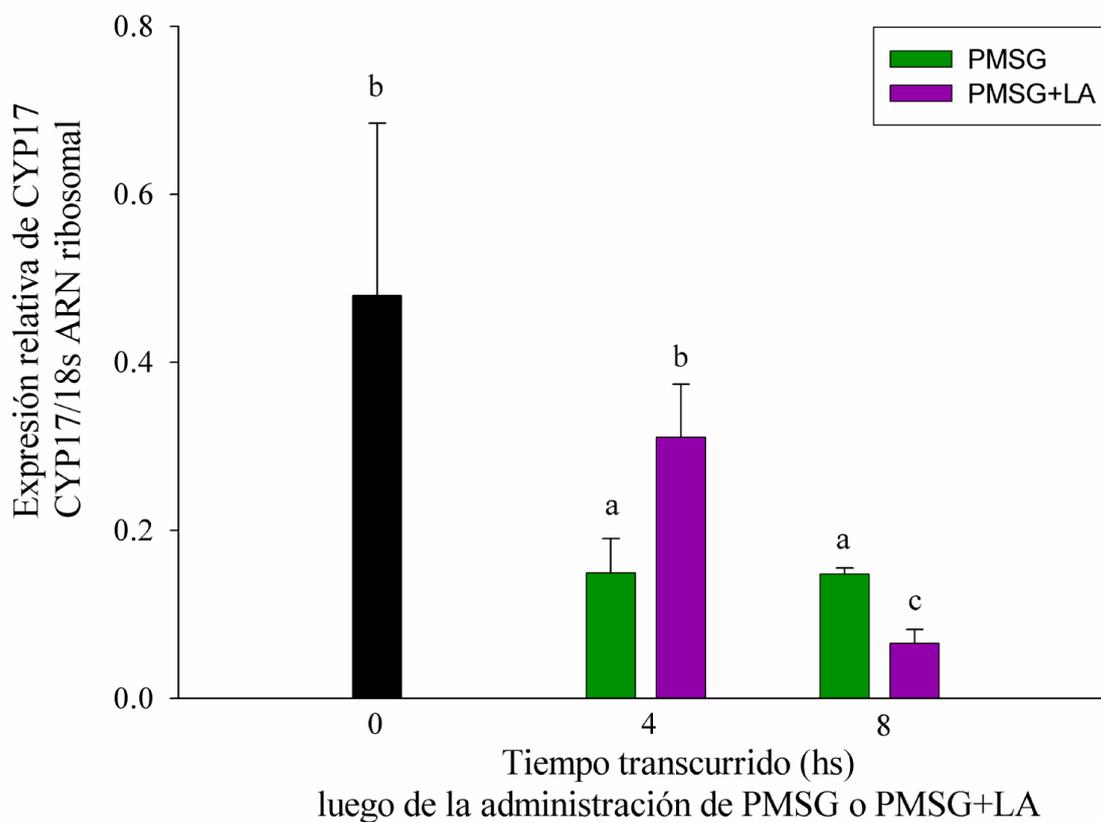
**Figura 7A**



Los folículos antrales se aislaron por microdissección luego del tratamiento con PMSG y PMSG+LA a distintos tiempos. Se realizó RT-PCR para la CYP17 y  $\beta$  actina como control interno. Panel superior: bandas correspondientes a la CYP17 y  $\beta$  Actina en un gel de agarosa representativo. Panel inferior: Densitometría de la relación numérica de StAR/ $\beta$  Actina. El asterisco (\*) indica diferencias significativas entre grupos para un intervalo de tiempo dado ( $p < 0,05$ ).

*Expresión de la enzima CYP17 en folículos ováricos de ratas tratadas con LA por PCR en tiempo real*

**Figura 7B**



Los folículos antrales se aislaron por microdissección luego del tratamiento con PMSG y PMSG+LA a distintos tiempos. Se extrajo el ARN total como se ha descrito en *Materiales y Métodos* y se realizó RT-PCR en tiempo real para la CYP17 y 18s ARN ribosomal como control interno. 0 corresponde a folículos aislados de animales que no recibieron tratamiento alguno. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  SEM de la expresión relativa de CYP17. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos experimentales ( $p < 0,05$ ).

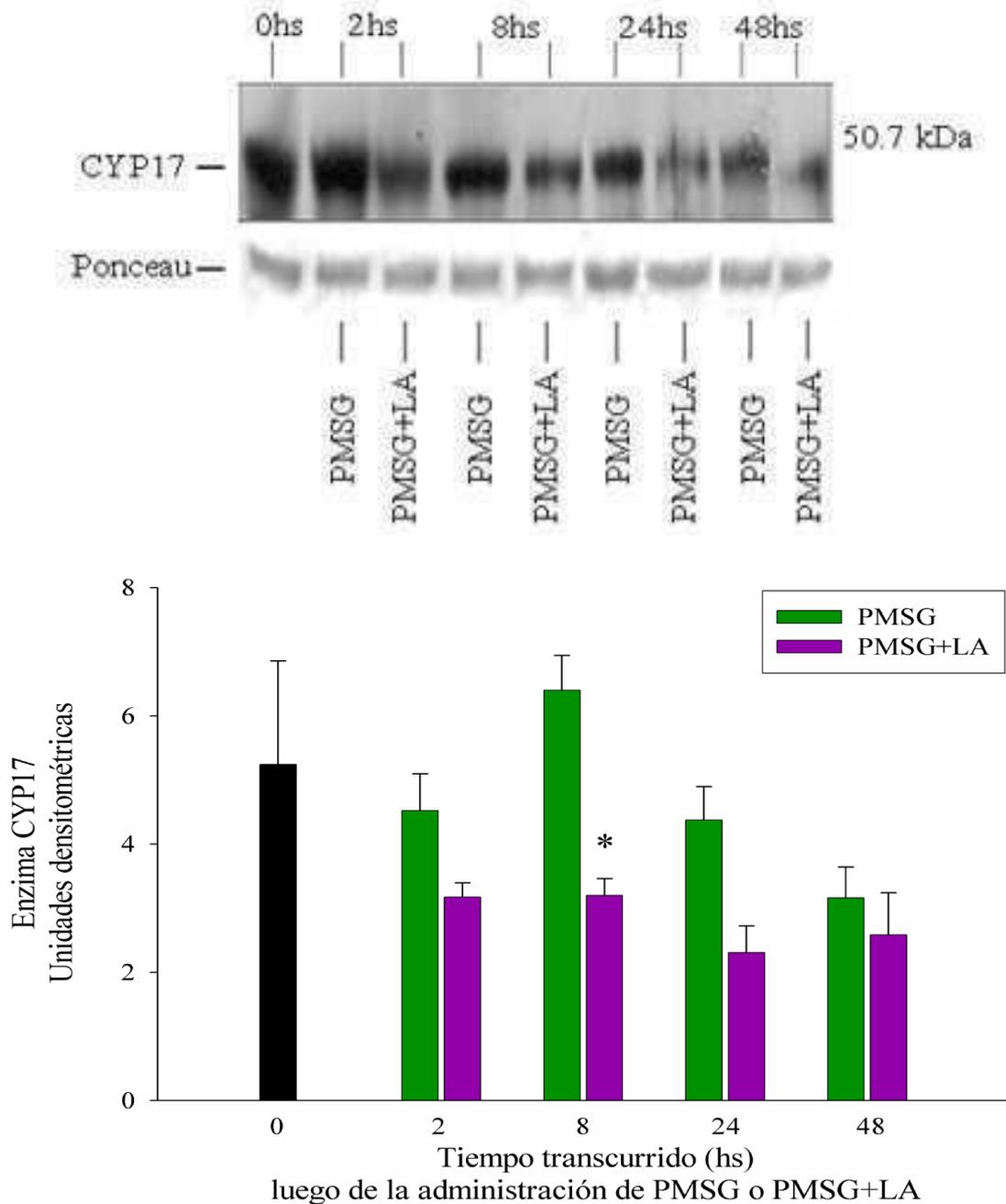
**c. Determinación del contenido del citocromo CYP17 en folículos ováricos de ratas Control y LA**

Luego se procedió al análisis del contenido proteico de la CYP17 en folículos de los mismos grupos experimentales utilizados para el análisis de la expresión del ARN mensajero de esta enzima. De forma similar a lo observado anteriormente, se observó que el tratamiento con LA disminuyó significativamente la intensidad relativa de CYP17 comparado al grupo Control en aquellos animales sacrificados a las 8 hs luego de los correspondientes tratamientos. Dentro de los grupos no se observaron variaciones significativas a lo largo de los tiempos estudiados (*Figura 8*).

Estos resultados son consistentes con los observados por Hsueh y col. donde demuestran que el tratamiento con FSH de ratas prepúberes no afecta el nivel proteico de la enzima CYP17 en homogenatos de ovarios de estos animales [176].

*Contenido de la enzima CYP17 en folículos ováricos de ratas tratadas con LA*

**Figura 8**



Los folículos antrales se aislaron por microdissección luego de los tratamientos a distintos tiempos. Se realizaron extracciones de proteínas totales y los extractos se corrieron en geles de poliacrilamida. Panel superior: inmunoblot representativo. Panel inferior: análisis densitométrico de los diferentes experimentos expresados como el promedio de las unidades densitométricas  $\pm$  SEM. (\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos dentro de un mismo intervalo de tiempo.

## 2.2 Efecto *in vitro* de LA en folículos ováricos de ratas prepúberes superovuladas

### a. Determinación del contenido de Androsterona de folículos en cultivo en presencia de FSH y FSH+LA

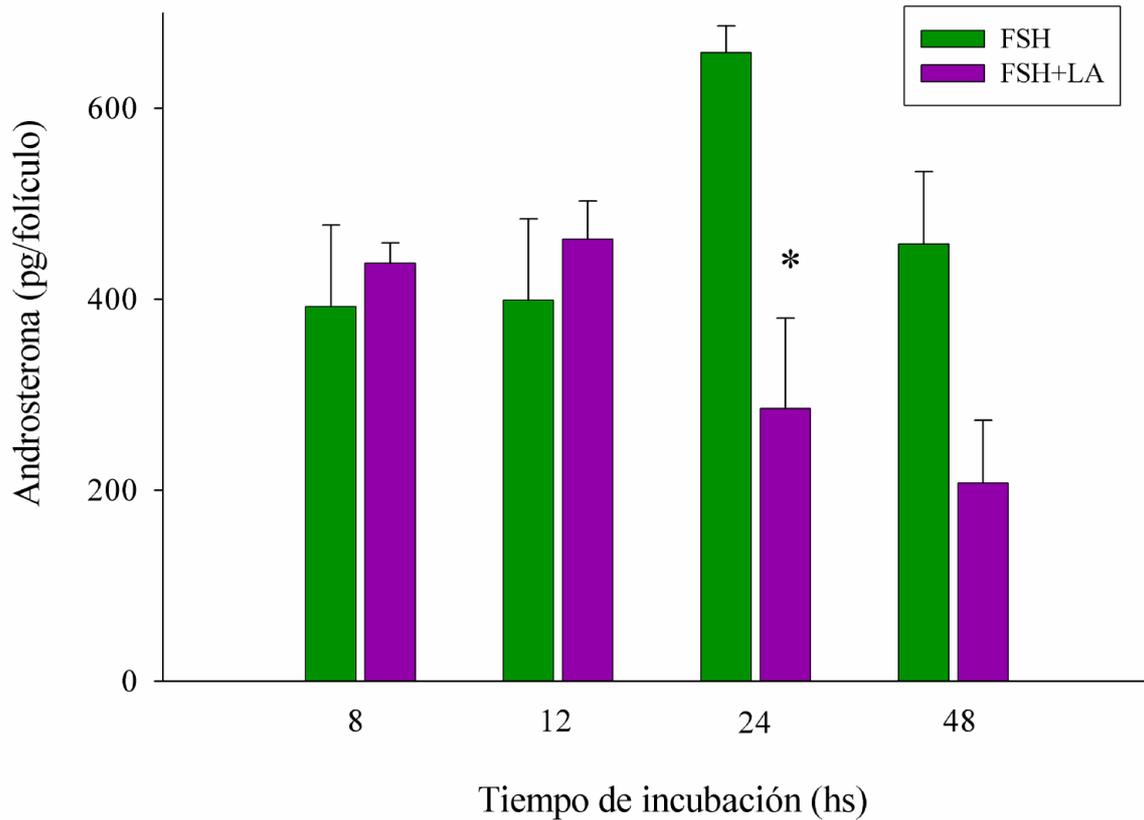
Estos experimentos se realizaron para dilucidar si los efectos de LA observados *in vivo*, podían mimetizarse *in vitro*, lo cual nos daría la base para demostrar que lo producido por la administración de los agonistas de GnRH-I, se debe a un efecto directo sobre los folículos ováricos, y no a través del eje hipotálamo-hipófisis. Se determinó el efecto de LA sobre el contenido folicular de androsterona en folículos aislados por microdissección de ovarios de ratas luego de las 48 hs de administración de PMSG. Los folículos fueron incubados en presencia de FSH o FSH+LA durante distintos períodos de tiempo: 8, 12, 24 y 48 hs.

En la *Figura 9* se puede observar que el contenido de androsterona folicular disminuyó significativamente en los folículos incubados en presencia de FSH+LA a partir de las 24 hs de incubación comparados a los folículos que fueron incubados con FSH solamente (FSH:  $658,2 \pm 28,0$  pg/folículo; LA:  $285,6 \pm 94,7$  pg/folículo  $p < 0,05$ ).

Dentro de los tratamientos no se observaron diferencias significativas a lo largo de los tiempos estudiados. Estos datos se corroboran con los observados por Hillier y col. [327] quienes no encontraron estimulación en la síntesis de andrógenos por FSH a través de una acción paracrina por acción de esta gonadotropina en células de granulosa.

*Contenido de Androsterona en folículos incubados en presencia de FSH y FSH+LA*

**Figura 9**



Los animales fueron estimulados con PMSG y sacrificados 48 hs después. Se aislaron los folículos antrales por microdissección y se incubaron en presencia de FSH (20 ng/ml) o FSH+LA (100 ng/ml) durante distintos intervalos de tiempo. Se extrajeron los esteroides foliculares mediante extracción con acetona como se ha descrito en Materiales y Métodos y el contenido de Androsterona se determinó por RIA. El asterisco (\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos dentro de un mismo intervalo de tiempo.

**b. Determinación del contenido folicular de la proteína StAR, de la enzima CYP11A1 y CYP17 en cultivo de folículos en presencia de FSH y FSH+LA**

Se realizaron cultivos de folículos aislados de ratas superovuladas con PMSG durante 48 hs, en presencia de FSH o FSH+LA durante 0, 2, 8, 12, 24 y 48 hs.

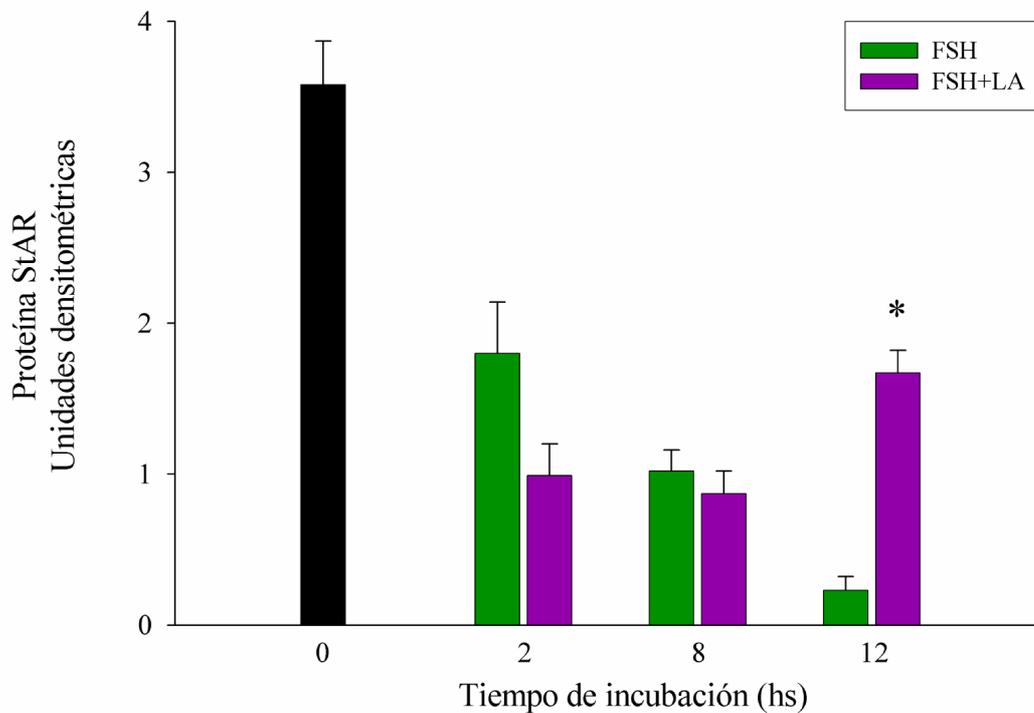
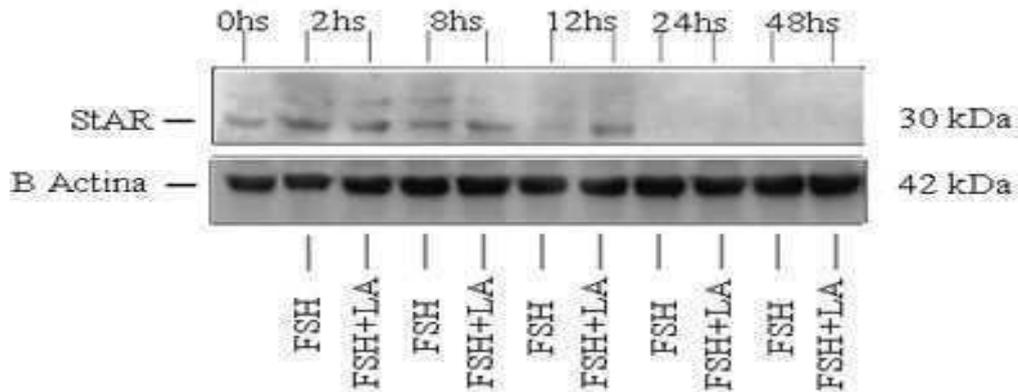
De forma coincidente a lo observado en los experimentos realizados *in vivo*, luego de 12 hs de incubación con LA, se detectó un aumento significativo en el contenido de la proteína StAR comparado con su respectivo Control (folículos incubados durante 12 hs con FSH solamente) (FSH:  $0,25 \pm 0,09$ ; FSH+LA:  $1,7 \pm 0,15$ ,  $p < 0,05$ ). No se detectó expresión de esta proteína luego de las 24 hs de incubación ya sea en presencia de FSH o FSH+LA (*Figura 10*).

Cuando se analizó el contenido del citocromo CYP17 en estos folículos, se observó un efecto similar al obtenido con el tratamiento de LA *in vivo*. La co-incubación con FSH+LA disminuyó significativamente los niveles de esta enzima a las 12 hs de incubación ( $0,16 \pm 0,03$ ) comparado a aquellos folículos incubados solo en presencia de la gonadotrofina (FSH:  $0,51 \pm 0,04$ ; FSH+LA:  $0,16 \pm 0,03$ ,  $p < 0,05$ ) (*Figura 11*). A las 24 hs de incubación, el contenido de la CYP17 en ambos grupos es similar. De forma coincidente a lo observado anteriormente, a las 48 hs de incubación no se detectó a esta proteína mediante la técnica utilizada.

Como se puede observar en la *Figura 12*, los niveles proteicos de la enzima CYP11A1 no se modificaron de forma significativa a lo largo de los tiempos analizados entre los distintos grupos experimentales (*Figura 12*). Nuevamente, estos resultados coincidieron con lo obtenido anteriormente durante el tratamiento de LA *in vivo*.

*Contenido de StAR en folículos incubados en presencia de FSH y FSH+LA*

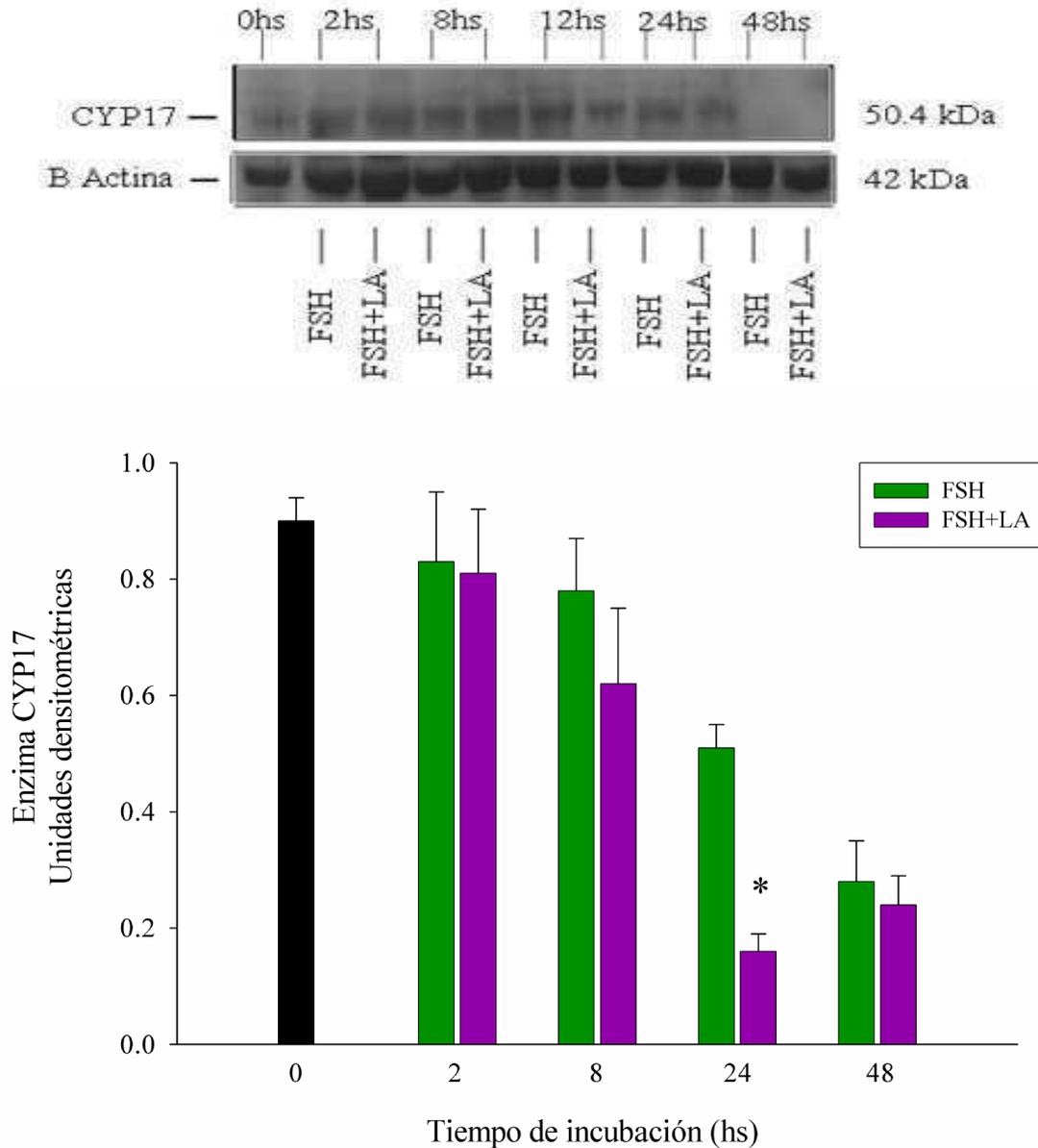
**Figura 10**



Los folículos antrales se aislaron de ovarios de animales estimulados con PMSG durante 48 hs. Se incubaron en presencia de FSH y FSH+LA. De los mismos se extrajeron proteínas y se corrieron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. El panel superior muestra un inmunoblot representativo de tres experimentos independientes. En el panel inferior se observa el análisis densitométrico de los diferentes experimentos expresados como el promedio de las unidades densitométricas  $\pm$  SEM. El asterisco (\*) indica diferencias significativas entre grupos dentro de un mismo intervalo de tiempo con  $p < 0,05$ .

**Contenido de la enzima CYP17 en folículos en cultivo en presencia de FSH y FSH+LA**

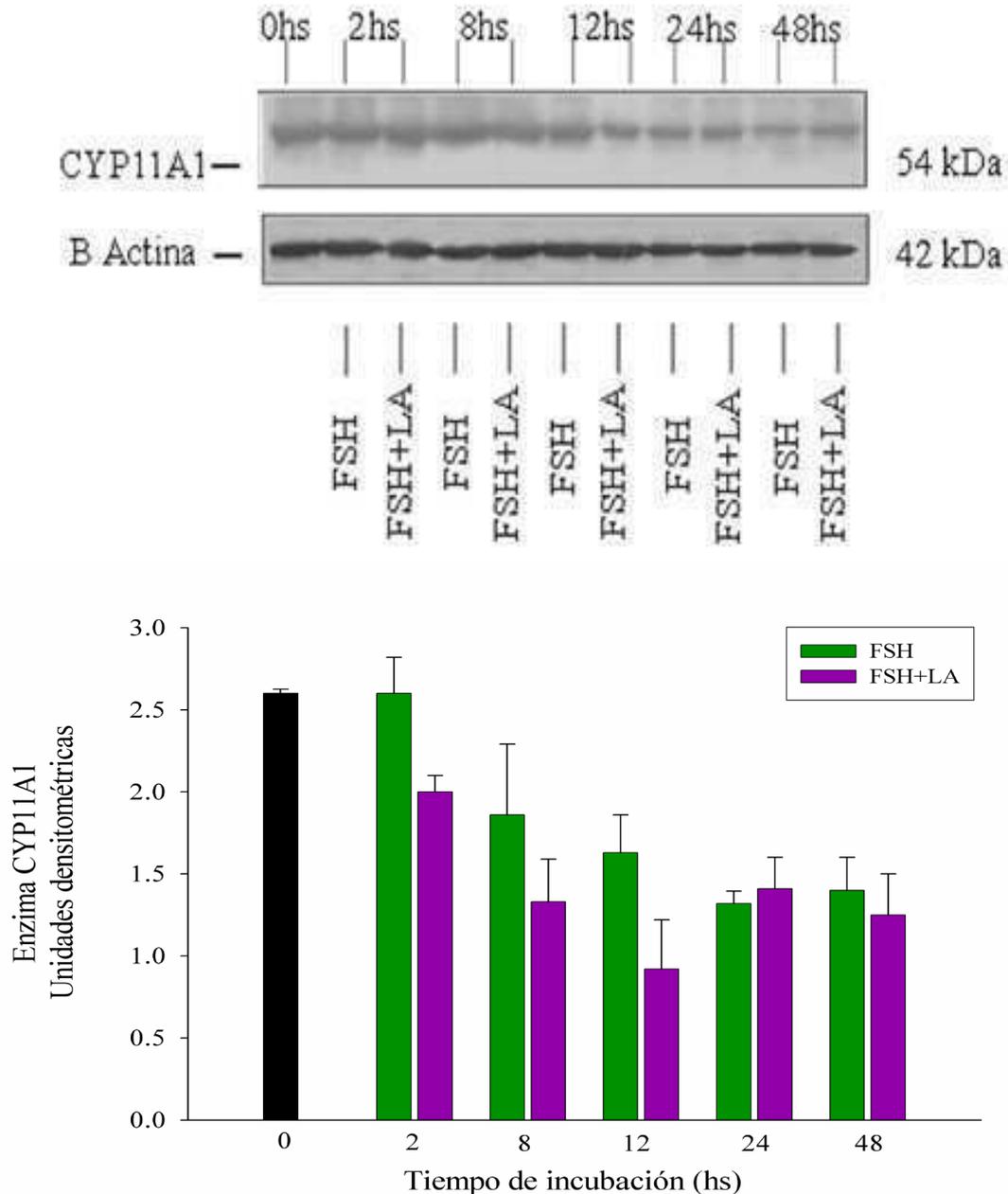
**Figura 11**



Los folículos antrales se aislaron de ovarios de animales estimulados con PMSG durante 48 hs. Se incubaron en presencia de FSH y FSH+LA. De los mismos se extrajeron proteínas y se corrieron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes. El panel superior muestra un inmunoblot representativo de tres experimentos independientes. En el panel inferior se observa el análisis densitométrico de los diferentes experimentos expresados como el promedio de las unidades densitométricas  $\pm$  SEM. El asterisco (\*) indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos dentro de un mismo intervalo de tiempo.

**Contenido de CYP11A1 en folículos en cultivo en presencia de FSH y FSH+LA**

**Figura 12**



Los folículos antrales se aislaron de ovarios de animales estimulados con PMSG durante 48 hs. Se incubaron en presencia de FSH y FSH+LA. De los mismos se extrajeron proteínas y se corrieron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. El panel superior muestra un inmunoblot representativo de tres experimentos independientes. En el panel inferior se observa el análisis densitométrico de los diferentes experimentos expresados como el promedio de las unidades densitométricas  $\pm$  SEM. El asterisco (\*) indica diferencias significativas entre grupos dentro de un mismo intervalo de tiempo con  $p < 0,05$ .

### *3.1 Efecto de LA sobre la expresión de factores angiogénicos y sus receptores en folículos ováricos de ratas prepúberes superovuladas*

#### **a. Medición del contenido folicular de los factores angiogénicos VEGF y ANGPT-1 en folículos de ratas superovuladas tratadas con análogos de GnRH-I**

Dada las evidencias citadas en la Introducción de este trabajo acerca del rol de los análogos de GnRH como inhibidores del desarrollo folicular e inductores de la atresia, nos pareció crucial analizar la expresión de factores angiogénicos relevantes en el ovario, ya que el desarrollo vascular está considerado como un paso limitante en la selección del folículo dominante y en la atresia folicular. VEGF es el principal factor involucrado en la angiogénesis, la formación y diferenciación de la red vascular. Pero este factor, requiere de la acción coordinada de otros factores entre los que se encuentran los pertenecientes a la familia de las angiopoyetinas. De éstas, la Angiopoietina-1 (ANGPT1) se destaca por ser un agonista endógeno de VEGF, participando en la maduración y estabilidad de la vasculatura recién formada [20].

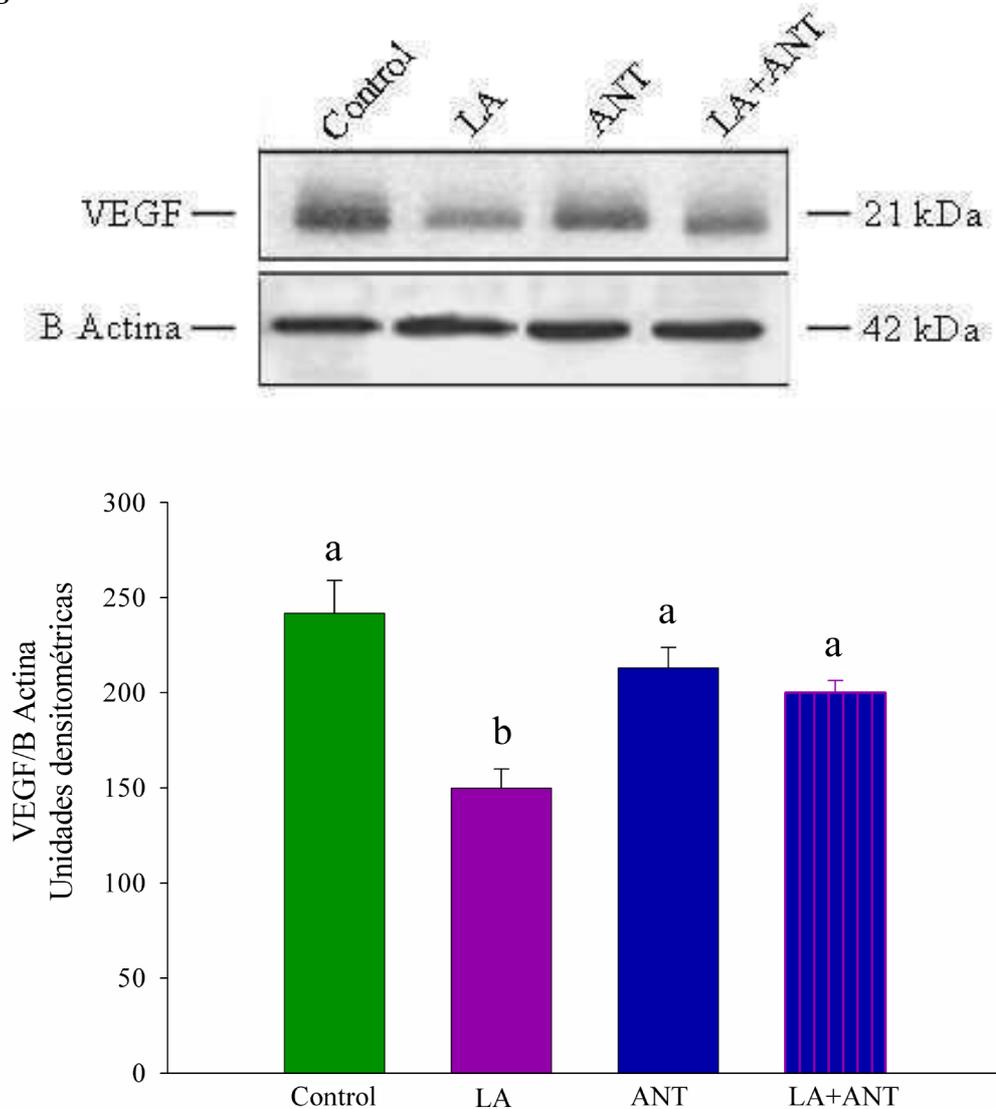
En el presente experimento se analizó la expresión de estos factores angiogénicos, VEGF y ANGPT-I, en folículos preovulatorios de ratas superovuladas (grupo Control) y tratadas con LA (Grupo LA), Antide, un antagonista de GnRH-I (Grupo ANT) y LA+Antide (Grupo LA+ANT) durante 48 hs. Los animales recibieron PMSG simultáneamente con la inyección del o los análogos según los distintos grupos. Esta última inyección se repitió cada 12 hs durante 48 hs, los animales se sacrificaron a las 3 hs luego de la última inyección y se aislaron los folículos para la realización de Western blot.

Luego del tratamiento con LA se observó una disminución significativa en la expresión del factor VEGF (*Figura 13*), la cual se revirtió con el co-tratamiento de LA y Antide (Control:  $241,81 \pm 17,26$ ; LA:  $149,8 \pm 10,13$ ; LA+Ant:  $200 \pm 6,5$ ,  $p < 0,05$ ). El tratamiento con Antide solo, no produjo cambios significativos en el contenido de VEGF comparado al grupo Control (*Figura 13*). El objetivo de la administración del antagonista de GnRH-I, fue bloquear la acción de los péptidos de GnRH endógenos producidos por el ovario y determinar si el efecto de LA es a través de su unión a receptores ováricos de GnRH-I.

De forma similar a lo descrito para VEGF, se puede observar en la *Figura 14* que el tratamiento con LA disminuyó de forma significativa los niveles de la proteína ANGPT-1 comparado al grupo Control, y este resultado se revirtió con el co-tratamiento con Antide (C:  $466,1 \pm 33,9$ ; LA:  $235,9 \pm 48,8$ ; LA+Ant:  $499 \pm 37$ ;  $p < 0,05$ ). Nuevamente, no se observaron diferencias significativas en el grupo Antide solo respecto del grupo Control.

*Contenido folicular de VEGF en folículos de ratas superovuladas tratadas con análogos de GnRH-I*

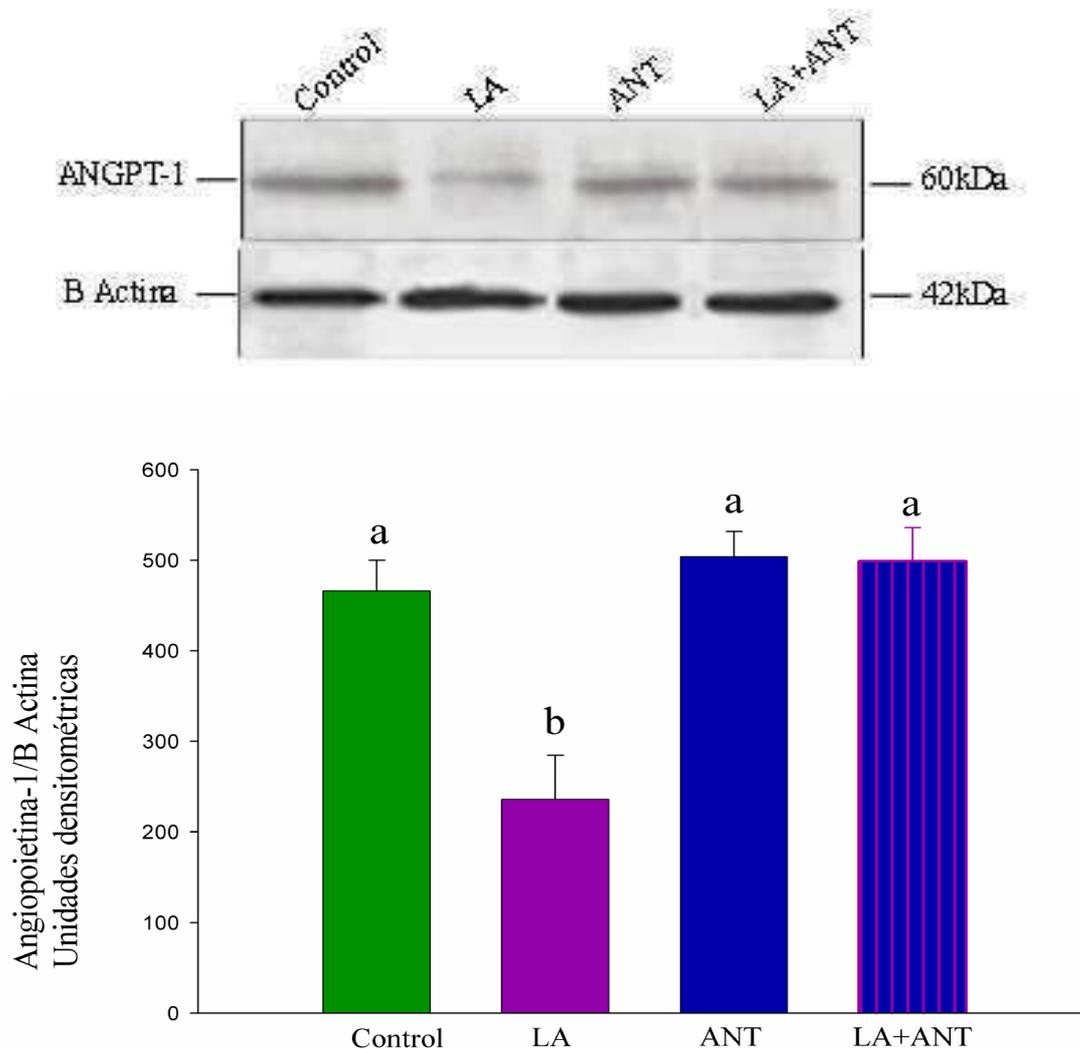
**Figura 13**



Ratas prepúberes fueron estimuladas con PMSG (Control) y cada 12 hs se les administró LA (0,5 $\mu$ g/rata), Antide (5 $\mu$ g/rata) o LA+Antide durante 48 hs. Los folículos antrales se aislaron por microdissección 3 hs luego de la última inyección. De los mismos se extrajeron proteínas y se separaron en geles desnaturizantes de poliacrilamida. El panel superior muestra un inmunoblot representativo de tres experimentos independientes. En el panel inferior se observa el análisis densitométrico de los diferentes experimentos expresados como el promedio de las unidades densitométricas  $\pm$  SEM. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos experimentales con  $p < 0,05$ .

*Contenido folicular de ANGPT-1 en folículos de ratas superovuladas tratadas con análogos de GnRH-I*

**Figura 14**



Los animales fueron sometidos a los mismos tratamientos que para la determinación del contenido de VEGF. Los folículos antrales se aislaron por microdissección 3 hs luego de la última inyección y se extrajeron las proteínas. Los extractos se separaron en geles desnaturizantes de poliacrilamida. El panel superior muestra un inmunoblot representativo de tres experimentos independientes. En el panel inferior se observa el análisis densitométricos de los diferentes experimentos expresados como el promedio de las unidades densitométricas  $\pm$  SEM. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos experimentales con  $p < 0,05$ .

## **b. Determinación del contenido de los receptores de factores angiogénicos Flk-1/KDR y Tie-2 en folículos de ratas superovuladas tratadas con análogos de GnRH-I**

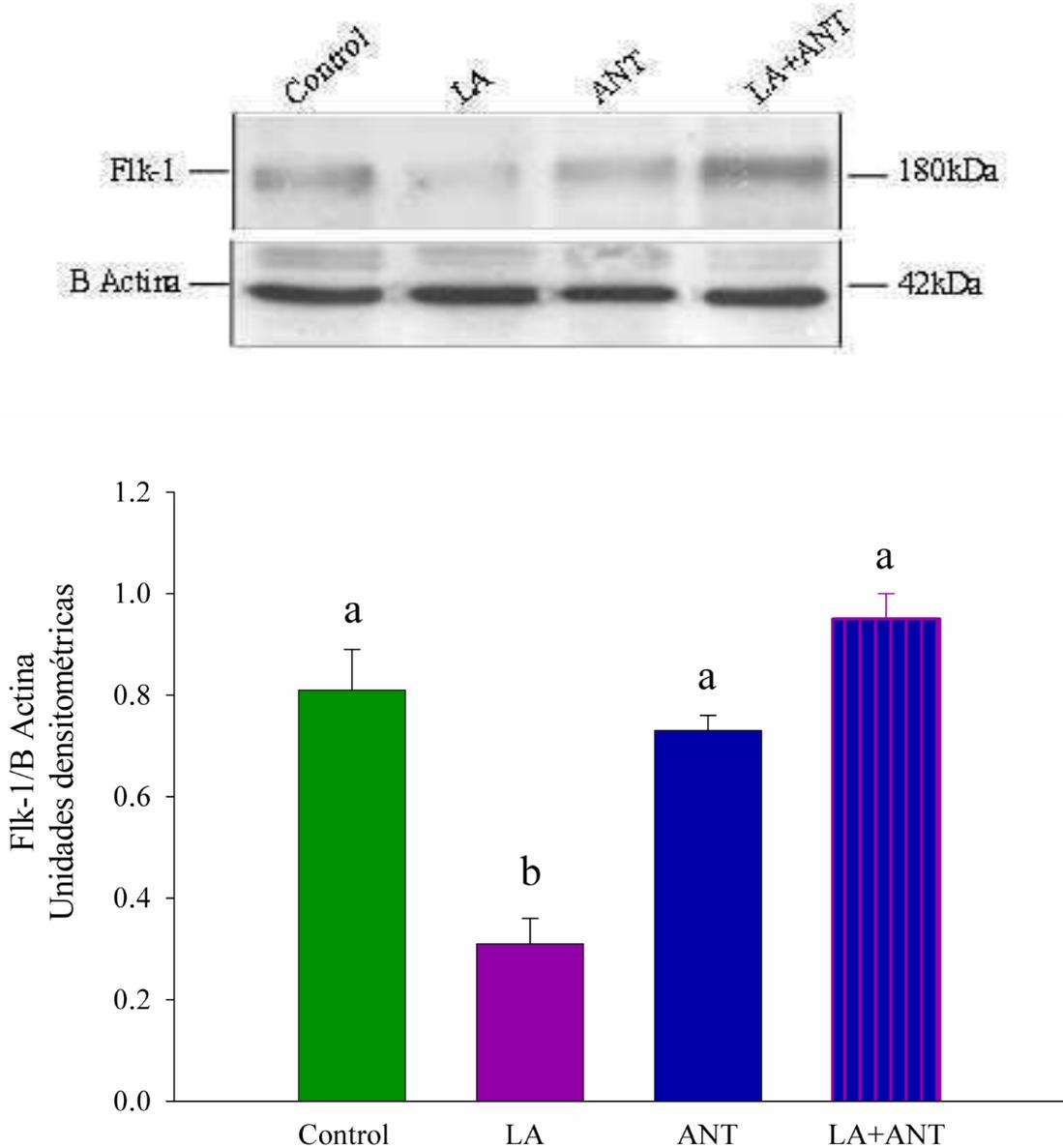
El receptor Flk-1/KDR es el principal mediador de los efectos angiogénicos ejercidos por VEGF y, como ya hemos citado, VEGF es el principal factor angiogénico en el ovario. Por esta razón, analizamos los niveles proteicos del receptor en los folículos de los animales que recibieron los distintos tratamientos.

En el grupo LA se observó que el contenido de Flk-1 es significativamente menor comparado con lo que se observa en el grupo Control (*Figura 15*) (C:  $0,81 \pm 0,08$ ; LA:  $0,31 \pm 0,05$ ;  $p < 0,05$ ). Nuevamente, el efecto inhibitorio del agonista se vió revertido por el co-tratamiento con el Antide y este no produjo cambios per sé (grupo ANT) (C:  $0,81 \pm 0,08$ ; LA:  $0,31 \pm 0,05$ ; LA+Ant:  $0,95 \pm 0,05$ ;  $p < 0,05$ ).

Además, se analizó el contenido proteico del receptor Tie-2, el cual es activado por la proteína ANGPT-I. Como ya hemos descrito, esta angiopoietina es crucial en el establecimiento de la nueva vasculatura, ya que cumple una función importante en la estabilización y maduración de los vasos sanguíneos. Contrario a lo observado en el caso de Flk-1, no se observaron cambios significativos en el contenido folicular del receptor Tie-2 con ninguno de los tratamientos utilizados (*Figura 16*).

*Contenido folicular del receptor Flk-1/KDR en folículos de ratas superovuladas tratadas con análogos de GnRH-I*

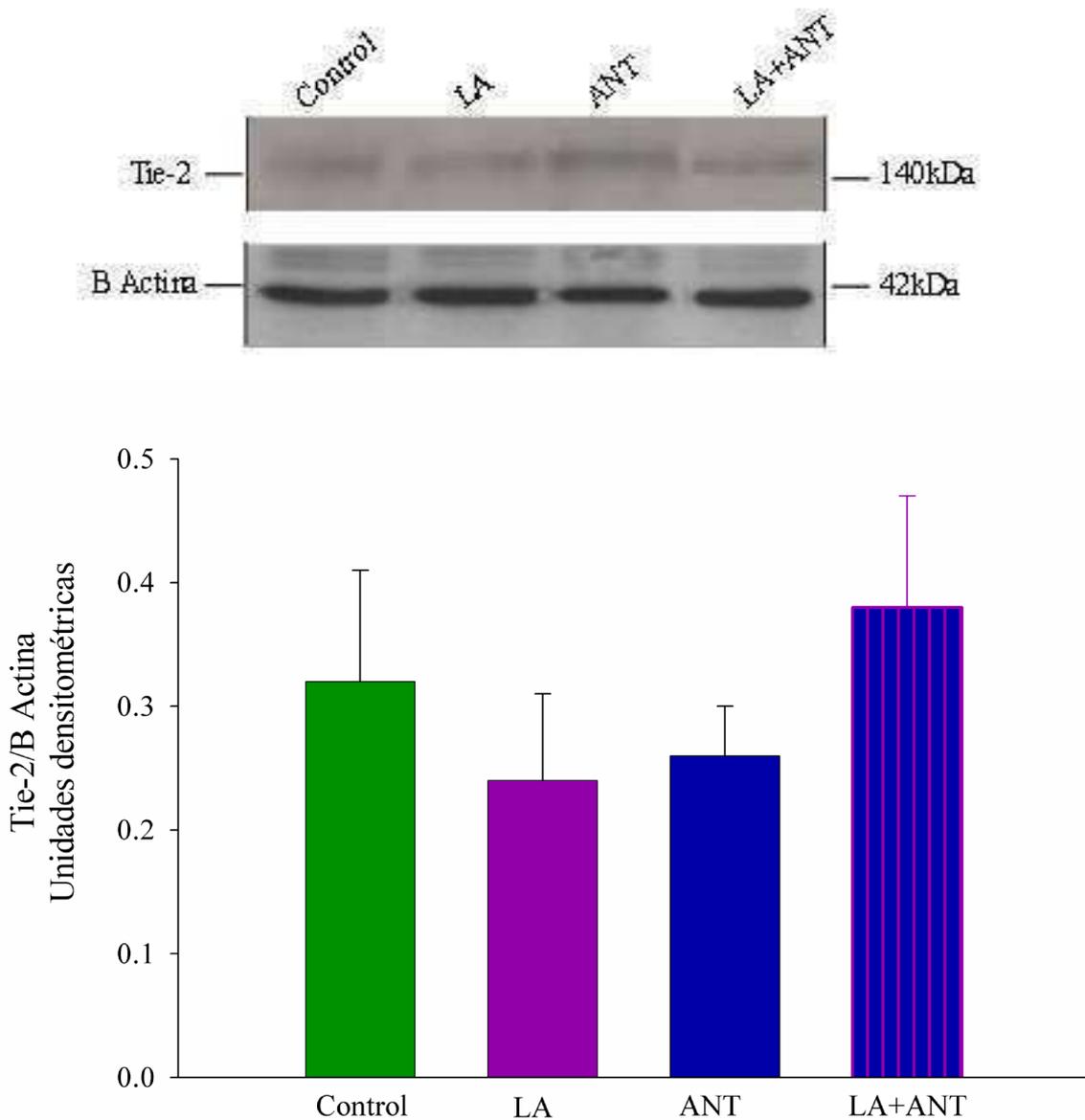
**Figura 15**



Los animales fueron sometidos a los mismos tratamientos que para la determinación del contenido de los factores angiogénicos. Los folículos antrales se aislaron por microdissección 3 hs luego de la última inyección y se extrajeron las proteínas. Los extractos se separaron en geles desnaturizantes de poliacrilamida. El panel superior muestra un inmunoblot representativo de tres experimentos independientes. En el panel inferior se observa el análisis densitométrico de los diferentes experimentos expresados como el promedio de las unidades densitométricas  $\pm$  SEM. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos experimentales con  $p < 0,05$ .

*Contenido folicular del receptor Tie-2 en folículos de ratas superovuladas tratadas con análogos de GnRH-I*

**Figura 16**



Los animales fueron sometidos a los mismos tratamientos que para la determinación del contenido de los factores angiogénicos. Los folículos antrales se aislaron por microdissección 3 hs luego de la última inyección y se extrajeron las proteínas. Los extractos se separaron en geles desnaturizantes de poliacrilamida. El panel superior muestra un inmunoblot representativo de tres experimentos independientes. En el panel inferior se observa el análisis densitométricos de los diferentes experimentos expresados como el promedio de las unidades densitométricas  $\pm$  SEM.

#### *4.1 Efecto de análogos de GnRH-I sobre la apoptosis en folículos ováricos de ratas prepúberes superovuladas*

##### **a. Determinación del contenido proteico y actividad enzimática de la enzima caspasa-3 en folículos de ratas superovuladas tratadas con análogos de GnRH-I**

En estudios anteriores, hemos demostrado que el tratamiento con LA produce un aumento en el porcentaje de células apoptóticas de folículos en desarrollo, como también un aumento en la fragmentación espontánea del ADN característico de la apoptosis en folículos en cultivo en medio libre de suero [92]. En este mismo trabajo se observó que la co-inyección con Antide revierte este efecto. Dado que la enzima caspasa-3 es la principal efectora de la muerte celular programada [80-82;328], se determinó el contenido folicular de esta enzima, así como también su actividad.

Por análisis mediante western blot, se observó un aumento significativo del fragmento activo de 17 kDa de la caspasa-3 luego del tratamiento con LA comparado con el grupo Control (C:  $9199 \pm 299$ ; LA:  $11636 \pm 321$ ;  $p < 0,05$ ) (*Figura 17*). Sorpresivamente, el tratamiento con Antide disminuyó significativamente los niveles de este fragmento comparado al grupo Control (C:  $9199 \pm 299$ ; Ant:  $7000 \pm 250$ ;  $p < 0,05$ ). Una vez más, el tratamiento con LA+ANT produjo una reversión del efecto producido por el tratamiento con LA (*Figura 17*) (C:  $9199 \pm 299$ ; LA:  $11636 \pm 321$ ; LA+Ant:  $9467 \pm 267$ ;  $p < 0,05$ ). Por el contrario, ninguno de los tratamientos afectó los niveles de la procaspasa-3 (33 kDa, forma inactiva). Además, se observó un fragmento de 20 kDa (p20) que constituye un intermediario en el procesamiento de esta enzima, el cual se genera por clivaje de la procaspasa-3, dando un fragmento de 11 kDa y otro de 20 kDa. Este último se cliva nuevamente, y se obtiene el fragmento p17, forma activa de la caspasa-3.

Como se describió en *Materiales y Métodos*, se determinó la actividad de esta enzima mediante dos metodologías: **a.** utilizando un sustrato colorimétrico y **b.** determinando el grado de clivaje de la **Polimerasa Poli-ADP ribosa (PARP)**, sustrato de la caspasa-3 durante el proceso de apoptosis.

En primer lugar, se observó que en el grupo LA la actividad enzimática fue 1,8 veces mayor comparado al grupo Control (*Figura 18*) ( $p < 0,05$ ), siendo este efecto revertido por el co-tratamiento con ambos análogos. Nuevamente, el Antide (ANT)

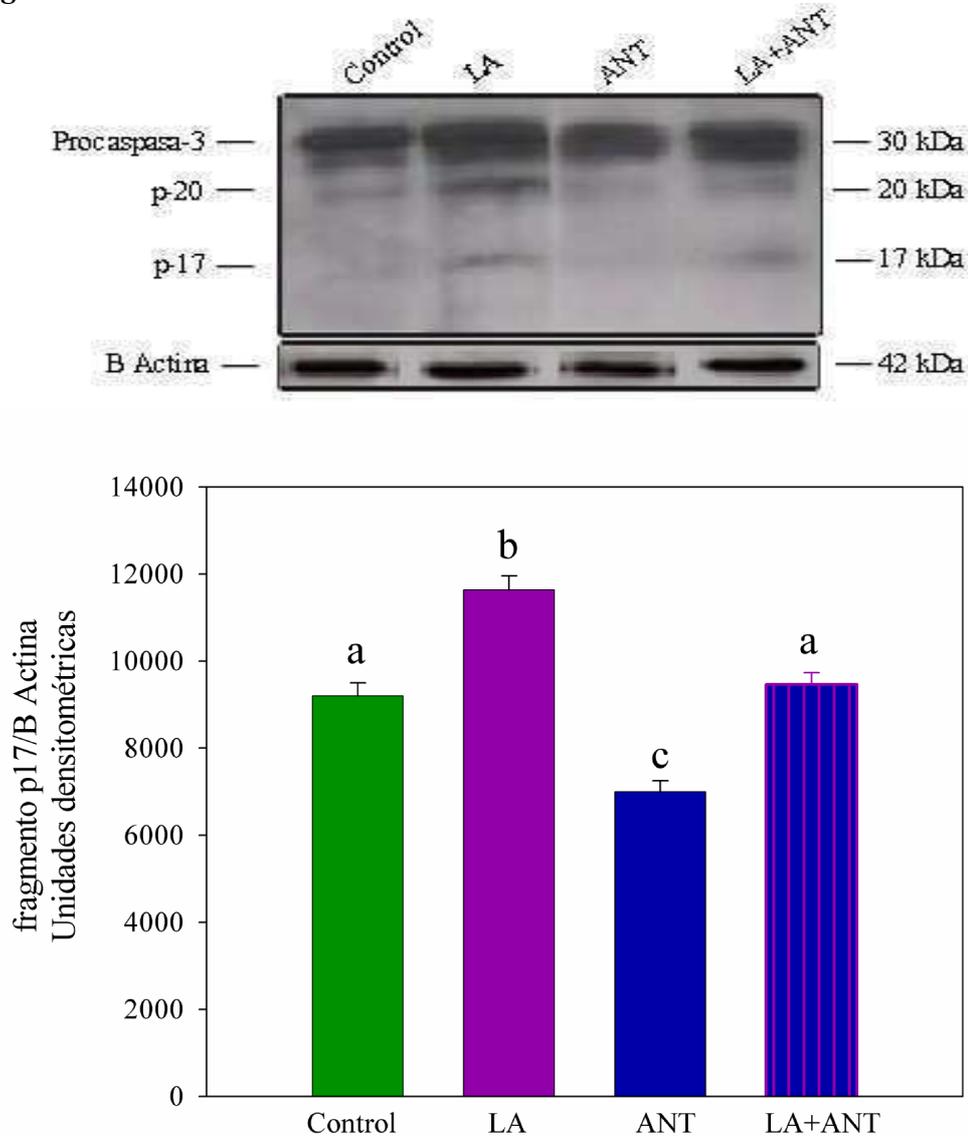
disminuyó los niveles de actividad 0,5 veces respecto del grupo Control ( $p < 0,05$ ). Cabe destacar, que la actividad observada mediante el clivaje del sustrato colorimétrico, es específica de la caspasa-3, ya que el agregado de su inhibidor, DEVD-CHO, bloqueó completamente la actividad observada en cada grupo.

**b. Clivaje de un sustrato de caspasa-3, Polimerasa Poli-ADP ribosa (PARP), en folículos de ratas superovuladas tratadas con análogos de GnRH-I**

De manera similar, cuando se analizó el clivaje de PARP por Western blot, se observó el mismo patrón que el descrito utilizando el ensayo colorimétrico. Los resultados mostraron un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en el fragmento de 85 kDa generado a partir del clivaje de su precursor 116 kDa, luego del tratamiento con LA (C:  $201,6 \pm 14,9$ ; LA:  $298,9 \pm 36,5$ ;  $p < 0,05$ ). Este efecto se revirtió con el tratamiento con el antagonista y sus valores fueron similares a los observados en el grupo Control (C:  $201,6 \pm 14,9$ ; LA:  $298,9 \pm 36,5$ ; LA+Ant:  $164 \pm 18,6$ ;  $p < 0,05$ ). Una vez más, la utilización simultánea de ambos análogos produjo un menor clivaje de PARP comparado al grupo Control ( $p < 0,05$ ) (*Figura 19*). Los tratamientos no afectaron la forma no procesada de 116 kDa de PARP.

*Contenido proteico folicular de la enzima caspasa-3 en folículos de ratas superovuladas tratadas con análogos de GnRH-I*

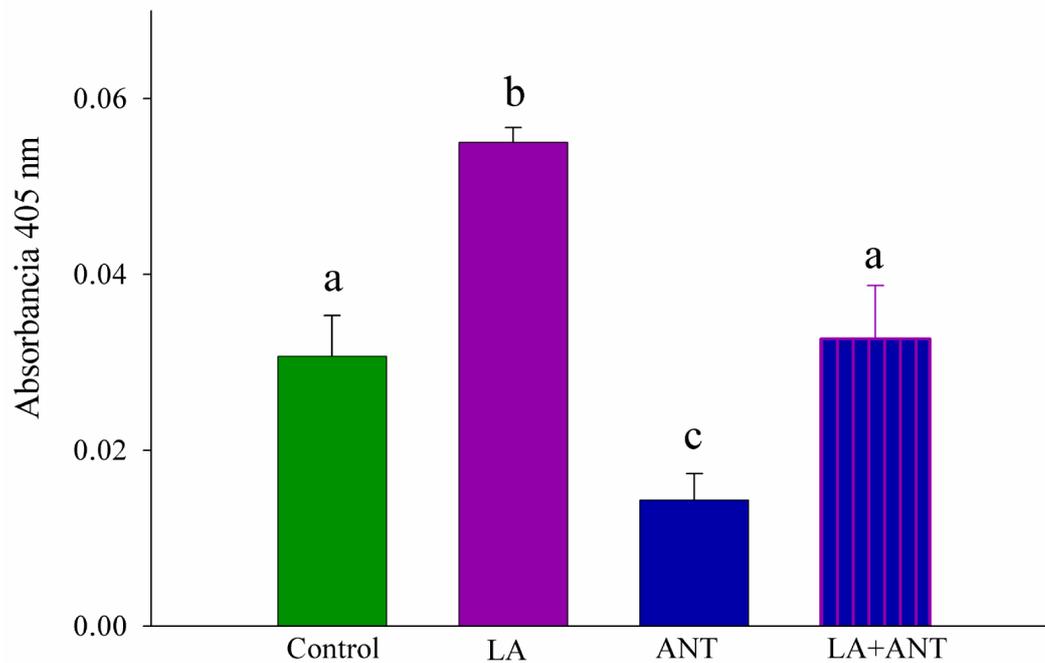
**Figura 17**



Los folículos antrales fueron aislados por microdissección luego de los correspondientes tratamientos y se realizaron extracciones proteicas las cuales se corrieron en geles de poliacrilamida. Las bandas correspondientes a la procaspasa-3 y sus fragmentos, generados como consecuencia de su activación, fueron visualizados con un anticuerpo que detecta ambos estados de la enzima. El panel superior muestra un inunoblot representativo de tres diferentes experimentos y en el panel inferior se observa el análisis densitométrico de la intensidad de la banda correspondiente al fragmento p17. Los resultados se encuentran expresados como el promedio de las unidades densitométricas  $\pm$  SEM. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos experimentales con  $p < 0,05$ .

*Actividad de la enzima caspasa-3 en folículos ováricos luego del tratamiento con análogos de GnRH-I*

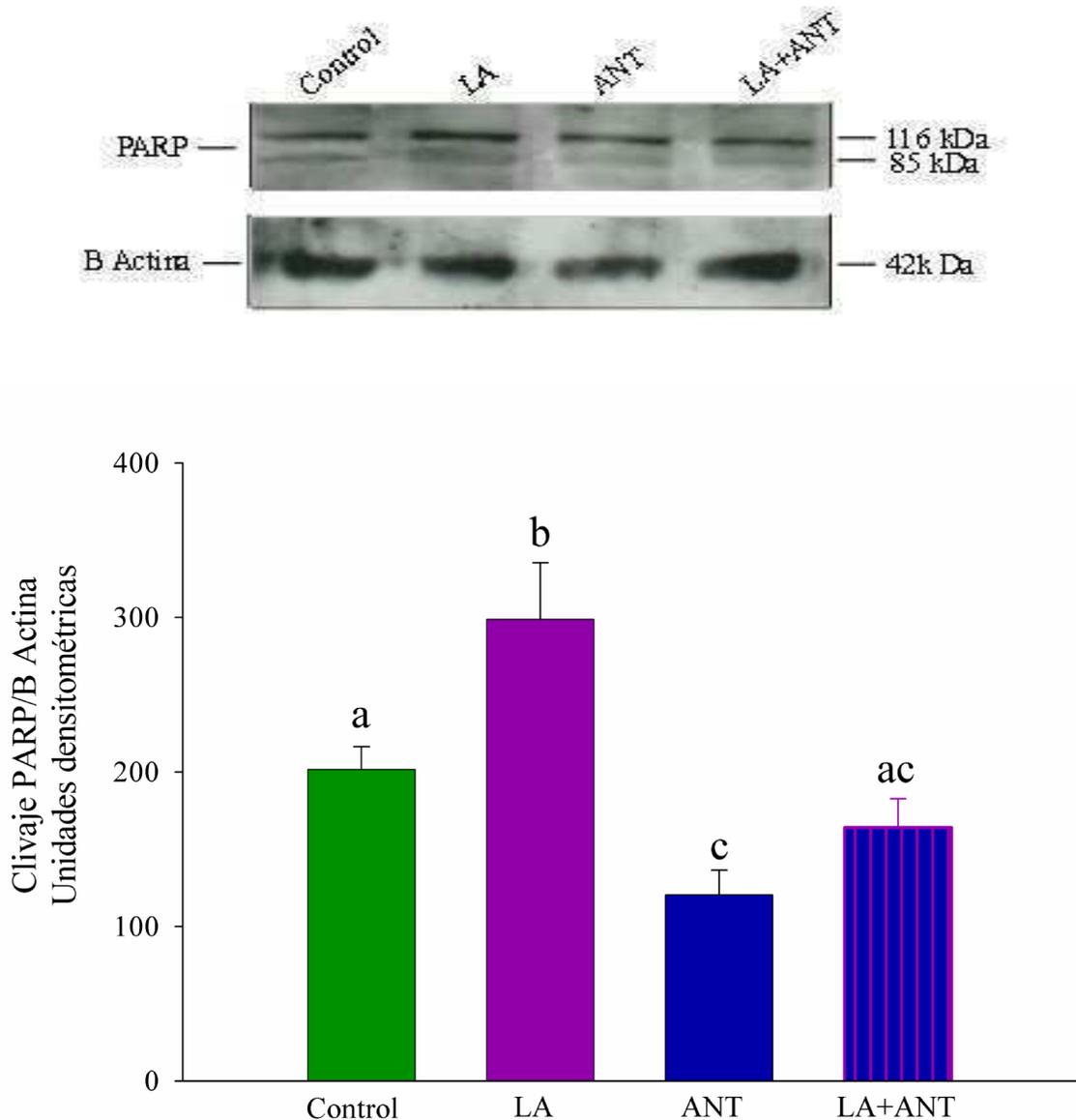
**Figura 18**



Los folículos antrales fueron aislados por microdissección luego de los tratamientos y se realizó una extracción proteica de los pools de folículos obtenidos de los ovarios de los animales pertenecientes a los diferentes grupos experimentales. La actividad enzimática se determinó utilizando un ensayo colorimétrico que incluye un sustrato de la caspasa-3 que al ser clivado libera un cromóforo. Las muestras fueron incubadas a 37°C durante 90 minutos, tiempo en el cual se determinó la absorbancia de las mismas. Los resultados se encuentran expresados como el promedio de las absorbancias en diferentes experimentos  $\pm$  SEM. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos experimentales con  $p < 0,05$ .

*Clivaje de la Polimerasa Poli-ADP ribosa en folículos de ratas superovuladas tratadas con análogos de GnRH-I*

**Figura 19**



El panel superior muestra un inmunoblot representativo de diferentes experimentos en el que se visualiza la proteína PARP de 116 kDa y el fragmento de 85 kDa generado por su clivaje. En el panel inferior se observa la cuantificación del fragmento de 85 kDa determinada mediante densitometría de la correspondiente banda. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias de PARP relativizado a  $\beta$  Actina  $\pm$  SEM. Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los grupos experimentales con  $p < 0,05$ .

### **c. Localización folicular de la caspasa-3 en ovario de ratas superovuladas tratadas con análogos de GnRH-I**

Boone y col. [83] han descrito la localización de la caspasa-3 principalmente en células de la teca de folículos de rata tratadas con gonadotrofinas. Estos autores observaron en folículos saludables que la enzima se localiza en células de la teca y esta ausente en células de granulosa. Por el contrario, en folículos atresicos observaron expresión de la enzima en células de granulosa.

En el presente trabajo se analizó la localización de la caspasa-3 en folículos preantrales (FP) y antrales (FA), en secciones de ovario de ratas que recibieron los cuatro tratamientos. En los FP no se observó marca positiva en células de granulosa con ninguno de los tratamientos aplicados (*Figura 20*). Sin embargo, se detectó una leve inmunoreactividad en células de la granulosa de FA luego del tratamiento con LA y LA+ANT (*Tabla 3, Figura 20: C y D, G y H, respectivamente*).

De forma coincidente con las observaciones realizadas por Boone y col. [83], las células de la teca de los FA poseen expresión de caspasa-3 en todos los grupos estudiados, siendo esta más intensa en el grupo LA (*Figura 20: C y D*). En los FP, solamente las células de la teca poseen expresión de esta enzima en el grupo Control y LA (*Figura 20: B-D*), siendo nuevamente su expresión mayor en el grupo LA (*Figura 20: C y D*). Cabe destacar que en el grupo LA, en el cual se observaron intensidades mayores de esta enzima en células de la teca respecto de los otros grupos analizados, la caspasa-3 se localizó principalmente en el núcleo de estas células (*Figura 20: C y D*). Esta localización nuclear observada es interesante si recordamos que una vez producido el clivaje de caspasa-3 y en consecuencia su activación, la enzima se traslada al núcleo donde se encuentran sus sustratos.

**Tabla 3:** Inmunohistoquímica de la enzima caspasa-3 luego del tratamiento con análogos de GnRH-I

<b>Grupos Experimentales</b>	<b>Folículos preantrales</b>		<b>Folículos antrales</b>	
	<b>cG</b>	<b>cT</b>	<b>cG</b>	<b>cT</b>
Control	-	+	-	++
LA	-	++	-/+	+++
ANT	-	-	-	+
LA+ANT	-	-	-/+	+

**Intensidad de señal:** - ausente; -/+ débil; + moderada; ++ intensa; +++ muy intensa

**cG:** células de granulosa y **cT:** células de la teca



# ***DISCUSSION***

---

---

## DISCUSION

Los análogos de la Hormona Liberadora de Gonadotrofinas (GnRH), se han utilizado por más de dos décadas para controlar la función ovárica, ya sea estimulando o inhibiendo el eje Hipotálamo-Hipófisis. En muchas pacientes forman parte del tratamiento de las pacientes durante ciclos de hiperestimulación controlada, en tratamientos de fertilización in vitro (FIV). Además, se utilizan frecuentemente en enfermedades humanas como pubertad precoz, poliquistosis ovárica, endometriosis y miomatosis. Estos análogos se unen al receptor de GnRH hipotalámico, pero poseen mayor vida media y biodisponibilidad que el GnRH endógeno. A los individuos sujetos a ciclos de hiperestimulación ovárica, se les administran dosis suprafsiológicas de gonadotrofinas exógenas y estos análogos se inyectan con el objeto de suprimir la secreción de la hipófisis, previniendo de esta forma la liberación prematura de LH endógena. De lo contrario, la secreción espontánea de esta hormona induciría la ovulación y llevaría a la cancelación de estos ciclos de estimulación en tratamientos de reproducción asistida. En el caso de los agonistas de GnRH (GnRH-a), la unión de estos al receptor de GnRH en las células gonadotropas de las hipófisis, provoca un efecto estimulador transitorio (*flare up*), y posteriormente, una supresión de la secreción de gonadotrofinas a través de la desensibilización y regulación negativa (*downregulation*) de su receptor. En cambio, los antagonistas de GnRH (GnRH-ant) producen una supresión inmediata de la liberación de gonadotrofinas, uniéndose de forma competitiva a los receptores de GnRH en los gonadotropos y compitiendo con el GnRH endógeno. Luego de la identificación de receptores en tejidos extrahipofisarios en humanos, se ha comenzado a prestar especial atención a los agonistas y frente a los efectos negativos sobre el ovario que se han observado, se han estandarizado diferentes protocolos de administración en los que varían la dosis y período de tratamiento [329].

Los primeros trabajos realizados en cuanto a los agonistas de GnRH y sus efectos extrahipofisarios, describieron la inhibición del aumento de peso de los ovarios y útero inducido por la administración de hCG a ratas hipofisectomizadas, así como también la inhibición de la esteroidogénesis estimulada por FSH en células de la granulosa en cultivo [303]. Recientemente, en nuestro laboratorio se ha demostrado una inhibición en el desarrollo folicular inducido por gonadotrofinas en ratas tratadas *in vivo* con el agonista de GnRH, acetato de leuprolide, como también un aumento en el proceso de apoptosis en folículos preantrales y antrales [315].

Debido al hecho de que en los protocolos de hiperestimulación mencionados, se observa una disminución de la respuesta a las gonadotrofinas administradas exógenamente en cada repetición del ciclo, y las evidencias que hemos citados de los efectos extragonadales de los análogos de GnRH, hemos postulado al GnRH-I como un factor intraovárico que actuaría de forma local inhibiendo procesos esenciales involucrados en el desarrollo de los folículos ováricos y en la selección del/de los folículos dominantes. Por lo tanto, en el presente trabajo de tesis se han realizado experimentos para probar la hipótesis planteada de que el GnRH-I interfiere en los procesos de síntesis y metabolismo de esteroides y en la angiogénesis ovárica. A continuación se detallan las conclusiones que se obtuvieron a partir de los resultados de los experimentos llevados a cabo.

Las determinaciones tanto séricas como tisulares (foliculares) de los esteroides ováricos en el grupo Control y LA luego de 48 hs de tratamiento, permitieron describir el perfil hormonal de los animales estimulados con gonadotrofinas luego del tratamiento *in vivo* con el agonista de GnRH-I: Acetato de Leuprolide, LA. Se observó una estimulación producida por LA en la síntesis de progesterona folicular, no detectada a nivel sérico. En este punto, fue interesante observar que la síntesis del metabolito inactivo de la progesterona, la 20 $\alpha$ -hidroxiprogesterona, también fue estimulada por el tratamiento. Por el contrario, se observó un efecto inhibitor del LA sobre la síntesis de andrógenos; testosterona y androsterona, como también, del estrógeno, estradiol. Asimismo, se analizaron los niveles séricos de progesterona y androsterona en función del tiempo de la administración de LA. En este caso, se administró una dosis única y mayor de LA y se determinó la síntesis de ambos esteroides a tiempos cortos (2 y 8 hs) y tiempos más largos (24 y 48 hs). Se observó una estimulación en la síntesis de progesterona a las 8 hs luego de la administración del análogo y una inhibición en la síntesis de androsterona en este mismo intervalo de tiempo.

Respecto a la estimulación observada en la síntesis de progesterona, Clark M [330] no ha observado estimulación de su síntesis en extractos de ovario de ratas hiperestimuladas con PMSG tratada con un análogo de GnRH. Sin embargo, describió un efecto estimulador cuando utilizó otro análogo de GnRH, en células de la granulosa en cultivo en combinación con concentraciones mínimas “subóptimas” de LH. Este mismo efecto estimulador fue observado cuando se co-incubó las células con FSH y el análogo de GnRH [330]. Similar a lo descrito en nuestro trabajo, Elkhholm y col. [306]

han demostrado un aumento en los niveles de progesterona plasmática en ratas hipofisectomizadas tratadas con el mismo análogo que el utilizado por Clark M. Es importante destacar que en nuestro trabajo, la dosis de PMSG utilizada para estimular a estos animales, fue mayor que la utilizada en el trabajo citado de Clark M., con lo cual, el co-cultivo con FSH de las células de la granulosa que utilizó el autor, se acercaría más a las condiciones de nuestros animales en cuanto a la concentración de FSH a la cual las células foliculares estuvieron expuestas.

En esta Tesis se ha observado un aumento en el metabolismo de la progesterona hacia  $20\alpha$ -hidroxiprogesterona con el tratamiento con LA. Este resultado coincide con la estimulación de la actividad de la enzima  $20\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $20\alpha$ -HSD) observada en células de la granulosa, provenientes de ratas hipofisectomizadas, incubadas con un análogo de GnRH [301]. Además, estos autores demostraron en estas células que la actividad de la  $20\alpha$ -HSD aumentaba con el agregado del análogo, y este efecto se observaba tanto en su actividad basal como en su actividad estimulada por FSH.

Contrariamente a los efectos estimuladores hallados hasta el momento, en nuestro trabajo se observó una disminución en la síntesis de los andrógenos testosterona y androsterona luego del tratamiento *in vivo* con LA, tanto a nivel sérico como tisular en ratas estimuladas con PMSG. Magoffin y col. [323;331] han demostrado en cultivos de células intersticiales ováricas de ratas hipofisectomizadas que, tanto GnRH como un análogo del mismo, inhiben la producción de androsterona estimulada por LH. Sin embargo, solo el análogo inhibe la síntesis de androsterona basal.

Estos resultados indicarían que GnRH-I posee, tanto efectos estimuladores como inhibidores, sobre la síntesis de esteroides gonadales y que esta acción podría ser directa, a través de la unión de este factor a receptores localizados en las células foliculares. Específicamente, la acción estimuladora observada en el metabolismo de la progesterona hacia la  $20\alpha$ -hidroxiprogesterona, se debería a la acción del análogo en células de la granulosa; y por el contrario, la acción inhibitoria en la síntesis de andrógenos, demostraría su acción en células de la teca. Por otro lado, en base a nuestros resultados, la inhibición en la síntesis de estradiol se debería a una menor disponibilidad de su sustrato, es decir, de andrógenos. La especificidad celular de la

acción de GnRH-I puede deducirse de la localización de las enzimas responsables de la síntesis de los respectivos esteroides.

Con estas observaciones, sugerimos que el desorden en los niveles y relaciones de esteroides generado por el tratamiento con LA durante el desarrollo folicular inducido por gonadotrofinas, afectaría la foliculogénesis, retrasando el desarrollo folicular o induciendo la atresia de los folículos en desarrollo. En relación a esta suposición, en nuestro laboratorio [315] hemos descrito un aumento en el número de folículos preantrales y atrésicos, y una disminución en el número de folículos antrales luego del tratamiento de 48 hs con LA. Asimismo, se observó que con tratamientos con LA más prolongados (7 días) y con estimulación adicional con hCG, el número de cuerpos lúteos disminuye significativamente cuando se lo compara con un grupo tratado con gonadotrofinas únicamente [313].

Los esteroides analizados en esta tesis poseen distintos efectos sobre la foliculogénesis y además, esta diversidad se debe al estadio folicular al cual nos referimos. La progesterona es inhibitoria de funciones esenciales para el desarrollo folicular como ser la síntesis de estradiol estimulada por FSH [187;332;333], y de la transición de los folículos primordiales al estadio de primarios [188]. Sin embargo, es un factor de supervivencia en folículos periovulatorios, es decir de aquellos que se encuentran próximos a la ruptura folicular para la liberación del oocito [334]. Los andrógenos poseen efectos adversos sobre la foliculogénesis. En la rata, los andrógenos alteran el desarrollo folicular a través de un aumento de la atresia [207-209], inhiben el receptor de LH estimulado por FSH [211;212] y estimulan la apoptosis en células de la granulosa [96]. Por el contrario, los estrógenos son esenciales para el desarrollo folicular y, uno de los efectos observados es la disminución de la apoptosis en células de granulosa de folículos preantrales [96]. Es importante destacar que se observa un aumento en la relación andrógenos/estrógenos en el fluido folicular de folículos atrésicos [97;335] y que la producción de estrógenos siempre se encuentra disminuída en estos folículos [113;336].

Dada la estimulación en la síntesis de progesterona observada luego de las 8 hs de administrado el análogo, analizamos la expresión de la proteína StAR (Proteína Reguladora de la Síntesis de Esteroides Aguda) en folículos de animales Control (tratados con PMSG) y LA (tratados con PMSG+LA) a las 0, 2, 4 y 8 hs de tratamiento. El tratamiento con PMSG estimuló la expresión del ARN mensajero a las 4 hs luego de

su administración. Esta inducción coincide con el trabajo de Ronen-Fuhrman y col. [128] quienes describieron un aumento en la expresión de StAR en extractos de ovarios de ratas estimuladas con PMSG. Estos autores detectaron este aumento a las 8 hs de la administración de gonadotrofinas, de forma más tardía a la descrita en este trabajo. Una causa de este retraso, podría ser la menor dosis de PMSG que estos autores utilizaron para la estimulación de los animales. Por otro lado, el tratamiento con PMSG+LA produjo un aumento en los niveles foliculares del ARN mensajero de la StAR cuando los animales fueron sacrificados a las 2 hs de tratamiento. Este aumento rápido observado en la expresión del ARN mensajero de la proteína StAR luego del tratamiento con gonadotrofinas y/o LA, es la primera evidencia *in vivo* de la naturaleza aguda de la respuesta de la StAR. Como ya hemos descrito, la expresión de esta proteína está restringida a tejidos donde ocurren oxidaciones de esteroides a nivel de la mitocondria, sujetos a una regulación aguda de parte de AMP cíclico y hormonas tróficas [124]. Además, esta proteína es la mediadora del paso limitante en la síntesis de esteroides, la traslocación del colesterol desde la membrana externa de la mitocondria hacia la membrana interna, paso regulado durante la síntesis aguda de esteroides. Sin embargo, la StAR se sintetiza como un precursor de 37 kDa que es rápidamente importado a la mitocondria, donde es procesado a su forma final de 30 kDa. Esta forma final es una fosfo-proteína, la cual constituiría la forma activa de la proteína. Por esta razón, para poder comparar los niveles de esteroides observados con el tratamiento con LA y la actividad de esta proteína, fue imprescindible la determinación de sus niveles de expresión a nivel proteico en los folículos de las ratas estimuladas con gonadotrofinas. Pudimos observar que la gonadotrofina estimuló la expresión de StAR a medida que avanzó el tiempo de exposición a las mismas. Nuevamente, esta observación coincide con lo descrito por Ronen-Fuhrman y col. [128]. Paralelamente al aumento de la producción de progesterona observado luego de la administración de LA, el análogo aumentó el contenido folicular de la proteína StAR a las 2, 4 y 8 hs luego de su administración comparado al tratamiento con gonadotrofina solamente. Por lo tanto, con los resultados descritos hasta el momento, podemos atribuir el aumento de los niveles de progesterona observados luego del tratamiento con LA, a una mayor expresión y contenido de la proteína StAR. Por consiguiente, LA regularía a esta proteína, tanto a nivel transcripcional como traduccional y/o a nivel de su procesamiento a su forma final de 30 kDa.

Los estudios de inmunohistoquímica de la proteína StAR, nos permitieron describir el/los tipos celulares del folículo ovárico a los cuales se debía la inducción observada en la expresión de esta proteína luego del tratamiento con LA. Se ha descrito que luego de la administración de PMSG, la StAR se expresa en células tecaintersticiales mientras no se la detecta en células de la granulosa, donde comienza a expresarse luego de la administración de hCG [128]. Estos mismos autores no encontraron expresión de StAR en ovarios no estimulados con gonadotrofinas. Coincidentemente a lo descrito, en nuestro trabajo se observó que la proteína StAR se localiza en células intersticiales y tecaes luego del tratamiento con gonadotrofina, y no se detectó su expresión en células de la granulosa. Sin embargo, luego del cotratamiento con LA se detectó una expresión débil de la proteína StAR en células de la granulosa de folículos antrales. Fue interesante observar que el aumento de StAR producido luego de las 8 hs de la administración de LA, se localizó en células tecaes de folículos preantrales y antrales. Podemos deducir hasta ahora, que las células de la teca de los folículos antrales y preantrales serían las responsables del aumento de la StAR y por consiguiente, de la estimulación de la producción de Progesterona luego del tratamiento con LA. Respecto a la localización de la StAR, cabe destacar que la misma también fue observada en folículos atrésicos [128]. Además, estos mismos autores observan que la expresión de la proteína es específica de los folículos periovulatorios, mientras que no se encuentra en aquellos folículos que no llegarán a la ovulación.

Continuando con el camino biosintético de las hormonas esteroideas, se analizó el contenido folicular de la enzima CYP11A1 en ovarios de ratas prepúberes estimuladas con gonadotrofinas, dado que esta enzima constituye otro paso limitante en este proceso. Los niveles del citocromo no se vieron afectados por la administración de LA a ninguno de los tiempos estudiados. Tampoco se detectó alguna variación del citocromo en estos animales en función del tiempo de tratamiento. Estas observaciones coinciden con lo descrito para esta enzima, donde se observa una expresión constante

de la misma a nivel proteico luego de la administración de gonadotrofinas. Se observó que el ARN mensajero de esta enzima comienza a aumentar luego de aproximadamente 30 a 48 hs de la administración de gonadotrofinas [147] y posee otro aumento considerable luego de la administración de hCG en ratas prepuberes estimuladas [128]. Esta enzima ha sido descripta principalmente en células intersticiales y células tecales, las cuales expresan altas cantidades de CYP11A1, inclusive antes del tratamiento con gonadotrofinas [147]. En contraste a lo descripto en cuanto a la proteína StAR y la enzima CYP11A1, otros autores han observado una disminución en los niveles de ambas proteínas durante la preñez en un modelo de rata pseudopreñada [300;311] luego del tratamiento con un análogo de GnRH. Además, en nuestro laboratorio hemos descripto una disminución del citocromo CYP11A1 en cuerpo lúteo de ratas pseudopreñadas luego del tratamiento con LA. Dados estos resultados, atribuimos las diferentes respuestas observadas con los análogos de GnRH, a los diferentes estadios de desarrollo en el que se encuentra el folículo ovárico y consecuentemente, al grado de diferenciación de las células ováricas (folicular vs. luteal).

Hemos descripto la importancia de la relación andrógenos-estrógenos durante el desarrollo folicular y cómo esta relación cuando se encuentra elevada, lleva al folículo a la atresia [220]. Además, luego del estadio antral, el preciso aporte de andrógenos es crítico para el desarrollo folicular normal [220]. Por lo tanto, por las razones expuestas y además, dada la importancia de los andrógenos como sustrato para la síntesis de estrógenos, se ha estudiado la expresión de la enzima CYP17 en ovarios de ratas prepuberes estimuladas con gonadotrofinas luego del tratamiento con LA a distintos periodos de tiempo. Mediante este estudio se ha observado una inhibición en la expresión del ARN mensajero de esta enzima luego de 8 hs de tratamiento con LA, sin variaciones dentro de los tratamientos. De estos resultados podemos concluir que LA inhibe la expresión de la CYP17 a nivel transcripcional.

Dado que se observó una inhibición en los niveles de androsterona sérica y en la expresión del ARN mensajero del citocromo CYP17 luego del tratamiento con LA, analizamos su contenido folicular a lo largo del tiempo de la administración del análogo. Esta enzima ha sido descrita en diferentes estudios bajo distintas condiciones, tanto *in vivo* como *in vitro* [326;337-341]. Sin embargo, hasta ahora no se han llevado a cabo estudios a nivel de expresión proteica de este citocromo durante el desarrollo folicular inducido por gonadotrofinas. De forma paralela a la inhibición en la producción de androsterona y en los niveles del ARN mensajero del CYP17, se ha observado que luego de 8 hs de tratamiento con LA, se produjo una disminución en el contenido proteico del citocromo CYP17 en folículos de ratas prepúberes superovuladas con gonadotrofina. En relación a la inhibición observada en la síntesis de androsterona y la expresión de la enzima CYP17 luego de la administración de un agonista de GnRH, existen trabajos que describen un efecto directo de GnRH en la síntesis de andrógenos gonadales. Tanto en testículo de ratas como de sapos, se ha observado una disminución en la síntesis de testosterona por acción de un análogo de GnRH [342;343]. Por otro lado, se ha descrito que el tratamiento con GnRH reduce las actividades 17 $\alpha$ -hidroxilasa y C17,20 liasa en cultivos de células intersticiales de ovario provenientes de ratas inmaduras hipofisectomizadas [323;331]. La enzima CYP17 es considerada un marcador de las células de la teca, ya que se expresa específicamente en este tipo celular en el folículo ovárico, haciendo de las células tecales, la principal fuente de andrógenos ováricos. Además, este citocromo se encuentra presente en el ovario de ratas inmaduras [236], tal como se observó en este trabajo en ovarios de ratas prepúberes que no recibieron tratamiento alguno. Los folículos primordiales no poseen células de la teca [15] y el folículo primario posee una única capa de este tipo celular. En respuesta a factores intraováricos, estas células proliferan y el número de capas aumenta a medida que el desarrollo folicular avanza. En nuestro trabajo, se ha observado que LA produce una disminución en el contenido de la CYP17. Esto podría deberse a un menor número

de folículos antrales (ya que hemos descrito un retraso del desarrollo folicular por acción de LA) o a una inhibición específica de la enzima por acción de LA en células de la teca. Dado que en el presente trabajo se han aislado folículos antrales para el análisis de su expresión, sostenemos que el análogo inhibiría específicamente la expresión de esta enzima.

Luego del estudio de la expresión de la CYP17, nos encontramos en condiciones de sugerir que al aumento de la síntesis de progesterona observado en estos animales, contribuirían dos factores: 1) mayor contenido folicular de la proteína StAR proveyendo al citocromo CYP11A1 de una mayor concentración de su sustrato: el colesterol, y 2) acumulación de progesterona debido a su impedimento de continuar su camino biosintético, a causa de la inhibición del citocromo CYP17 por acción de LA.

Contrariamente a lo esperado, se ha observado en ratas donde la apoptosis folicular ha sido inducida mediante hipofisectomía, que la producción de progesterona en el ovario aumentaba paralelamente a un aumento progresivo de la atresia [344]. El mismo fenómeno se observó en células de granulosa-luteínicas sugiriendo que los pasos iniciales de la apoptosis están acompañados de un aumento, más que de un bloqueo, de la producción de progesterona. Además, la producción y secreción de este esteroide durante el ciclo estral/menstrual, posee una importante función en la calidad del oocito que es ovulado, favoreciendo de esta manera, la fertilización del mismo. Asimismo, niveles elevados de progesterona de manera temprana durante el desarrollo del folículo preovulatorio, afectan de forma negativa al oocito durante la fertilización [345-347]. Es interesante destacar que en estos trabajos citados, a medida que la atresia progresa, también se observa una disminución de los andrógenos foliculares y de estradiol [344;348]. Respecto a estas observaciones, surgió la pregunta de: cómo la mitocondria puede mantener su integridad durante los pasos iniciales de la apoptosis, cuando es el

blanco de numerosas señales apoptóticas. Es interesante observar que la StAR se ubica en la mitocondria, mientras la CYP17 y la enzima aromatasa responsable de la síntesis de estrógenos, son enzimas ubicadas en el retículo endoplasmático en el citoplasma de las células. Al respecto, se observó que la mitocondria permanece intacta en células que están sufriendo el proceso de apoptosis y, por lo tanto se concluyó, que este proceso y la esteroidogénesis co-existen en las células hasta su colapso total [348]. En otras especies, además de en la rata, como hámster y oveja, fue demostrado que la actividad esteroidogénica de los folículos atrésicos es mayor a la de los folículos no atrésicos [98;349;350].

En el presente trabajo, se describió que el tratamiento con el análogo de GnRH-I de ratas prepúberes cuyo desarrollo folicular fue inducido por la administración de gonadotrofinas, produjo diversos efectos que modificaron la síntesis de esteroides gonadales esenciales durante el desarrollo de los folículos ováricos. El estudio de la esteroidogénesis en el ovario es importante por su ciclicidad, debido a la cual se producen cambios continuos en los niveles de expresión de enzimas y hormonas esteroideas, contrariamente a la continua secreción que se observa en el cuerpo lúteo, placenta o testículo.

Sabemos que, en principio, GnRH es un factor sintetizado en el hipotálamo y que una vez liberado al sistema circulatorio, llega a la hipófisis anterior donde estimula la síntesis y secreción de las gonadotrofinas. Por esta razón, luego de la realización de los experimentos *in vivo* con LA, quisimos descartar posibles efectos de este análogo mediado por su acción a nivel hipofisario de los animales. Para ello, se realizaron los experimentos *in vitro* con folículos antrales obtenidos de animales estimulados con gonadotrofinas, incubados con FSH y FSH+LA. El modelo utilizado para estos ensayos, tiene la ventaja de mantener la integridad de los folículos y actualmente, se utiliza para el estudio de la regulación de la esteroidogénesis, la apoptosis y la atresia folicular [78;351]. De forma coincidente, se observó el mismo efecto estimulador de LA en el

contenido folicular de StAR, cuando los folículos fueron co-incubados con FSH y LA durante 12 hs. Asimismo, la co-incubación inhibió el contenido folicular de androsterona a las 24 hs como también, el contenido folicular de CYP17 a las 12 hs de incubación con el análogo. Estos experimentos nos permiten demostrar que el Acetato de Leuprolide ejerce un efecto directo en las células foliculares y que, efectivamente afecta a la síntesis de esteroides durante la foliculogénesis inducida por gonadotrofinas, en forma similar a lo observado en los experimentos realizados *in vivo*. Por lo tanto, los efectos de LA observados cuando el mismo fue administrado *in vivo*, se deberían a una acción directa de LA sobre las células de los folículos ováricos.

Debido a que el ovario es uno de los pocos órganos del adulto que presenta un alto grado de angiogénesis a intervalos regulares, se ha propuesto a dicho órgano como modelo para el estudio no solo de la función reproductiva, sino también de la angiogénesis en general. Por lo tanto, el segundo aspecto analizado en este trabajo, fue el efecto del análogo de GnRH-I, LA, sobre la expresión de factores angiogénicos y sus receptores, en ovario de ratas estimuladas con gonadotrofinas, a las cuales se les administró LA y/o un antagonista de GnRH-I, Antide. Los experimentos se realizaron luego de 48 hs de los tratamientos. Este es el primer trabajo que analiza los efectos de los análogos de GnRH sobre la expresión de factores angiogénicos y sus receptores en el desarrollo folicular inducido por gonadotrofinas.

Hemos demostrado en esta tesis, que el tratamiento con LA inhibe la expresión proteica de VEGF, su receptor (Flk-1/KDR) y Angiopietina-1 en folículos antrales (FA) provenientes de ratas prepúberes hiperestimuladas. Además, el antagonista de GnRH-I, Antide, fue capaz de revertir la acción del agonista, sosteniendo la hipótesis de que el efecto local de LA estaría dado a través de la acción del agonista sobre los receptores de GnRH en el ovario. Contrariamente a lo esperado, no se modificó la expresión del receptor de Angiopietina-1, Tie-2, con los tratamientos. El tratamiento

con el antagonista no produjo efectos en ninguna de las proteínas analizadas. Por lo tanto, estos resultados muestran que el agonista de GnRH, LA, afectaría el grado de vascularización de los folículos antrales, causando un menor aporte de hormonas, factores de crecimiento y nutrientes a estos folículos. Se ha observado, en un modelo de Síndrome de Hiperestimulación Ovárica (OHSS) en ratas, que el tratamiento con un análogo de GnRH, disminuye la expresión de VEGF tanto a nivel de ARN mensajero, como de proteína [352]. Además, en ese mismo trabajo se describe una disminución de la permeabilidad vascular en estos animales, luego del tratamiento.

En muchos trabajos, se ha estudiado el papel funcional de estos factores angiogénicos en la regulación de la formación de vasos en el folículo ovárico, mediante la administración de sustancias que activan o inactivan a estos agentes angiogénicos. En ratón, se observó que el bloqueo del receptor de VEGF, Flk-1, inhibe la angiogénesis folicular dependiente de gonadotrofinas, y consecuentemente, impide el desarrollo de los folículos antrales maduros [353;354]. Además, la inhibición de VEGF en monos marmoset, inhibe el desarrollo folicular y su angiogénesis y disminuye la expresión de ambos receptores de VEGF [354].

En nuestro laboratorio [355], se ha demostrado que al inhibir la acción local de VEGF en ovarios de ratas tratadas con gonadotrofinas, disminuye el número de folículos periovulatorios y aumenta el número de folículos atrésicos. Además, en los folículos aislados de estos animales, se observa un aumento de la apoptosis espontánea que sufren los mismos, al ser incubados en medio libre de suero durante 24 hs [355]. En este trabajo, también se demostró que este aumento de la apoptosis dada por la ausencia de VEGF, está mediada por un desbalance entre las proteínas miembros de la familia de Bcl-2: Bax, Bcl-2, Bcl-xL y Bcl-xS. Otros autores han descripto que la inhibición del receptor de VEGF, Flk-1 altera el desarrollo folicular debido a una disminución en la densidad vascular de los folículos ováricos [353]. Además, en nuestro laboratorio,

hemos descripto que la inhibición de la Angiopietina-I provocada por la administración local de un anticuerpo neutralizante, causa un aumento en el número de folículos atrésicos y una disminución en el número de folículos antrales y preovulatorios en ratas prepúberes estimuladas con gonadotrofinas [356].

Podemos deducir de los resultados de esta Tesis, que el Acetato de Leuprolide inhibe la expresión de los principales factores angiogénicos involucrados en el desarrollo de la vasculatura durante la foliculogénesis. Además, los resultados obtenidos con la administración del antagonista de GnRH-I, Antide, nos permite sugerir que los efectos de LA son producidos por unión de éste a su receptor, ya que al bloquear el mismo con un antagonista, revertimos los efectos inhibitorios. Por consiguiente, la acción de LA durante el desarrollo de los folículos antrales, inhibiría la formación y diferenciación de una red vascular madura y funcional, a través de la disminución del factor VEGF y su receptor, y además, impediría la maduración y estabilidad de los vasos recientemente formados, mediante la inhibición de la expresión de Angiopietina-1, afectando, de esta manera, el desarrollo folicular.

En el año 2001 y 2002 [78;315], se demostró en nuestro laboratorio que paralelamente a la inhibición del desarrollo folicular producido por la administración de LA, se observa un aumento en el proceso de apoptosis, mediado por la disminución del contenido de la proteína antiapoptótica Bcl<sub>xL</sub> y un desbalance en la relación de las proteínas apoptóticas/antiapoptóticas (Bcl-xL/Bcl-xS). Luego, en el año 2005 [92] se realizaron estudios en nuestro laboratorio, donde se observó que luego el tratamiento con LA, la proteína Bax, inductora de la apoptosis, se traslada del citosol a la mitocondria, mientras el citocromo c, se transporta desde la mitocondria hacia el citosol. Esta distribución es característica del proceso de apoptosis, y la ubicación de Bax en la mitocondria, es justamente la que permite la traslocación del citocromo c al citosol. Se sabe que el citocromo c, una vez liberado, se adhiere a la proteína Apaf-1 (Factor

activador de proteasas apoptóticas) causando un cambio conformacional y permitiendo que Apaf-1 interactúe con procaspasa-9 que a su vez activará a las caspasas efectoras 3 y -7. Estos resultados, junto el aumento de la fragmentación apoptótica del ADN folicular [313;315], nos llevó a estudiar el efecto de LA sobre la actividad de la principal proteasa efectora de la apoptosis, la caspasa-3.

Los experimentos en los cuales se analizó el clivaje de la caspasa-3 por western blot, mostraron que el tratamiento con LA aumentó el clivaje de la procaspasa-3, evidenciado por el aumento del fragmento de la proteína de 17 kDa (p17), fragmento que corresponde a la proteína activa. Además, se observó un fragmento de 20 kDa (p20) que constituye un intermediario en el procesamiento de esta enzima. El fragmento de 17 kDa, volvió a los niveles de los animales que solo recibieron gonadotrofinas, luego del co-tratamiento con Antide. Es interesante destacar, que en el tratamiento solo con Antide, el procesamiento de la caspasa-3 fue menor que el observado en el grupo Control. Estos resultados coinciden, tanto con la determinación del clivaje de Polimerasa Poli-ADP ribosa (PARP), uno de los sustratos de la caspasa-3 durante el proceso de apoptosis; como con la medición de la actividad de la caspasa-3 mediante el ensayo colorimétrico. En ambos casos, se observó que LA estimuló el clivaje de PARP y la actividad de la caspasa-3, siendo revertido el efecto por el co-tratamiento con Antide. Nuevamente, la administración del Antide, disminuyó el clivaje de PARP y la actividad de la caspasa-3 comparado al grupo Control. Este resultado, coincide con el efecto antiapoptótico del Antide en los folículos ováricos, observado anteriormente en nuestro laboratorio [92]. En esa oportunidad, se describió que los animales tratados con Antide únicamente, experimentaban un aumento del peso de sus ovarios y del número de folículos preovulatorios y, una disminución del número de células apoptóticas en folículos antrales tempranos y preovulatorios comparado al grupo de animales que solo había sido tratado con gonadotrofina. Además, el Antide inhibió la traslocación de BAX del citoplasma a la mitocondria y retuvo el citocromo C en la mitocondria comparado al tratamiento con gonadotrofinas. Estos resultados se corroboran con varios trabajos que indican la presencia y el rol autocrino o paracrino de péptidos de GnRH en el ovario [276;357-359]. Nuestras observaciones fueron sumamente importantes, ya que hemos demostrado que bloqueando el receptor de GnRH-I, existe un efecto estimulador *in vivo* del desarrollo folicular; corroborándose nuestra hipótesis acerca de la presencia de un

péptido similar a GnRH-I endógeno en el ovario que posee un rol inhibitorio de la función ovárica.

Mediante el análisis de la localización celular de la caspasa-3 por inmunohistoquímica, se pudo determinar que el tratamiento con LA provocó un aumento de la intensidad de esta proteína en las células de la teca de folículos antrales comparado al grupo Control. Cabe destacar, que la marca correspondiente a esta proteína, se localizó principalmente en el núcleo de las células, en coincidencia con el hecho de que una vez activada, esta proteína se traslada al núcleo de la célula durante la apoptosis. Es interesante recordar que las células de la teca no sufren apoptosis clásica como las células de la granulosa, sino que se hipertrofian durante este proceso y mueren más tardíamente [83]. Debido a esto, no se conoce exactamente la función de la caspasa-3 en este tipo celular. Recientemente, Yacobi y col. [87] han demostrado que las gonadotrofinas inducen un aumento de la actividad de las caspasas-3 y -7 en células de la teca de folículos antrales de rata, y que este incremento es acompañado por un aumento de la apoptosis de este tipo celular. También, se sugirió que la activación de la caspasa-3 acompañada por el clivaje de la proteína SREBP (Proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides), estaría involucrada en la hipertrofia y acumulación de gotas lipídicas en células de la teca, llevando a un aumento de los andrógenos y consecuentemente, provocando la apoptosis de las células de la granulosa [83]. Sin embargo, hasta el momento no existen evidencias que demuestren esta hipótesis.

# ***CONCLUSION***

---

---

*Con este trabajo, concluimos que el factor GnRH-I actuaría en el ovario localmente como un modulador intraovárico, afectando funciones esenciales durante el desarrollo folicular. Este factor interfiere con la foliculogénesis inducida por gonadotrofinas, inhibiendo la síntesis de esteroides gonadales (andrógenos y estrógenos) y la angiogénesis folicular. La modificación de estas funciones ováricas provocada por el agonista, alterarían el balance de los factores de supervivencia de las células foliculares, causando en éstas, la activación de proteínas reguladoras de la apoptosis. De esta manera, el GnRH-I llevaría a los folículos antrales que se encuentran en desarrollo a entrar en el proceso de atresia, impidiendo que alcancen el estadio preovulatorio que lleva a la ovulación.*

## CONCLUSIONES GENERALES

### Efecto de la administración de LA en la esteroidogénesis ovárica durante el desarrollo folicular inducido por gonadotrofinas:

#### En la síntesis de esteroides foliculares:

- El tratamiento de ratas prepúberes estimuladas con el agonista de GnRH, LA, durante 48 hs, produce un efecto estimulador en la síntesis de Progesterona folicular y su metabolito inactivo, 20 $\alpha$ -Hidroxiprogesterona.
- Los niveles séricos de Progesterona están significativamente aumentados luego de 8 hs de administración de LA. Por el contrario, los niveles de Androsterona circulantes se encuentran significativamente disminuídos a dicho tiempo.
- La secreción de Progesterona es estimulada por LA, 8 hs luego de su administración, y disminuyendo luego a las 24 y 48 hs.
- LA inhibe la secreción de Androsterona a las 8 hs luego de su administración.

### En la expresión génica y niveles proteicos de enzimas y proteínas esteroidogénicas:

- LA estimula la expresión del ARN mensajero de la proteína StAR en folículos ováricos a lo largo del tiempo luego de su

administración, siendo más notorio este aumento luego de las 4 hs.

- LA estimula de forma temprana (2 hs), el contenido folicular proteico de la StAR, y sus valores se mantienen elevados a los distintos tiempos luego de su administración.
  
- La StAR se localiza principalmente en células de la teca e intersticiales de folículos preantrales y antrales, luego de la administración de gonadotrofinas. La estimulación de LA sobre la StAR, se localiza en las células de la teca de estos folículos y comienza a expresarse en niveles muy bajos, en las células de la granulosa de folículos antrales.
  
- El tratamiento con LA no produce cambios en el contenido de la enzima CYP11A1 en folículos antrales a los tiempos estudiados.
  
- LA inhibe la expresión génica del citocromo CYP17 a las 8 hs luego de su administración.
  
- LA posee un efecto inhibitorio en el contenido proteico folicular del citocromo CYP17

*Efectos in vitro de LA en folículos ováricos de ratas prepúberes estimuladas con gonadotrofinas*

- **Al igual que los efectos que produce LA *in vivo*, la incubación con el agonista inhibe la síntesis de Androsterona y el contenido folicular del citocromo CYP17 y por el contrario, estimula los niveles proteicos foliculares de la proteína StAR. Los niveles del citocromo CYP11A1, no se ven afectados por la presencia del análogo.**

**Efecto de la administración de LA en la angiogénesis y apoptosis durante el desarrollo folicular inducido por gonadotrofinas:**

**En los niveles proteicos foliculares de factores angiogénicos y sus receptores:**

- **LA inhibe el contenido proteico folicular, tanto de VEGF como de Angiopoietina-1 y este efecto se encuentra mediado por su unión a su receptor ovárico.**
  
- **LA posee un efecto inhibitorio, también mediado por su receptor, en el contenido proteico folicular del receptor de VEGF, Flk-1 y, por el contrario, no produce cambios en el receptor de la Angiopoietina-1, Tie-2.**

**En parámetros de la apoptosis folicular:**

- **La administración de LA produce un aumento en el fragmento activo de la enzima caspasa-3 folicular, así como también, estimula su actividad enzimática.**
  
- **LA estimula el clivaje de un sustrato endógeno de la caspasa-3, la Polimerasa Poli-ADP ribosa (PARP), efecto mediado por la unión del análogo al receptor.**
  
- **El aumento del contenido folicular de la caspasa-3 producido por el tratamiento con LA, se localiza principalmente en células de la teca de folículos preantrales y antrales, y es de destacar que la proteína se detectó en el núcleo de la célula.**

## BIBLIOGRAFIA

- [1] McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr. Rev.* 2000; 21: 200-214.
- [2] Thibault C, Levasseur M-C, Hunter RHF. *Reproduction in Mammals and Man*, English revised edition ed. 1993.
- [3] Knobil E, Neill JD. *Physiology of Reproduction*, 3 Rev Ed edition ed. 2005.
- [4] Maekawa A. Pathology of tumours in laboratory animals. Tumours of the rat. Tumours of the ovary. *IARC Sci. Publ.* 1990; 473-497.
- [5] Bloom W., Fawcett W.D. *Tratado de Histología*, 11<sup>aba</sup> ed. Madrid: Mc. Graw Hill - Interamericana; 1997.
- [6] Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 2004; 428: 145-150.
- [7] Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, Lee HJ, Adams GB, Niikura Y, Tschudy KS, Tilly JC, Cortes ML, Forkert R, Spitzer T, Iacomini J, Scadden DT, Tilly JL. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell* 2005; 122: 303-315.
- [8] Hutt KJ, Albertini DF. Clinical applications and limitations of current ovarian stem cell research: a review. *J. Exp. Clin. Assist. Reprod.* 2006; 3: 6.
- [9] Johnson J, Skaznik-Wikiel M, Lee HJ, Niikura Y, Tilly JC, Tilly JL. Setting the record straight on data supporting postnatal oogenesis in female mammals. *Cell Cycle* 2005; 4: 1471-1477.
- [10] Jamnongjit M, Hammes SR. Oocyte maturation: the coming of age of a germ cell. *Semin. Reprod. Med.* 2005; 23: 234-241.
- [11] Hutt KJ, Albertini DF. An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. *Reprod. Biomed. Online.* 2007; 14: 758-764.
- [12] Irving-Rodgers HF, Rodgers RJ. Ultrastructure of the basal lamina of bovine ovarian follicles and its relationship to the membrana granulosa. *J. Reprod. Fertil.* 2000; 118: 221-228.
- [13] Peters H, Byskov AG, Lintern-Moore S, Faber M, Andersen M. The effect of gonadotrophin on follicle growth initiation in the neonatal mouse ovary. *J Reprod. Fertil.* 1973; 35: 139-141.
- [14] Elvin JA, Matzuk MM. Mouse models of ovarian failure. *Rev. Reprod.* 1998; 3: 183-195.
- [15] Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int. Rev. Cytol.* 1991; 124: 43-101.
- [16] Adashi EY, Resnick CE, Rosenfeld RG, Powell DR, Koistinen R, Rutanen EM, Seppala M. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-1 is an antigonadotropin: evidence that

- optimal follicle-stimulating hormone action in ovarian granulosa cells is contingent upon amplification by endogenously-derived IGFs. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1993; 343: 377-385.
- [17] Orisaka M, Orisaka S, Jiang JY, Craig J, Wang Y, Kotsuji F, Tsang BK. Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. *Mol. Endocrinol.* 2006; 20: 2456-2468.
- [18] Geva E, Jaffe RB. The ovary: Ovarian Angiogenesis. In: Leung P.C., Adashi E.Y. (eds.), Second edition ed. San Diego, California. USA: Elsevier Academic Press; 2004: 305-317.
- [19] Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246: 1306-1309.
- [20] Fraser HM. Regulation of the ovarian follicular vasculature. *Reprod. Biol Endocrinol.* 2006; 4: 18.
- [21] The Ovary, 2nd ed. Elsevier, Academic Press; 2004.
- [22] Oxberry, A, Greenwald GS. An autoradiographic study of the binding of 125 I-labeled follicle-stimulating hormone, human chorionic gonadotropin and prolactin to the hamster ovary throughout the estrous cycle. *Biol Repr* 1982; 27: 505-516.
- [23] Amsterdam A, Koch Y, Lieberman ME, Lindner HR. Distribution of binding sites for human chorionic gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat. *J. Cell Biol.* 1975; 67: 894-900.
- [24] Eppig JJ. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature* 1979; 281: 483-484.
- [25] Dekel N, Galiani D, Sherizly I. Dissociation between the inhibitory and the stimulatory action of cAMP on maturation of rat oocytes. *Mol. Cell Endocrinol.* 1988; 56: 115-121.
- [26] Phillips DM, Dekel N. Effect of gonadotropins and prostaglandin on cumulus mucification in cultures of intact follicles. *J. Exp. Zool.* 1982; 221: 275-282.
- [27] Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat. Genet.* 1997; 15: 201-204.
- [28] Gougeon A, Testart J. Germinal vesicle breakdown in oocytes of human atretic follicles during the menstrual cycle. *J. Reprod. Fertil.* 1986; 78: 389-401.
- [29] FALCK B. Site of production of oestrogen in rat ovary as studied in micro-transplants. *Acta Physiol Scand. Suppl* 1959; 47: 1-101.
- [30] Caron MG, Goldstein S, Savard K, Marsh JM. Protein kinase stimulation of a reconstituted cholesterol side chain cleavage enzyme system in the bovine corpus luteum. *J Biol Chem* 1975; 250: 5137-5143.
- [31] Hazzard TM, Xu F, Stouffer RL. Injection of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 into the preovulatory follicle disrupts ovulation and subsequent luteal function in rhesus monkeys. *Biol Reprod.* 2002; 67: 1305-1312.
- [32] Carambula SF, Matikainen T, Lynch MP, Flavell RA, Goncalves PB, Rueda BR. Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of the ovarian corpus luteum. *Endocrinology* 2002; 143: 1495-1501.
- [33] Stocco C, Telleria C, Gibori G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr. Rev.* 2007; 28: 117-149.

- [34] Smith GH, Kidwell WR, Schneider WC. Effect of prolactin on [3H]thymidine incorporation. *Exp Cell Res* 1975; 96: 321-334.
- [35] Knobil E, Neill JD. *Physiology of Reproduction*, Second edition ed. 1994.
- [36] Gougeon A, Busso D. Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. *Mol. Cell Endocrinol.* 2000; 163: 33-42.
- [37] Mayerhofer A, Dissen GA, Costa ME, Ojeda SR. A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology* 1997; 138: 3320-3329.
- [38] Kuroda H, Terada N, Nakayama H, Matsumoto K, Kitamura Y. Infertility due to growth arrest of ovarian follicles in Sl/Sl<sup>t</sup> mice. *Dev. Biol.* 1988; 126: 71-79.
- [39] Thomas FH, Vanderhyden BC. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reprod. Biol Endocrinol.* 2006; 4: 19.
- [40] Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996; 383: 531-535.
- [41] Kezele P, Nilsson EE, Skinner MK. Keratinocyte growth factor acts as a mesenchymal factor that promotes ovarian primordial to primary follicle transition. *Biol Reprod.* 2005; 73: 967-973.
- [42] Devoto L, Christenson LK, McAllister JM, Makriganakis A, Strauss JF, III. Insulin and insulin-like growth factor-I and -II modulate human granulosa-lutein cell steroidogenesis: enhancement of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) expression. *Mol. Hum. Reprod.* 1999; 5: 1003-1010.
- [43] Urban RJ, Garmey JC, Shupnik MA, Veldhuis JD. Insulin-like growth factor type I increases concentrations of messenger ribonucleic acid encoding cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme in primary cultures of porcine granulosa cells. *Endocrinology* 1990; 127: 2481-2488.
- [44] Simone DA, Chorich LP, Mahesh VB. Mechanisms of action for an androgen-mediated autoregulatory process in rat thecal-interstitial cells. *Biol. Reprod.* 1993; 49: 1190-1201.
- [45] He H, Herington AC, Roupas P. Involvement of G proteins in the effect of insulin-like growth factor I on gonadotropin-induced rat granulosa cell differentiation. *Growth Regul.* 1994; 4: 20-28.
- [46] Halpin DM, Charlton HM. Effects of short-term injection of gonadotrophins on ovarian follicle development in hypogonadal (hpg) mice. *J Reprod. Fertil.* 1988; 82: 393-400.
- [47] Flaws JA, Abbud R, Mann RJ, Nilson JH, Hirshfield AN. Chronically elevated luteinizing hormone depletes primordial follicles in the mouse ovary. *Biol Reprod.* 1997; 57: 1233-1237.
- [48] Yen SSC, Jaffe RB, Barbieri RL. *Endocrinología de la Reproducción*, 4<sup>ta</sup> ed. 2001.
- [49] Gougeon A, Testart J. Influence of human menopausal gonadotropin on the recruitment of human ovarian follicles. *Fertil. Steril.* 1990; 54: 848-852.
- [50] Goodman AL, Hodgen GD. The ovarian triad of the primate menstrual cycle. *Recent Prog. Horm. Res.* 1983; 39: 1-73.
- [51] Melino G. The meaning of death. *Cell Death. Differ.* 2002; 9: 347-348.

- [52] Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997; 88: 347-354.
- [53] Baehrecke EH. How death shapes life during development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002; 3: 779-787.
- [54] Rudin CM, Thompson CB. Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu. Rev. Med.* 1997; 48: 267-281.
- [55] Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J. Clin. Oncol.* 1999; 17: 2941-2953.
- [56] Billig H, Furuta I, Hsueh AJ. Gonadotropin-releasing hormone directly induces apoptotic cell death in the rat ovary: biochemical and in situ detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in granulosa cells. *Endocrinology* 1994; 134: 245-252.
- [57] Chun SY, Eisenhauer KM, Minami S, Billig H, Perlas E, Hsueh JW. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology* 1996; 137: 1447-1456.
- [58] Tilly JL. Apoptosis and ovarian function. *Rev. Reprod.* 1996; 1: 162-172.
- [59] Chun SY, Billig H, Tilly JL, Furuta I, Tsafrii A, Hsueh AJ. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 1994; 135: 1845-1853.
- [60] Mak TW, Yeh WC. Genetic analysis of apoptotic and survival signals. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol* 1999; 64: 335-342.
- [61] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-776.
- [62] Shi Y. Apoptosome: the cellular engine for the activation of caspase-9. *Structure.* 2002; 10: 285-288.
- [63] Salvesen GS, Dixit VM. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1999; 96: 10964-10967.
- [64] Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp. Cell Res.* 2000; 256: 42-49.
- [65] Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316.
- [66] Bamford M, Walkinshaw G, Brown R. Therapeutic applications of apoptosis research. *Exp. Cell Res.* 2000; 256: 1-11.
- [67] Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 1999; 15: 269-290.
- [68] Harvey NL, Kumar S. The role of caspases in apoptosis. *Adv. Biochem. Eng Biotechnol.* 1998; 62: 107-128.
- [69] Conradt B. With a little help from your friends: cells don't die alone. *Nat. Cell Biol.* 2002; 4: E139-E143.
- [70] Franc NC. Phagocytosis of apoptotic cells in mammals, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*: molecular mechanisms and physiological consequences. *Front Biosci.* 2002; 7: d1298-d1313.
- [71] Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281: 1305-1308.

- [72] Cory S. Regulation of lymphocyte survival by the bcl-2 gene family. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 513-543.
- [73] Tilly JL, Tilly KI, Kenton ML, Johnson AL. Expression of members of the bcl-2 gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-xlong messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 1995; 136: 232-241.
- [74] Rueda BR, Tilly KI, Botros IW, Jolly PD, Hansen TR, Hoyer PB, Tilly JL. Increased bax and interleukin-1beta-converting enzyme messenger ribonucleic acid levels coincide with apoptosis in the bovine corpus luteum during structural regression. *Biol. Reprod.* 1997; 56: 186-193.
- [75] Hsueh AJ, Eisenhauer K, Chun SY, Hsu SY, Billig H. Gonadal cell apoptosis. *Recent Prog. Horm. Res.* 1996; 51: 433-455.
- [76] McGee EA, Chun SY, Lai S, He Y, Hsueh AJ. Keratinocyte growth factor promotes the survival, growth, and differentiation of preantral ovarian follicles. *Fertil. Steril.* 1999; 71: 732-738.
- [77] Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, Hsueh AJ. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology* 1991; 129: 2799-2801.
- [78] Parborell F, Pecci A, Gonzalez O, Vitale A, Tesone M. Effects of a gonadotropin-releasing hormone agonist on rat ovarian follicle apoptosis: Regulation by EGF and the expression of Bcl-2-related genes. *Biol. Reprod.* 2002; 67: 481-486.
- [79] MacFarlane M, Williams AC. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep.* 2004; 5: 674-678.
- [80] Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J. Clin. Invest* 2005; 115: 2665-2672.
- [81] Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 2005; 37: 719-727.
- [82] Shi Y. Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci.* 2004; 13: 1979-1987.
- [83] Boone DL, Tsang BK. Caspase-3 in the rat ovary: localization and possible role in follicular atresia and luteal regression. *Biol. Reprod.* 1998; 58: 1533-1539.
- [84] Peluffo MC, Stouffer RL, Tesone M. Activity and expression of different members of the caspase family in the rat corpus luteum during pregnancy and postpartum. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 2007; 293: E1215-E1223.
- [85] Peluffo MC, Bussmann L, Stouffer RL, Tesone M. Expression of caspase-2, -3, -8 and -9 proteins and enzyme activity in the corpus luteum of the rat at different stages during the natural estrous cycle. *Reproduction.* 2006; 132: 465-475.
- [86] Peluffo MC, Young KA, Stouffer RL. Dynamic Expression of Caspase-2, -3, -8, and -9 Proteins and Enzyme Activity, But Not Messenger Ribonucleic Acid, in the Monkey Corpus Luteum during the Menstrual Cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 2005; 90: 2327-2335.
- [87] Yacobi K, Wojtowicz A, Tsafirri A, Gross A. Gonadotropins enhance caspase-3 and -7 activity and apoptosis in the theca-interstitial cells of rat preovulatory follicles in culture. *Endocrinology* 2004; 145: 1943-1951.

- [88] Kayalar C, Ord T, Testa MP, Zhong LT, Bredesen DE. Cleavage of actin by interleukin 1 beta-converting enzyme to reverse DNase I inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1996; 93: 2234-2238.
- [89] Nelipovich PA, Nikonova LV, Umansky SR. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase as a possible reason for activation of Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-dependent endonuclease in thymocytes of irradiated rats. *Int. J. Radiat. Biol. Relat Stud. Phys. Chem. Med.* 1988; 53: 749-765.
- [90] Widlak P, Li P, Wang X, Garrard WT. Cleavage preferences of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease) on naked DNA and chromatin substrates. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 8226-8232.
- [91] Foghi A, Ravandi A, Teerds KJ, Van Der DH, Kuksis A, Dorrington J. Fas-induced apoptosis in rat thecal/interstitial cells signals through sphingomyelin-ceramide pathway. *Endocrinology* 1998; 139: 2041-2047.
- [92] Parborell F, Irusta G, Vitale AM, Gonzalez O, Pecci A, Tesone M. GnRH antagonist Antide inhibits apoptosis of preovulatory follicle cells in rat ovary. *Biol Repr* 2005; 72: 659-666.
- [93] Chun SY, Hsueh AJ. Paracrine mechanisms of ovarian follicle apoptosis. *J Reprod. Immunol.* 1998; 39: 63-75.
- [94] Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980; 392: 555-556.
- [95] Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJ. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol. Endocrinol.* 1993; 7: 643-650.
- [96] Billig H, Furuta I, Hsueh AJ. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 1993; 133: 2204-2212.
- [97] Carson RS, Findlay JK, Clarke IJ, Burger HG. Estradiol, testosterone, and androstenedione in ovine follicular fluid during growth and atresia of ovarian follicles. *Biol. Reprod.* 1981; 24: 105-113.
- [98] Braw RH, Tsafiriri A. Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary. *J. Reprod. Fertil.* 1980; 59: 267-272.
- [99] Hsueh AJ, Billig H, Tsafiriri A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr. Rev.* 1994; 15: 707-724.
- [100] Jamnongjit M, Hammes SR. Ovarian steroids: the good, the bad, and the signals that raise them. *Cell Cycle* 2006; 5: 1178-1183.
- [101] Carr BR, Simpson ER. Lipoprotein utilization and cholesterol synthesis by the human fetal adrenal gland. *Endocr. Rev.* 1981; 2: 306-326.
- [102] Tureck RW, Strauss JF, III. Progesterone synthesis by luteinized human granulosa cells in culture: the role of de novo sterol synthesis and lipoprotein-carried sterol. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1982; 54: 367-373.
- [103] Stocco DM. Tracking the role of a star in the sky of the new millennium. *Mol. Endocrinol.* 2001; 15: 1245-1254.
- [104] Chanderbhan R, Noland BJ, Scallen TJ, Vahouny GV. Sterol carrier protein2. Delivery of cholesterol from adrenal lipid droplets to mitochondria for pregnenolone synthesis. *J. Biol. Chem.* 1982; 257: 8928-8934.

- [105] Vahouny GV, Dennis P, Chanderbhan R, Fiskum G, Noland BJ, Scallen TJ. Sterol carrier protein2 (SCP2)-mediated transfer of cholesterol to mitochondrial inner membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984; 122: 509-515.
- [106] Pedersen RC, Brownie AC. Steroidogenesis-activator polypeptide isolated from a rat Leydig cell tumor. *Science* 1987; 236: 188-190.
- [107] Mertz LM, Pedersen RC. Steroidogenesis activator polypeptide may be a product of glucose regulated protein 78 (GRP78). *Endocr. Res.* 1989; 15: 101-115.
- [108] Yanagibashi K, Ohno Y, Kawamura M, Hall PF. The regulation of intracellular transport of cholesterol in bovine adrenal cells: purification of a novel protein. *Endocrinology* 1988; 123: 2075-2082.
- [109] Besman MJ, Yanagibashi K, Lee TD, Kawamura M, Hall PF, Shively JE. Identification of des-(Gly-Ile)-endozepine as an effector of corticotropin-dependent adrenal steroidogenesis: stimulation of cholesterol delivery is mediated by the peripheral benzodiazepine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1989; 86: 4897-4901.
- [110] Strauss JF, III, Schuler LA, Rosenblum MF, Tanaka T. Cholesterol metabolism by ovarian tissue. *Adv. Lipid Res.* 1981; 18: 99-157.
- [111] Gore-Langton RE, Armstrong DT. Follicular Steroidogenesis and Its Control. In: Knobil E, Neill JD (eds.), *The Physiology of Reproduction*, Second Edition ed. New York, USA: Raven Press; 1994: 571-627.
- [112] Hashimoto I, Henricks DM, Anderson LL, Melampy RM. Progesterone and pregn-4-en-20 alpha-ol-3-one in ovarian venous blood during various reproductive states in the rat. *Endocrinology* 1968; 82: 333-341.
- [113] Hillier SG, van den Boogaard AM, Reichert LE, Jr., van Hall EV. Alterations in granulosa cell aromatase activity accompanying preovulatory follicular development in the rat ovary with evidence that 5alpha-reduced C19 steroids inhibit the aromatase reaction in vitro. *J. Endocrinol.* 1980; 84: 409-419.
- [114] Suzuki K, Kawakura K, Tamaoki BI. Effect of pregnant mare's serum gonadotrophin on the activities of delta 4-5 alpha-reductase, aromatase, and other enzymes in the ovaries of immature rats. *Endocrinology* 1978; 102: 1595-1605.
- [115] Eckstein B, Lerner N. Changes in ovarian 5alpha-steroid reductase and 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity produced by induction of first ovulation with gonadotropin. *Biochim. Biophys. Acta* 1977; 489: 143-149.
- [116] Alberta JA, Epstein LF, Pon LA, Orme-Johnson NR. Mitochondrial localization of a phosphoprotein that rapidly accumulates in adrenal cortex cells exposed to adrenocorticotropic hormone or to cAMP. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 2368-2372.
- [117] Pon LA, Orme-Johnson NR. Acute stimulation of steroidogenesis in corpus luteum and adrenal cortex by peptide hormones. Rapid induction of a similar protein in both tissues. *J. Biol. Chem.* 1986; 261: 6594-6599.
- [118] Stocco DM. StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu. Rev. Physiol* 2001; 63: 193-213.
- [119] Clark BJ, Wells J, King SR, Stocco DM. The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 28314-28322.

- [120] Arakane F, Kallen CB, Watari H, Foster JA, Sepuri NB, Pain D, Stayrook SE, Lewis M, Gerton GL, Strauss JF, III. The mechanism of action of steroidogenic acute regulatory protein (StAR). StAR acts on the outside of mitochondria to stimulate steroidogenesis. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 16339-16345.
- [121] Caron KM, Soo SC, Wetsel WC, Stocco DM, Clark BJ, Parker KL. Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipid adrenal hyperplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1997; 94: 11540-11545.
- [122] Tee MK, Lin D, Sugawara T, Holt JA, Guiguen Y, Buckingham B, Strauss JF, III, Miller WL. T-->A transversion 11 bp from a splice acceptor site in the human gene for steroidogenic acute regulatory protein causes congenital lipid adrenal hyperplasia. *Hum. Mol. Genet.* 1995; 4: 2299-2305.
- [123] Strauss JF, III, Kallen CB, Christenson LK, Watari H, Devoto L, Arakane F, Kiriakidou M, Sugawara T. The steroidogenic acute regulatory protein (StAR): a window into the complexities of intracellular cholesterol trafficking. *Recent Prog. Horm. Res.* 1999; 54: 369-394.
- [124] Agca C, Ries JE, Kolath SJ, Kim JH, Forrester LJ, Antoniou E, Whitworth KM, Mathialagan N, Springer GK, Prather RS, Lucy MC. Luteinization of porcine preovulatory follicles leads to systematic changes in follicular gene expression. *Reproduction.* 2006; 132: 133-145.
- [125] KARABOYAS GC, KORITZ SB. THE TRANSFORMATION OF DELTA-5-PREGNENOLONE AND PROGESTERONE TO CORTISOL BY RAT ADRENAL SLICES AND THE EFFECT OF ACTH AND ADENOSINE 3',5'-MONOPHOSPHATE UPON IT. *Biochim. Biophys. Acta* 1965; 100: 600-602.
- [126] HAYNES RC, Jr., KORITZ SB, PERON FG. Influence of adenosine 3',5'-monophosphate on corticoid production by rat adrenal glands. *J. Biol. Chem.* 1959; 234: 1421-1423.
- [127] Clark BJ, Soo SC, Caron KM, Ikeda Y, Parker KL, Stocco DM. Hormonal and developmental regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. *Mol. Endocrinol.* 1995; 9: 1346-1355.
- [128] Ronen-Fuhrmann T, Timberg R, King SR, Hales KH, Hales DB, Stocco DM, Orly J. Spatio-temporal expression patterns of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology* 1998; 139: 303-315.
- [129] Thompson WE, Powell J, Thomas KH, Whittaker JA. Immunolocalization and expression of the steroidogenic acute regulatory protein during the transitional stages of rat follicular differentiation. *J. Histochem. Cytochem.* 1999; 47: 769-776.
- [130] Devoto L, Kohen P, Gonzalez RR, Castro O, Retamales I, Vega M, Carvallo P, Christenson LK, Strauss JF, III. Expression of steroidogenic acute regulatory protein in the human corpus luteum throughout the luteal phase. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 2001; 86: 5633-5639.
- [131] Sierralta WD, Kohen P, Castro O, Munoz A, Strauss JF, III, Devoto L. Ultrastructural and biochemical evidence for the presence of mature steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in the cytoplasm of human luteal cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 2005; 242: 103-110.
- [132] Chung BC, Guo IC, Chou SJ. Transcriptional regulation of the CYP11A1 and ferredoxin genes. *Steroids* 1997; 62: 37-42.
- [133] Jaruratanasirikul S. P450scc deficiency (congenital lipid adrenal hyperplasia): first reported case in Thailand and literature review. *J. Med. Assoc. Thai.* 1996; 79: 531-535.
- [134] Katsumata N, Ohtake M, Hojo T, Ogawa E, Hara T, Sato N, Tanaka T. Compound heterozygous mutations in the cholesterol side-chain cleavage enzyme gene (CYP11A) cause congenital adrenal insufficiency in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 2002; 87: 3808-3813.

- [135] Richmond EJ, Flickinger CJ, McDonald JA, Lovell MA, Rogol AD. Lipoid congenital adrenal hyperplasia (CAH): patient report and a mini-review. *Clin. Pediatr. (Phila)* 2001; 40: 403-407.
- [136] Tajima T, Fujieda K, Kouda N, Nakae J, Miller WL. Heterozygous mutation in the cholesterol side chain cleavage enzyme (p450scc) gene in a patient with 46,XY sex reversal and adrenal insufficiency. *J Clin. Endocrinol. Metab* 2001; 86: 3820-3825.
- [137] Hu MC, Hsu HJ, Guo IC, Chung BC. Function of Cyp11a1 in animal models. *Mol. Cell Endocrinol.* 2004; 215: 95-100.
- [138] Sasano H, Okamoto M, Mason JI, Simpson ER, Mendelson CR, Sasano N, Silverberg SG. Immunolocalization of aromatase, 17 alpha-hydroxylase and side-chain-cleavage cytochromes P-450 in the human ovary. *J. Reprod. Fertil.* 1989; 85: 163-169.
- [139] Rodgers RJ, Rodgers HF, Waterman MR, Simpson ER. Immunolocalization of cholesterol side-chain-cleavage cytochrome P-450 and ultrastructural studies of bovine corpora lutea. *J. Reprod. Fertil.* 1986; 78: 639-652.
- [140] Rodgers RJ, Rodgers HF, Hall PF, Waterman MR, Simpson ER. Immunolocalization of cholesterol side-chain-cleavage cytochrome P-450 and 17 alpha-hydroxylase cytochrome P-450 in bovine ovarian follicles. *J. Reprod. Fertil.* 1986; 78: 627-638.
- [141] Rodgers RJ, Waterman MR, Simpson ER, Magness RR. Immunoblot analysis of cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 and adrenodoxin in corpora lutea of cyclic and late-pregnant sheep. *J. Reprod. Fertil.* 1988; 83: 843-850.
- [142] Hedin L, Rodgers RJ, Simpson ER, Richards JS. Changes in content of cytochrome P450(17)alpha, cytochrome P450scc, and 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in developing rat ovarian follicles and corpora lutea: correlation with theca cell steroidogenesis. *Biol Reprod.* 1987; 37: 211-223.
- [143] Hinshelwood MM, Demeter-Arlotto M, Means GD, Simpson ER. Molecular Biology of genes encoding Steroidogenesis Enzymes in the Ovary. In: Adashi E.Y., Leung P.C. (eds.), *The Ovary*. New York: Raven Press; 1993: 165-178.
- [144] Taya K, Saidapur SK, Greenwald GS. Interstitium: site of steroid synthesis in the ovary of the long term hypophysectomized hamster. *Biol. Reprod.* 1980; 22: 307-318.
- [145] Dahl E. Studies of the fine structure of ovarian interstitial tissue. I. A comparative study of the fine structure of the ovarian interstitial tissue in the rat and the domestic fowl. *J. Anat.* 1971; 108: 275-290.
- [146] Tuckey RC, Lee G, Costa ND, Stevenson PM. The composition and distribution of lipid granules in the rat ovary. *Mol. Cell Endocrinol.* 1984; 38: 187-195.
- [147] Zlotkin T, Farkash Y, Orly J. Cell-specific expression of immunoreactive cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology* 1986; 119: 2809-2820.
- [148] Magoffin DA, Weitsman SR. Effect of insulin-like growth factor-I on cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 messenger ribonucleic acid expression in ovarian theca-interstitial cells stimulated to differentiate in vitro. *Mol. Cell Endocrinol.* 1993; 96: 45-51.
- [149] Yong EL, Hillier SG, Turner M, Baird DT, Ng SC, Bongso A, Ratnam SS. Differential regulation of cholesterol side-chain cleavage (P450scc) and aromatase (P450arom) enzyme mRNA expression by gonadotrophins and cyclic AMP in human granulosa cells. *J. Mol. Endocrinol.* 1994; 12: 239-249.

- [150] Pescador N, Houde A, Stocco DM, Murphy BD. Follicle-stimulating hormone and intracellular second messengers regulate steroidogenic acute regulatory protein messenger ribonucleic acid in luteinized porcine granulosa cells. *Biol. Reprod.* 1997; 57: 660-668.
- [151] Voutilainen R, Tapanainen J, Chung BC, Matteson KJ, Miller WL. Hormonal regulation of P450<sub>scc</sub> (20,22-desmolase) and P450<sub>c17</sub> (17 alpha-hydroxylase/17,20-lyase) in cultured human granulosa cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1986; 63: 202-207.
- [152] Brock BJ, Waterman MR. Biochemical differences between rat and human cytochrome P450<sub>c17</sub> support the different steroidogenic needs of these two species. *Biochemistry* 1999; 38: 1598-1606.
- [153] Miller WL. Androgen biosynthesis from cholesterol to DHEA. *Mol. Cell Endocrinol.* 2002; 198: 7-14.
- [154] Nakajin S, Shively JE, Yuan PM, Hall PF. Microsomal cytochrome P-450 from neonatal pig testis: two enzymatic activities (17 alpha-hydroxylase and c17,20-lyase) associated with one protein. *Biochemistry* 1981; 20: 4037-4042.
- [155] Kominami S, Shinzawa K, Takemori S. Purification and some properties of cytochrome P-450 specific for steroid 17 alpha-hydroxylation and C17-C20 bond cleavage from guinea pig adrenal microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1982; 109: 916-921.
- [156] Suhara K, Fujimura Y, Shiroy M, Katagiri M. Multiple catalytic properties of the purified and reconstituted cytochrome P-450 (P-450<sub>sccII</sub>) system of pig testis microsomes. *J. Biol. Chem.* 1984; 259: 8729-8736.
- [157] Chung BC, Picado-Leonard J, Haniu M, Bienkowski M, Hall PF, Shively JE, Miller WL. Cytochrome P450<sub>c17</sub> (steroid 17 alpha-hydroxylase/17,20 lyase): cloning of human adrenal and testis cDNAs indicates the same gene is expressed in both tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1987; 84: 407-411.
- [158] Auchus RJ. The genetics, pathophysiology, and management of human deficiencies of P450<sub>c17</sub>. *Endocrinol. Metab Clin. North Am.* 2001; 30: 101-19, vii.
- [159] Katsumata N, Satoh M, Mikami A, Mikami S, Nagashima-Miyokawa A, Sato N, Yokoya S, Tanaka T. New compound heterozygous mutation in the CYP17 gene in a 46,XY girl with 17 alpha-hydroxylase/17,20-lyase deficiency. *Horm. Res.* 2001; 55: 141-146.
- [160] Hall PF. Cytochromes P-450 and the regulation of steroid synthesis. *Steroids* 1986; 48: 131-196.
- [161] Pezzi V, Mathis JM, Rainey WE, Carr BR. Profiling transcript levels for steroidogenic enzymes in fetal tissues. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2003; 87: 181-189.
- [162] Tamburini PP, Gibson GG. Thermodynamic studies of the protein-protein interactions between cytochrome P-450 and cytochrome b5. Evidence for a central role of the cytochrome P-450 spin state in the coupling of substrate and cytochrome b5 binding to the terminal hemoprotein. *J. Biol. Chem.* 1983; 258: 13444-13452.
- [163] Guengerich FP, Martin MV, Beaune PH, Kremers P, Wolff T, Waxman DJ. Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J. Biol. Chem.* 1986; 261: 5051-5060.
- [164] Gelety TJ, Magoffin DA. Ontogeny of steroidogenic enzyme gene expression in ovarian theca-interstitial cells in the rat: regulation by a paracrine theca-differentiating factor prior to achieving luteinizing hormone responsiveness. *Biol Reprod.* 1997; 56: 938-945.

- [165] Pelletier G, Li S, Luu-The V, Tremblay Y, Belanger A, Labrie F. Immunoelectron microscopic localization of three key steroidogenic enzymes (cytochrome P450(scc), 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and cytochrome P450(c17)) in rat adrenal cortex and gonads. *J. Endocrinol.* 2001; 171: 373-383.
- [166] Chaffin CL, Disson GA, Stouffer RL. Hormonal regulation of steroidogenic enzyme expression in granulosa cells during the peri-ovulatory interval in monkeys. *Mol. Hum. Reprod.* 2000; 6: 11-18.
- [167] Voss AK, Fortune JE. Levels of messenger ribonucleic acid for cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and P450 aromatase in preovulatory bovine follicles decrease after the luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 1993; 132: 2239-2245.
- [168] Conley AJ, Bird IM. The role of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the delta 5 and delta 4 pathways of steroidogenesis in mammals. *Biol. Reprod.* 1997; 56: 789-799.
- [169] Guthrie HD, Barber JA, Leighton JK, Hammond JM. Steroidogenic cytochrome P450 enzyme messenger ribonucleic acids and follicular fluid steroids in individual follicles during preovulatory maturation in the pig. *Biol. Reprod.* 1994; 51: 465-471.
- [170] Johnson DC. Quantitative changes in ovarian 17 alpha-hydroxylase/C17,20-lyase and aromatase activities during the estrous cycle of the hamster. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1987; 184: 14-18.
- [171] Tsafiriri A, Eckstein B. Changes in follicular steroidogenic enzymes following the preovulatory surge of gonadotropins and experimentally-induced atresia. *Biol. Reprod.* 1986; 34: 783-787.
- [172] Lacroix E, Eechaute W, Leusen I. The biosynthesis of estrogens by cow follicles. *Steroids* 1974; 23: 337-356.
- [173] Demeter-Arlotto M, Rainey WE, Simpson ER. Maintenance and regulation of 17 alpha-hydroxylase expression by bovine thecal cells in primary culture. *Endocrinology* 1993; 132: 1353-1358.
- [174] Fournet N, Weitsman SR, Zachow RJ, Magoffin DA. Transforming growth factor-beta inhibits ovarian 17 alpha-hydroxylase activity by a direct noncompetitive mechanism. *Endocrinology* 1996; 137: 166-174.
- [175] Chu X KM, Corbin CJ, Coney AJ. Effects of LH and forskolin on proliferation and cytochrome P450 alpha-hydroxylase (P450C17) expression of primary porcine theca cell culture. In: *Proceedings 10 th International Congress of Endocrinology. Proceedings 10 th International Congress of Endocrinology . 1996.*

Ref Type: Abstract

- [176] Vitt UA, McGee EA, Hayashi M, Hsueh AJ. In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology* 2000; 141: 3814-3820.
- [177] Tsang BK, Armstrong DT, Whitfield JF. Steroid biosynthesis by isolated human ovarian follicular cells in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1980; 51: 1407-1411.
- [178] Hamberger L, Hillensjo T, Ahren K. Steroidogenesis in isolated cells of preovulatory rat follicles. *Endocrinology* 1978; 103: 771-777.
- [179] Aedo AR, Landgren BM, Diczfalusy E. Studies on ovarian and adrenal steroids at different phases of the menstrual cycle. 1. Dynamic changes during the periovulatory period. *Contraception* 1981; 23: 107-124.

- [180] Liu JH, Yen SS. Induction of midcycle gonadotropin surge by ovarian steroids in women: a critical evaluation. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1983; 57: 797-802.
- [181] Robker RL, Russell DL, Espey LL, Lydon JP, O'Malley BW, Richards JS. Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2000; 97: 4689-4694.
- [182] Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA, Jr., Shyamala G, Conneely OM, O'Malley BW. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev.* 1995; 9: 2266-2278.
- [183] Iwai T, Fujii S, Nanbu Y, Nonogaki H, Konishi I, Mori T, Okamura H. Effect of human chorionic gonadotropin on the expression of progesterone receptors and estrogen receptors in rabbit ovarian granulosa cells and the uterus. *Endocrinology* 1991; 129: 1840-1848.
- [184] Hild-Petito S, Stouffer RL, Brenner RM. Immunocytochemical localization of estradiol and progesterone receptors in the monkey ovary throughout the menstrual cycle. *Endocrinology* 1988; 123: 2896-2905.
- [185] Ruiz de Galarreta CM, Fanjul LF, Hsueh AJ. Progestin regulation of progesterone biosynthetic enzymes in cultured rat granulosa cells. *Steroids* 1985; 46: 987-1002.
- [186] Goff AK, Leung PC, Armstrong DT. Stimulatory action of follicle-stimulating hormone and androgens on the responsiveness of rat granulosa cells to gonadotropins in vitro. *Endocrinology* 1979; 104: 1124-1129.
- [187] Schreiber JR, Nakamura K, Erickson GF. Progestins inhibit FSH-stimulated steroidogenesis in cultured rat granulosa cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 1980; 19: 165-173.
- [188] Kezele P, Skinner MK. Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. *Endocrinology* 2003; 144: 3329-3337.
- [189] Luciano AM, Peluso JJ. Effect of in vivo gonadotropin treatment on the ability of progesterone, estrogen, and cyclic adenosine 5'-monophosphate to inhibit insulin-dependent granulosa cell mitosis in vitro. *Biol. Reprod.* 1995; 53: 664-669.
- [190] Peluso JJ, Luciano AM, Pappalardo A, White BA. Cellular and molecular mechanisms that mediate insulin-dependent rat granulosa cell mitosis. *Biol. Reprod.* 1995; 52: 124-130.
- [191] Kon SK, Cowie AT. "Milk: the mammary gland and its secretion". New-York, London: Academic Press; 1961: Vol I et II.
- [192] Sekar N, Veldhuis JD. Concerted transcriptional activation of the low density lipoprotein receptor gene by insulin and luteinizing hormone in cultured porcine granulosa-luteal cells: possible convergence of protein kinase a, phosphatidylinositol 3-kinase, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Endocrinology* 2001; 142: 2921-2928.
- [193] Seedorf U, Ellinghaus P, Roch NJ. Sterol carrier protein-2. *Biochim. Biophys. Acta* 2000; 1486: 45-54.
- [194] Cai Z, Stocco C. Expression and regulation of progestin membrane receptors in the rat corpus luteum. *Endocrinology* 2005; 146: 5522-5532.
- [195] Duffy DM, Stouffer RL. Progesterone receptor messenger ribonucleic acid in the primate corpus luteum during the menstrual cycle: possible regulation by progesterone. *Endocrinology* 1995; 136: 1869-1876.

- [196] Duffy DM, Wells TR, Haluska GJ, Stouffer RL. The ratio of progesterone receptor isoforms changes in the monkey corpus luteum during the luteal phase of the menstrual cycle. *Biol. Reprod.* 1997; 57: 693-699.
- [197] Horie K, Takakura K, Fujiwara H, Suginami H, Liao S, Mori T. Immunohistochemical localization of androgen receptor in the human ovary throughout the menstrual cycle in relation to oestrogen and progesterone receptor expression. *Hum. Reprod.* 1992; 7: 184-190.
- [198] Szoltys M, Slomczynska M. Changes in distribution of androgen receptor during maturation of rat ovarian follicles. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 2000; 108: 228-234.
- [199] Gill A, Jamnongjit M, Hammes SR. Androgens promote maturation and signaling in mouse oocytes independent of transcription: a release of inhibition model for mammalian oocyte meiosis. *Mol. Endocrinol.* 2004; 18: 97-104.
- [200] Weil SJ, Vendola K, Zhou J, Adesanya OO, Wang J, Okafor J, Bondy CA. Androgen receptor gene expression in the primate ovary: cellular localization, regulation, and functional correlations. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1998; 83: 2479-2485.
- [201] Hillier SG, Tetsuka M, Fraser HM. Location and developmental regulation of androgen receptor in primate ovary. *Hum. Reprod.* 1997; 12: 107-111.
- [202] Tetsuka M, Whitelaw PF, Bremner WJ, Millar MR, Smyth CD, Hillier SG. Developmental regulation of androgen receptor in rat ovary. *J. Endocrinol.* 1995; 145: 535-543.
- [203] Tetsuka M, Hillier SG. Androgen receptor gene expression in rat granulosa cells: the role of follicle-stimulating hormone and steroid hormones. *Endocrinology* 1996; 137: 4392-4397.
- [204] Murray AA, Gosden RG, Allison V, Spears N. Effect of androgens on the development of mouse follicles growing in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 1998; 113: 27-33.
- [205] Vendola KA, Zhou J, Adesanya OO, Weil SJ, Bondy CA. Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. *J. Clin. Invest* 1998; 101: 2622-2629.
- [206] Hickey TE, Marrocco DL, Amato F, Ritter LJ, Norman RJ, Gilchrist RB, Armstrong DT. Androgens augment the mitogenic effects of oocyte-secreted factors and growth differentiation factor 9 on porcine granulosa cells. *Biol. Reprod.* 2005; 73: 825-832.
- [207] Bagnell CA, Mills TM, Costoff A, Mahesh VB. A model for the study of androgen effects on follicular atresia and ovulation. *Biol. Reprod.* 1982; 27: 903-914.
- [208] Conway BA, Mahesh VB, Mills TM. Effect of dihydrotestosterone on the growth and function of ovarian follicles in intact immature female rats primed with PMSG. *J. Reprod. Fertil.* 1990; 90: 267-277.
- [209] Hillier SG, Ross GT. Effects of exogenous testosterone on ovarian weight, follicular morphology and intraovarian progesterone concentration in estrogen-primed hypophysectomized immature female rats. *Biol. Reprod.* 1979; 20: 261-268.
- [210] Nandedkar TD, Munshi SR. Effect of dihydrotestosterone on follicular development, ovulation and reproductive capacity of mice. *J. Reprod. Fertil.* 1981; 62: 21-24.
- [211] Farookhi R. Effects of androgen on induction of gonadotropin receptors and gonadotropin-stimulated adenosine 3',5'-monophosphate production in rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 1980; 106: 1216-1223.
- [212] Jia XC, Kessel B, Welsh TH, Jr., Hsueh AJ. Androgen inhibition of follicle-stimulating hormone-stimulated luteinizing hormone receptor formation in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1985; 117: 13-22.

- [213] Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 1986; 320: 134-139.
- [214] Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 1986; 231: 1150-1154.
- [215] Chu S, Fuller PJ. Identification of a splice variant of the rat estrogen receptor beta gene. *Mol. Cell Endocrinol.* 1997; 132: 195-199.
- [216] Kregge JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA, Smithies O. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1998; 95: 15677-15682.
- [217] PAYNE RW, HELLBAUM AA. The effect of estrogens on the ovary of the hypophysectomized rat. *Endocrinology* 1955; 57: 193-199.
- [218] Richards JS, Jonassen JA, Rolfes AI, Kersey K, Reichert LE, Jr. Adenosine 3',5'-monophosphate, luteinizing hormone receptor, and progesterone during granulosa cell differentiation: effects of estradiol and follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 1979; 104: 765-773.
- [219] Britt KL, Findlay JK. Estrogen actions in the ovary revisited. *J. Endocrinol.* 2002; 175: 269-276.
- [220] Findlay JK, Drummond AE, Dyson ML, Baillie AJ, Robertson DM, Ethier JF. Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor-beta superfamily. *Mol. Cell Endocrinol.* 2002; 191: 35-43.
- [221] Richards J.A. Perspective: the ovarian follicle- a perspective in 2001. *Endocrinology* 2001; 142: 2184-2193.
- [222] Drummond AE, Findlay JK. The role of estrogen in folliculogenesis. *Mol. Cell Endocrinol.* 1999; 151: 57-64.
- [223] Hamilton WJ, Boyd JD, Mossman HW. *Human Embriology*. Baltimore: William & Wilkins; 1962.
- [224] Gilbert SF. *Developmental Biology*. Sinauer, Sunderland, MA: 1998.
- [225] Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235: 442-447.
- [226] Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl. Cancer Inst.* 1990; 82: 4-6.
- [227] Tamanini C, De Ambrogi M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod. Domest. Anim* 2004; 39: 206-216.
- [228] Redmer DA, Doraiswamy V, Bortnem BJ, Fisher K, Jablonka-Shariff A, Grazul-Bilska AT, Reynolds LP. Evidence for a role of capillary pericytes in vascular growth of the developing ovine corpus luteum. *Biol Reprod.* 2001; 65: 879-889.
- [229] Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407: 242-248.
- [230] Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 26031-26037.

[231] Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* 1997; 18: 4-25.

[232] Tesone M, Borman SM, Hennebold JD, Stouffer RL. Differential Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF-A) Isoforms in the Monkey Corpus Luteum During the Menstrual Cycle. T Abstract 2003 SSR Annual Meeting, Cincinnati, Ohio, EE.UU. 2003.

Ref Type: Generic

[233] Hampl A, Pachernik J, Dvorak P. Levels and interactions of p27, cyclin D3, and CDK4 during the formation and maintenance of the corpus luteum in mice. *Biol. Reprod.* 2000; 62: 1393-1401.

[234] Tong W, Kiyokawa H, Soos TJ, Park MS, Soares VC, Manova K, Pollard JW, Koff A. The absence of p27Kip1, an inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases, uncouples differentiation and growth arrest during the granulosa->luteal transition. *Cell Growth Differ.* 1998; 9: 787-794.

[235] Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991; 181: 902-906.

[236] Doody KJ, Lephart ED, Stirling D, Lorence MC, Magness RR, McPhaul MJ, Simpson ER. Expression of mRNA species encoding steroidogenic enzymes in the rat ovary. *J. Mol. Endocrinol.* 1991; 6: 153-162.

[237] Zeleznik AJ, Schuler HM, Reichert LE, Jr. Gonadotropin-binding sites in the rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotropin to the preovulatory follicle. *Endocrinology* 1981; 109: 356-362.

[238] Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev.* 2000; 80: 1-29.

[239] Gordon JD, Mesiano S, Zaloudek CJ, Jaffe RB. Vascular endothelial growth factor localization in human ovary and fallopian tubes: possible role in reproductive function and ovarian cyst formation. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1996; 81: 353-359.

[240] Rodriguez-Celin A, Parborell F, Tesone M. Estudio de la expresión y localización de factores angiogénicos y sus receptores durante el desarrollo folicular en la rata. 2007. LII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, 21 al 24 de noviembre, 2007, Mar del Plata.

Ref Type: Conference Proceeding

[241] Kamat BR, Brown LF, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. Role in corpus luteum development. *Am. J. Pathol.* 1995; 146: 157-165.

[242] Otani N, Minami S, Yamoto M, Shikone T, Otani H, Nishiyama R, Otani T, Nakano R. The vascular endothelial growth factor/fms-like tyrosine kinase system in human ovary during the menstrual cycle and early pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1999; 84: 3845-3851.

[243] Shimizu T, Jiang JY, Iijima K, Miyabayashi K, Ogawa Y, Sasada H, Sato E. Induction of follicular development by direct single injection of vascular endothelial growth factor gene fragments into the ovary of miniature gilts. *Biol Reprod.* 2003; 69: 1388-1393.

[244] Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J. Biol Chem.* 1998; 273: 13313-13316.

- [245] Shimizu T, Jiang JY, Sasada H, Sato E. Changes of messenger RNA expression of angiogenic factors and related receptors during follicular development in gilts. *Biol. Reprod.* 2002; 67: 1846-1852.
- [246] Barboni B, Turriani M, Galeati G, Spinaci M, Bacci ML, Forni M, Mattioli M. Vascular endothelial growth factor production in growing pig antral follicles. *Biol. Reprod.* 2000; 63: 858-864.
- [247] Laitinen M, Ristimäki A, Honkasalo M, Narko K, Paavonen K, Ritvos O. Differential hormonal regulation of vascular endothelial growth factors VEGF, VEGF-B, and VEGF-C messenger ribonucleic acid levels in cultured human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 1997; 138: 4748-4756.
- [248] Mueller MD, Vigne JL, Minchenko A, Lebovic DI, Leitman DC, Taylor RN. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2000; 97: 10972-10977.
- [249] Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem. Sci.* 2003; 28: 488-494.
- [250] Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr. Rev.* 2004; 25: 581-611.
- [251] Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359: 843-845.
- [252] Gale NW, Thurston G, Hackett SF, Renard R, Wang Q, McClain J, Martin C, Witte C, Witte MH, Jackson D, Suri C, Campochiaro PA, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev. Cell* 2002; 3: 411-423.
- [253] Stouffer RL, Martinez-Chequer JC, Molskness TA, Xu F, Hazzard TM. Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Arch. Med. Res.* 2001; 32: 567-575.
- [254] Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997; 277: 55-60.
- [255] Asahara T, Chen D, Takahashi T, Fujikawa K, Kearney M, Magner M, Yancopoulos GD, Isner JM. Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ. Res.* 1998; 83: 233-240.
- [256] Wulff C, Wiegand SJ, Saunders PT, Scobie GA, Fraser HM. Angiogenesis during follicular development in the primate and its inhibition by treatment with truncated Flt-1-Fc (vascular endothelial growth factor Trap(A40)). *Endocrinology* 2001; 142: 3244-3254.
- [257] Geva E, Jaffe RB. Role of angiopoietins in reproductive tract angiogenesis. *Obstet. Gynecol. Surv.* 2000; 55: 511-519.
- [258] LeCouter J, Lin R, Ferrara N. Endocrine gland-derived VEGF and the emerging hypothesis of organ-specific regulation of angiogenesis. *Nat. Med.* 2002; 8: 913-917.
- [259] Schally AV, Arimura A, Kastin AJ, Matsuo H, Baba Y, Redding TW, Nair RM, Debeljuk L, White WF. Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science* 1971; 173: 1036-1038.
- [260] Khosravi S, Leung PC. Differential regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)I and GnRHII messenger ribonucleic acid by gonadal steroids in human granulosa luteal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 2003; 88: 663-672.

- [261] Kaufman JM, Kesner JS, Wilson RC, Knobil E. Electrophysiological manifestation of luteinizing hormone-releasing hormone pulse generator activity in the rhesus monkey: influence of alpha-adrenergic and dopaminergic blocking agents. *Endocrinology* 1985; 116: 1327-1333.
- [262] Pohl CR, Knobil E. The role of the central nervous system in the control of ovarian function in higher primates. *Annu. Rev. Physiol* 1982; 44: 583-593.
- [263] Rasmussen DD, Liu JH, Swartz WH, Tueros VS, Yen SS. Human fetal hypothalamic GnRH neurosecretion: dopaminergic regulation in vitro. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 1986; 25: 127-132.
- [264] Harrison GS, Wierman ME, Nett TM, Glode LM. Gonadotropin-releasing hormone and its receptor in normal and malignant cells. *Endocr. Relat Cancer* 2004; 11: 725-748.
- [265] Clayton RN, Eccleston L, Gossard F, Thalbard JC, Morel G. Rat granulosa cells express the gonadotrophin-releasing hormone gene: evidence from in-situ hybridization histochemistry. *J. Mol. Endocrinol.* 1992; 9: 189-195.
- [266] Whitelaw PF, Eidne KA, Sellar R, Smyth CD, Hillier SG. Gonadotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovary. *Endocrinology* 1995; 136: 172-179.
- [267] Ohno T, Imai A, Furui T, Takahashi K, Tamaya T. Presence of gonadotropin-releasing hormone and its messenger ribonucleic acid in human ovarian epithelial carcinoma. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1993; 169: 605-610.
- [268] Peng C., Fan N., Ligier M., Vaananen J., Leung P.C. Expression and regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor messenger ribonucleic acids in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 1994; 135: 1740-1746.
- [269] Irmer G, Burger C, Muller R, Ortmann O, Peter U, Kakar SS, Neill JD, Schulz KD, Emons G. Expression of the messenger RNAs for luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and its receptor in human ovarian epithelial carcinoma. *Cancer Res.* 1995; 55: 817-822.
- [270] Kang SK, Choi KC, Cheng KW, Nathwani PS, Auersperg N, Leung PC. Role of gonadotropin-releasing hormone as an autocrine growth factor in human ovarian surface epithelium. *Endocrinology* 2000; 141 (1): 72-80.
- [271] Kang SK, Tai CJ, Nathwani PS, Leung PC. Differential regulation of two forms of gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 2001; 142: 182-192.
- [272] Wulff C, Wilson H, Largue P, Duncan WC, Armstrong DG, Fraser HM. Angiogenesis in the human corpus luteum: localization and changes in angiopoietins, tie-2, and vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 2000; 85: 4302-4309.
- [273] Seguin C, Pelletier G, Dube D, Labrie F. Distribution of luteinizing hormone-releasing hormone receptors in the rat ovary. *Regul. Pept.* 1982; 4: 183-190.
- [274] Hazum E, Nimrod A. Photoaffinity-labeling and fluorescence-distribution studies of gonadotropin-releasing hormone receptors in ovarian granulosa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1982; 79: 1747-1750.
- [275] Tsafiriri A, Adashi EY. Local nonsteroidal regulators of ovarian function. In: Knobil E y Neill J. (ed.), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, Ltd.; 1994: 817-843.
- [276] Aten RF, Williams AT, Behrman HR. Ovarian gonadotropin-releasing hormone-like protein(s): demonstration and characterization. *Endocrinology* 1986; 118: 961-967.

- [277] Bauer-Dantoin AC JLL. Gonadotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in the ovary during the rat estrous cycle. *Endocrinology* 1995; 136: 4432-4438.
- [278] Choi JH, Gilks CB, Auersperg N, Leung PC. Immunolocalization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and type I GnRH receptor during follicular development in the human ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 2006; 91: 4562-4570.
- [279] Leung PC, Steele GL. Intracellular signaling in the gonads. *Endocr. Rev.* 1992; 13: 476-498.
- [280] Chamson-Reig A, Pignataro OP, Libertun C, Lux-Lantos VA. Alterations in intracellular messengers mobilized by gonadotropin-releasing hormone in an experimental ovarian tumor. *Endocrinology* 1999; 140: 3573-3580.
- [281] Minegishi T, Leung PC. Luteinizing hormone-releasing hormone stimulates arachidonic acid release in rat granulosa cells. *Endocrinology* 1985; 117: 2001-2007.
- [282] Wang J, Baimbridge KG, Leung PC. Changes in cytosolic free calcium ion concentrations in individual rat granulosa cells: effect of luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology* 1989; 124: 1912-1917.
- [283] Stojilkovic SS, Reinhart J, Catt KJ. Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways. *Endocr. Rev.* 1994; 15: 462-499.
- [284] Wang J, Leung PC. Role of arachidonic acid in luteinizing hormone-releasing hormone action: stimulation of progesterone production in rat granulosa cells. *Endocrinology* 1988; 122: 906-911.
- [285] Wang J, Yuen BH, Leung PC. Stimulation of progesterone and prostaglandin E2 production by lipoxygenase metabolites of arachidonic acid. *FEBS Lett.* 1989; 244: 154-158.
- [286] Grosse R, Schmid A, Schoneberg T, Herrlich A, Muhn P, Schultz G, Gudermann T. Gonadotropin-releasing hormone receptor initiates multiple signaling pathways by exclusively coupling to G(q/11) proteins. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 9193-9200.
- [287] Emons G, Muller V, Ortmann O, Schulz KD. Effects of LHRH-analogues on mitogenic signal transduction in cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1998; 65: 199-206.
- [288] Grundker C, Volker P, Emons G. Antiproliferative signaling of luteinizing hormone-releasing hormone in human endometrial and ovarian cancer cells through G protein alpha(I)-mediated activation of phosphotyrosine phosphatase. *Endocrinology* 2001; 142: 2369-2380.
- [289] Limonta P, Moretti RM, Marelli MM, Dondi D, Parenti M, Motta M. The luteinizing hormone-releasing hormone receptor in human prostate cancer cells: messenger ribonucleic acid expression, molecular size, and signal transduction pathway. *Endocrinology* 1999; 140: 5250-5256.
- [290] Kakar SS, Jennes L. Expression of gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptor mRNAs in various non-reproductive human tissues. *Cancer Lett.* 1995; 98: 57-62.
- [291] Minaretzis D, Jakubowski M, Mortola JF, Pavlou SN. Gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression in human ovary and granulosa-lutein cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1995; 80: 430-434.
- [292] Fraser HM, Sellar RE, Illingworth PJ, Eidne KA. GnRH receptor mRNA expression by in-situ hybridization in the primate pituitary and ovary. *Mol. Hum. Reprod.* 1996; 2: 117-121.

- [293] Tilly JL, Lapolt PS, Hsueh AJ. Hormonal regulation of follicle-stimulating hormone receptor messenger ribonucleic acid levels in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1992; 130: 1296-1302.
- [294] Piquette GN, Lapolt PS, Oikawa M, Hsueh AJ. Regulation of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid levels by gonadotropins, growth factors, and gonadotropin-releasing hormone in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1991; 128: 2449-2456.
- [295] Parinaud J, Beaur A, Bourreau E, Vieitez G, Pontonnier G. Effect of a luteinizing hormone-releasing hormone agonist (Buserelin) on steroidogenesis of cultured human preovulatory granulosa cells. *Fertil. Steril.* 1988; 50: 597-602.
- [296] Maeda K, Kitawaki J, Yokota K, Noguchi T, Urabe M, Yamamoto T, Honjo H. [Effects of gonadotropin-releasing hormone and its analogue (buserelin) on aromatase in cultured human granulosa cells]. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1996; 48: 89-95.
- [297] Furger C, Bourrie N, Cedard L, Ferre F, Zorn JR. Gonadotrophin-releasing hormone and triptorelin inhibit the follicle stimulating hormone-induced response in human primary cultured granulosa-lutein cells. *Mol. Hum. Reprod.* 1996; 2: 259-264.
- [298] Hillensjo T, LeMaire WJ, Clark MR, Ahren K. Effect of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and GnRH agonists upon accumulation of progesterone, cAMP and prostaglandin in isolated preovulatory rat follicles. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 1982; 101: 603-610.
- [299] Hori H, Uemura T, Minaguchi H. Effects of GnRH on protein kinase C activity, Ca<sup>2+</sup> mobilization and steroidogenesis of human granulosa cells. *Endocr. J.* 1998; 45: 175-182.
- [300] Sridaran R, Lee MA, Haynes L, Srivastava RK, Ghose M, Sridaran G, Smith CJ. GnRH action on luteal steroidogenesis during pregnancy. *Steroids* 1999; 64: 618-623.
- [301] Jones PB, Hsueh AJ. Direct inhibitory effect of gonadotropin-releasing hormone upon luteal luteinizing hormone receptor and steroidogenesis in hypophysectomized rats. *Endocrinology* 1980; 107: 1930-1936.
- [302] Massicotte J, Borgus JP, Lachance R, Labrie F. Inhibition of HCG-induced cyclic AMP accumulation and steroidogenesis in rat luteal cells by an LHRH agonist. *J. Steroid Biochem.* 1981; 14: 239-242.
- [303] Clayton RN, Harwood JP, Catt KJ. Gonadotropin-releasing hormone analogue binds to luteal cells and inhibits progesterone production. *Nature* 1979; 282: 90-92.
- [304] Hall AK, Behrman HR. Culture sensitization and inhibition of luteinizing hormone responsive production of cyclic AMP in luteal cells by luteinizing hormone, prostaglandin F<sub>2</sub> alpha and [D-Trp<sup>6</sup>]-luteinizing hormone releasing hormone. *J. Endocrinol.* 1981; 88: 27-38.
- [305] Jones PB, Hsueh AJ. Pregnenolone biosynthesis by cultured rat granulosa cells: modulation by follicle-stimulating hormone and gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 1982; 111: 713-721.
- [306] Ekholm C, Hillensjo T, Isaksson O. Gonadotropin releasing hormone agonists stimulate oocyte meiosis and ovulation in hypophysectomized rats. *Endocrinology* 1981; 108: 2022-2024.
- [307] Imai A, Iida K, Tamaya T. Tight coupling of gonadotropin-releasing hormone receptor to stimulated phosphoinositide turnover and antigonadotropic action in granulosa cells. *Gynecol. Obstet. Invest* 1992; 33: 36-41.
- [308] Friedman AJ, Barbieri RL, Doubilet PM, Fine C, Schiff I. A randomized, double-blind trial of a gonadotropin releasing-hormone agonist (leuprolide) with or without medroxyprogesterone acetate in the treatment of leiomyomata uteri. *Fertil. Steril.* 1988; 49: 404-409.

- [309] Fraser HM, Bramley TA, Miller WR, Sharpe RM. Extra pituitary actions of LHRH analogues in tissues of the human female and investigation of the existence and function of LHRH-like peptides. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1986; 225: 29-54.
- [310] Guerrero HE, Stein P, Asch RH, de Fried EP, Tesone M. Effect of a gonadotropin-releasing hormone agonist on luteinizing hormone receptors and steroidogenesis in ovarian cells. *Fertil. Steril.* 1993; 59: 803-808.
- [311] Srivastava RK, Sridaran R. Inhibition of luteal steroidogenesis by two LHRH antagonists (Nal-Glu and Nal-Arg antagonists) in the pregnant rat. *Endocr. Res.* 1994; 20: 365-376.
- [312] Knetch M, Amsterdam A, Catt KJ. Inhibition of granulosa cell differentiation by gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 1982; 110: 865-872.
- [313] Andreu C, Parborell F, Vanzulli S, Chemes H, Tesone M. Regulation of follicular luteinization by a gonadotropin-releasing hormone agonist: relationship between steroidogenesis and apoptosis. *Mol. Reprod. Dev.* 1998; 51: 287-294.
- [314] Sridaran R, Philip GH, Li H, Culty M, Liu Z, Stocco DM, Papadopoulos V. GnRH agonist treatment decreases progesterone synthesis, luteal peripheral benzodiazepine receptor mRNA, ligand binding and steroidogenic acute regulatory protein expression during pregnancy. *J. Mol. Endocrinol.* 1999; 22: 45-54.
- [315] Parborell F, Dain L, Tesone M. Gonadotropin-releasing hormone agonist affects rat ovarian follicle development by interfering with FSH and growth factors on the prevention of apoptosis. *Mol. Reprod. Dev.* 2001; 60: 241-247.
- [316] Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 1999; 399: 483-487.
- [317] Saito M, Korsmeyer SJ, Schlesinger PH. BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat. Cell Biol.* 2000; 2: 553-555.
- [318] Wilson AC, Meethal SV, Bowen RL, Atwood CS. Leuprolide acetate: a drug of diverse clinical applications. *Expert. Opin. Investig. Drugs* 2007; 16: 1851-1863.
- [319] McGee E, Spears N, Minami S, Hsu SY, Chun SY, Billig H, Hsueh AJ. Preantral ovarian follicles in serum-free culture: suppression of apoptosis after activation of the cyclic guanosine 3',5'-monophosphate pathway and stimulation of growth and differentiation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 1997; 138: 2417-2424.
- [320] Young KA, Hennebold JD, Stouffer RL. Dynamic expression of mRNAs and proteins for matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in the primate corpus luteum during the menstrual cycle. *Mol. Hum. Reprod.* 2002; 8: 833-840.
- [321] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
- [322] Woodruff TK, Lyon RJ, Hansen SE, Rice GC, Mather JP. Inhibin and activin locally regulate rat ovarian folliculogenesis. *Endocrinology* 1990; 127: 3196-3205.
- [323] Erickson GF, Magoffin DA, Dyer CA, Hofeditz C. The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. *Endocr. Rev.* 1985; 6: 371-399.
- [324] Yano T, Yano N, Matsumi H, Morita Y, Tsutsumi O, Schally AV, Taketani Y. Effect of luteinizing hormone-releasing hormone analogs on the rat ovarian follicle development. *Horm. Res.* 1997; 48 Suppl 3: 35-41.

- [325] Jones PB, Hsueh AJ. Direct effects of gonadotropin releasing hormone and its antagonist upon ovarian functions stimulated by FSH, prolactin, and LH. *Biol. Reprod.* 1981; 24: 747-759.
- [326] Magoffin DA, Erickson GF. Mechanism by which 17 beta-estradiol inhibits ovarian androgen production in the rat. *Endocrinology* 1981; 108: 962-969.
- [327] Hillier SG, Whitelaw PF, Smyth CD. Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. *Mol. Cell Endocrinol.* 1994; 100: 51-54.
- [328] Flaws JA, Kugu K, Trbovich AM, DeSanti A, Tilly KI, Hirshfield AN, Tilly JL. Interleukin-1 beta-converting enzyme-related proteases (IRPs) and mammalian cell death: dissociation of IRP-induced oligonucleosomal endonuclease activity from morphological apoptosis in granulosa cells of the ovarian follicle. *Endocrinology* 1995; 136: 5042-5053.
- [329] André CD, van Loenen MD, Judith AFH, Peter GA, Hompes MD, Cornelis BL. GnRH Agonists, Antagonists, and Assisted Conception. *Semin Reprod Med* 2002; 349-364.
- [330] Clark MR. Stimulation of progesterone and prostaglandin E accumulation by luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH analogs in rat granulosa cells. *Endocrinology* 1982; 110: 146-152.
- [331] Magoffin DA, Erickson GF. Mechanism by which GnRH inhibits androgen synthesis directly in ovarian interstitial cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 1982; 27: 191-198.
- [332] Fortune JE, Vincent SE. Progesterone inhibits the induction of aromatase activity in rat granulosa cells in vitro. *Biol. Reprod.* 1983; 28: 1078-1089.
- [333] Schreiber JR, Nakamura K, Erickson GF. Progestins inhibit FSH-stimulated granulosa estrogen production at a post-cAMP site. *Mol. Cell Endocrinol.* 1981; 21: 161-170.
- [334] Markstrom E, Svensson EC, Shao R, Svanberg B, Billig H. Survival factors regulating ovarian apoptosis -- dependence on follicle differentiation. *Reproduction.* 2002; 123: 23-30.
- [335] Maxson WS, Haney AF, Schomberg DW. Steroidogenesis in porcine atretic follicles: loss of aromatase activity in isolated granulosa and theca. *Biol. Reprod* 1985; 33: 495-501.
- [336] Uilenbroek JT, Woutersen PJ, van der SP. Atresia of preovulatory follicles: gonadotropin binding and steroidogenic activity. *Biol Reprod.* 1980; 23: 219-229.
- [337] Eckstein B, Greenbaum O, Cohen S. Kinetic studies on ovarian C-17,20-lyase activity: effect of luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 1985; 117: 2376-2382.
- [338] Eckstein B, Tsafiriri A. The steroid C-17,20-lyase complex in isolated Graafian follicles: effects of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 1986; 118: 1266-1270.
- [339] Khan I, Sridaran R, Johnson DC, Gibori G. Selective stimulation of luteal androgen biosynthesis by luteinizing hormone: comparison of hormonal regulation of P45017 alpha activity in corpora lutea and follicles. *Endocrinology* 1987; 121: 1312-1319.
- [340] Munir I, Yen HW, Geller DH, Torbati D, Bierden RM, Weitsman SR, Agarwal SK, Magoffin DA. Insulin augmentation of 17alpha-hydroxylase activity is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase but not extracellular signal-regulated kinase-1/2 in human ovarian theca cells. *Endocrinology* 2004; 145: 175-183.
- [341] Okuda K, Okazaki T, Saeki M, Mori H. The activity of 17alpha-hydroxylase/C17-C20 lyase in the ovaries of immature hypophysectomized rats treated with recombinant FSH combined with various doses of human chorionic gonadotropin. *Eur. J. Endocrinol.* 1997; 137: 530-536.

- [342] Canosa LF, Pozzi AG, Somoza GM, Ceballos NR. Effects of mGnRH on testicular steroidogenesis in the toad *Bufo arenarum*. *Gen. Comp Endocrinol.* 2002; 127: 174-180.
- [343] Wanderley MI, Negro-Vilar A. Pretreatment with phorbol ester and an LHRH agonist reduces testosterone production and protein kinase C activity in rat Leydig cells challenged with PDBu and LHRH. *Braz. J. Med. Biol Res.* 1996; 29: 1557-1565.
- [344] Braw RH, Bar-Ami S, Tsafiriri A. Effect of hypophysectomy on atresia of rat preovulatory follicles. *Biol. Reprod* 1981; 25: 989-996.
- [345] Lindheim SR, Chang PL, Vidali A, Ferin M, Sauer MV. The utility of serum progesterone and inhibin A for monitoring natural-cycle IVF-ET. *J. Assist. Reprod Genet.* 1998; 15: 538-541.
- [346] Fanchin R, Righini C, Olivennes F, Ferreira AL, De Ziegler D, Frydman R. Consequences of premature progesterone elevation on the outcome of in vitro fertilization: insights into a controversy. *Fertil. Steril.* 1997; 68: 799-805.
- [347] Urman B, Alatas C, Aksoy S, Mercan R, Isiklar A, Balaban B. Elevated serum progesterone level on the day of human chorionic gonadotropin administration does not adversely affect implantation rates after intracytoplasmic sperm injection and embryo transfer. *Fertil. Steril.* 1999; 72: 975-979.
- [348] Amsterdam A, Keren-Tal I, Aharoni D, Dantes A, Land-Bracha A, Rimon E, Sasson R, Hirsh L. Steroidogenesis and apoptosis in the mammalian ovary. *Steroids* 2003; 68: 861-867.
- [349] Moor RM, Hay MF, Dott HM, Cran DG. Macroscopic identification and steroidogenic function of atretic follicles in sheep. *J. Endocrinol.* 1978; 77: 309-318.
- [350] Terranova PF. Effects of phenobarbital-induced ovulatory delay on the follicular population and serum levels of steroids and gonadotropins in the hamster: A model for atresia. *Biol. Reprod* 1980; 23: 92-99.
- [351] Tilly JL, Kowalski KI, Schomberg DW, Hsueh AJ. Apoptosis in atretic ovarian follicles is associated with selective decreases in messenger ribonucleic acid transcripts for gonadotropin receptors and cytochrome P450 aromatase. *Endocrinology* 1992; 131: 1670-1676.
- [352] Kitajima Y, Endo T, Manase K, Nishikawa A, Shibuya M, Kudo R. Gonadotropin-releasing hormone agonist administration reduced vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors, and vascular permeability of the ovaries of hyperstimulated rats. *Fertil. Steril.* 2004; 81 Suppl 1: 842-849.
- [353] Zimmermann RC, Hartman T, Kavic S, Pauli SA, Bohlen P, Sauer MV, Kitajewski J. Vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis is essential for gonadotropin-dependent follicle development. *J. Clin. Invest* 2003; 112: 659-669.
- [354] Wulff C, Wilson H, Wiegand SJ, Rudge JS, Fraser HM. Prevention of thecal angiogenesis, antral follicular growth, and ovulation in the primate by treatment with vascular endothelial growth factor Trap R1R2. *Endocrinology* 2002; 143: 2797-2807.
- [355] Abramovich D, Parborell F, Tesone M. Effect of a vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibitory treatment on the folliculogenesis and ovarian apoptosis in gonadotropin-treated prepubertal rats. *Biol. Reprod.* 2006; 75: 434-441.
- [356] Parborell F, Abramovich D, Tesone M. Intrabursal Administration of the Antiangiopoietin 1 Antibody Produces a Delay in Rat Follicular Development Associated with an Increase in Ovarian Apoptosis Mediated by Changes in the Expression of BCL2 Related Genes. *Biol Reprod* 2007.

- [357] Oikawa M, Dargan C, Ny T, Hsueh AJ. Expression of gonadotropin-releasing hormone and prothymosin-alpha messenger ribonucleic acid in the ovary. *Endocrinology* 1990; 127: 2350-2356.
- [358] Goubau S, Bond CT, Adelman JP, Misra V, Hynes MF, Schultz GA, Murphy BD. Partial characterization of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene transcript in the rat ovary. *Endocrinology* 1992; 130: 3098-3100.
- [359] Cheng CK, Leung PC. Molecular biology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and their receptors in humans. *Endocr. Rev.* 2005; 26 (2): 283-306.