

Tesis de Posgrado

Regulación del crecimiento y diferenciación del folículo ovárico por un agonista de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH)

Parborell, M.Fernanda A.

2002

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Parborell, M.Fernanda A.. (2002). Regulación del crecimiento y diferenciación del folículo ovárico por un agonista de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3460_Parborell.pdf

Cita tipo Chicago:

Parborell, M.Fernanda A.. "Regulación del crecimiento y diferenciación del folículo ovárico por un agonista de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3460_Parborell.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**“REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO Y
DIFERENCIACIÓN DEL FOLÍCULO OVÁRICO POR
UN AGONISTA DE LA HORMONA LIBERADORA
DE GONADOTROFINAS (GnRH)”**

Autora: Lic. M. Fernanda. A. Parborell

Directora: Dra. Marta Tesone

***Tesis presentada para optar por el título de Doctora de la
Universidad de Buenos Aires***

***Laboratorio de Fisiología Ovárica
Instituto de Biología y Medicina Experimental***

2002

Nº 3460

A mis padres

A Gustavo y a Franco

“Si no luchas por algo, te dejarás vencer por todo”

Mis padres

Agradecimientos

Esta parte de la tesis la dejé para lo último porque la considero importante y difícil debido a que me resulta imposible expresar con palabras cuánto significó para mí todas las personas que se encuentran en esta lista.

A Sully, por haberme guiado y dado su apoyo en todo momento, por su infinita paciencia y dedicación, y por todo lo que aprendí de ella.

A Lili, por contestar todas mis preguntas, por sus enseñanzas y sus consejos.

A Ale, por ser una excelente persona y compañera de trabajo. Por escucharme y aconsejarme en los momentos difíciles.

A Gri, Marina y Dalia, por ser personas con una gran calidez humana y que siempre están dispuestas a ayudar.

A Gabi, por aconsejarme y estar siempre dispuesta a escuchar mis dudas y temores.

A Olguita, por su infinita paciencia en el trabajo que le damos y por ser una muy buena persona.

A Pato, por las charlas y por contestar todas mis dudas. Por ser mi referencia (que no es poco).

Al DR. Juan Carlos Calvo, por sus enseñanzas en densitometría y su eterna amabilidad.

A Loli, a Vani y a Mauro, por sus préstamos de material y por ser buenos compañeros de trabajo.

A todo el laboratorio de BR (Mónica, Lucre, Vani, Pau y Marina), por ser personas excelentes.

A (*M y V*²) por ser mis grandes amigas del alma y compartir los momentos lindos y feos de mi vida; por estar ahí cuando las necesito; por las charlas de terapia.

A *Guillermina*, por ser otra amiga del alma y compartir muy buenos momentos juntas.

A *Victoria*, por ser otra amiga increíble y se puede contar con ella en cualquier momento.

A *Alejandra*, por cuidar a Franco como su nieto, por permitirme ir a trabajar con total tranquilidad y prepararme ricas comidas.

A mis primos-sobrinos preferidos, *Rodri, Sole, Ali, Quiti, Lauri y Nico*.

A mis cuñadito/as preferida/os, *Ana, Rosi, Guille y Carlos H.*

A mis sobrinos preferidos, *Juan, Victoria, Francisco, Ana, Cecilia, Mariano, Gabriela y Agustina*.

A mis hermanos preferidos, *Florencito, M. Angélica, Luisita y Enrique*.

A *María*, por estar siempre al lado mío y darme fuerzas. Sin su ayuda, esta tesis hubiese sido imposible.

A *mis padres*, que me apoyaron y me apoyan permanentemente día a día, que creyeron en mí, por su cariño infinito.

A *Gustavo*, por “bancarme” mis malhumores, por apoyarme en forma incondicional, por protegerme, por aconsejarme y por ser el papá de Franco.

Resumen

El objetivo de esta tesis fue evaluar el efecto de la administración de un agonista de GnRH (Acetato de Leuprolide, LA) sobre la apoptosis y la esteroidogénesis ovárica. Se administró dietilestilbestrol (DES) a ratas prepúberes para obtener una población de folículos antrales tempranos. Por otro lado, se utilizó un modelo de ratas inmaduras superovuladas con gonadotrofinas (PMSG: gonadotrofina de suero de yegua preñada) con el objetivo de estimular la foliculogénesis hasta el estadio de folículos preovulatorios; parte de estos animales fueron tratados *in vivo* con LA tanto en forma crónica como aguda.

En folículos preovulatorios, LA produce un efecto directo inhibitorio sobre el desarrollo folicular, causando una disminución del número de folículos reclutados por las gonadotrofinas o bien llevando a la atresia a un mayor número de los mismos. Tanto el efecto *in vivo* como *in vitro* de LA produce un aumento de la apoptosis en los folículos preovulatorios provenientes de ratas tratadas con PMSG y este efecto es revertido parcialmente *in vitro* por EGF. El IGF-1 y el FGF fueron capaces de inhibir completamente el efecto estimulador de la apoptosis inducida por el agregado *in vitro* de LA. Con respecto a la familia de Bcl-2, LA disminuye la estabilidad de la isoforma antiapoptótica (Bcl-xL), favoreciendo la apoptosis. LA aumenta los niveles de progesterona tisular y disminuye los niveles de estradiol sérico; no modifica los niveles de la enzima P450 scc pero aumenta el contenido de la StAR en folículos preovulatorios.

En folículos antrales tempranos, FSH suprime parcialmente la apoptosis inducida por LA. En presencia del agonista, EGF, FGF e IGF-1 no son capaces de rescatar a los folículos de la apoptosis. Teniendo en cuenta las diferencias entre el efecto de FSH y los factores de crecimiento, se sugiere la existencia de un mecanismo complejo de transducción de señales para FSH en la prevención de la apoptosis que utilizaría un mecanismo de sobrevivencia que incluye señales diferentes a las usadas por los factores de crecimiento.

En conclusión, GnRH-a sería un modulador atretogénico intraovárico que interfiere en el desarrollo folicular.

Los resultados presentados en esta tesis de doctorado contribuyeron en parte a la realización de cuatro trabajos científicos que fueron publicados en revistas internacionales:

Effects of a gonadotropin-releasing hormone agonist on rat ovarian follicle apoptosis: regulation by EGF and the expression of Bcl-2 related genes.

F. Parborell, A. Pecci , O. Gonzalez, A. Vitale and M. Tesone. Trabajo aceptado para ser publicado en *Biology of Reproduction*, 2002.

Regulation of apoptosis by a gonadotropin- releasing hormone agonist in rat early antral follicles.

F. Parborell, L. Dain, M. Tesone. *Molecular Reproduction and Development* 60(2): 241-247, 2001.

Review : Gonadotropin- releasing hormone action on ovarian steroidogenesis and apoptosis.

Tesone, A. Vitale, **F. Parborell**. *Steroid Research* 2: 81-91, 1999.

Regulation of follicular luteinization by a gonadotropin-releasing hormone agonist: Relationship between steroidogenesis and apoptosis.

C.Andreu, **F.Parborell**, Silvia Vanzulli, H.Chemes and M.Tesone. *Molecular Reproduction and Development* 51: 287-294, 1998.

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
AMPc	adenosín 3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de la varianza
ATP	adenosín trifosfato
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
3-β-HSD	3-β-hidroxiesteroide deshidrogenasa
BSA	seroalbúmina bovina
Ci	curie
cpm	cuentas por millón
Da	dalton
DAB	diaminobencidina
DAG	diacilglicerol
FSH	hormona folículo estimulante
g	gramo
GnRH	hormona liberadora de gonadotrofinas
GnRH-a	Agonista de GnRH
hs	horas
hCG	gonadotrofina coriónica humana
HDL	lipoproteína de alta densidad
IP ₃	inositol 3 fosfato
l	litro
LDL	lipoproteína de baja densidad

LH	hormona luteinizante
M	molar
mA	miliampere
mg	miligramo
ml	mililitro
mM	milimolar
PGE	prostanglandina
PGF _{2α}	prostanglandina F _{2α}
PKC	proteína quinasa C
20-OH-progesterona.....	20-hidroxi-progesterona
25-OH-Ch/25-OH-colesterol	25-hidroxi-colesterol
P ₅	pregnenolona
PBS	buffer fosfato salino
pg	picogramo
PLA2	fosfolipasa A2
PLC	fosfolipasa C
PLD	fosfolipasa D
PMSG	gonadotrofina de suero de yegua preñada
RIA	radioinmunoensayo
sc.	subcutánea
SDS	dodecil sulfato sódico
SEM	error estándar de la media
T	temperatura
Tris	tris (hidroximetil)aminometano

μg	microgramo
μm	micrómetro
V	voltios
vs	versus
v/v	volumen en volumen

Indice

INTRODUCCION.....	4
1. El ovario.....	4
1.1. MORFOLOGÍA DEL OVARIO	5
1.2. DESARROLLO FOLICULAR.....	6
1.2.1. <i>Folículo primordial.....</i>	<i>6</i>
1.2.2. <i>Folículo primario.....</i>	<i>7</i>
1.2.3. <i>Folículo secundario</i>	<i>7</i>
1.2.4. <i>Folículo terciario.....</i>	<i>8</i>
1.2.5. <i>Selección del folículo dominante.....</i>	<i>11</i>
1.2.6. <i>Mecanismos de retroalimentación.....</i>	<i>12</i>
1.2.7. <i>Folículo preovulatorio.....</i>	<i>13</i>
1.2.8. <i>Regulación del desarrollo folicular.....</i>	<i>16</i>
1.3. ATRESIA FOLICULAR.....	21
1.4. OVULACIÓN	23
1.5. FORMACIÓN DEL CUERPO LÚTEO (CL)	24
1.5.1. <i>Función y regulación del CL.....</i>	<i>24</i>
1.6. LUTEÓLISIS.....	25
1.7. CICLO OVÁRICO DE LA RATA.....	26
2. Regulación hormonal en el ovario	28
2.1. PATRONES DE SECRECIÓN HORMONAL DURANTE EL CICLO ESTRAL	29
2.1.1. <i>Hormonas esteroideas.....</i>	<i>29</i>
2.1.2. <i>Hormonas no esteroideas.....</i>	<i>34</i>
3. Hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH).....	39
3.1. GNRH Y RECEPTORES DE GNRH EN HIPÓFISIS	39
3.2. GNRH Y RECEPTORES DE GNRH EN OVARIO	42
3.3. PÉPTIDOS SIMILARES A GNRH PRODUCIDOS EN EL OVARIO	44
3.4. ANÁLOGOS DE GNRH	44
4. Muerte celular	47
4.1. NECROSIS VS APOPTOSIS (MUERTE CELULAR PROGRAMADA)	47
4.2. APOPTOSIS COMO MECANISMO DE ATRESIA FOLICULAR.....	48
4.2.1. <i>Control hormonal de la atresia folicular.....</i>	<i>49</i>
4.2.2. <i>Mecanismos hormonales intraováricos involucrados en la atresia folicular</i> <i>.....</i>	<i>51</i>
4.2.3. <i>Mecanismos moleculares de la atresia.....</i>	<i>54</i>
OBJETIVOS.....	61
OBJETIVO GENERAL.....	62
HIPÓTESIS.....	62
MATERIALES Y METODOS	64

1. REACTIVOS	65
2. ANIMALES	66
3. TRATAMIENTOS	66
3.1. <i>Obtención de ratas superovuladas.</i>	66
3.2. <i>Obtención de ratas tratadas con DES</i>	66
3.3. <i>Administración de GnRH en forma crónica.</i>	66
3.4. <i>Administración de GnRH en forma aguda.</i>	67
4. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE FOLÍCULOS OVÁRICOS DE RATA	67
4.1. <i>Folículos antrales tempranos.</i>	67
4.2. <i>Folículos preovulatorios.</i>	67
5. DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS EN FOLÍCULOS OVÁRICOS POR ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA	68
6. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA Y CUANTIFICACIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DE ADN.	68
7. MEDICIÓN DE LOS NIVELES DE PROTEÍNAS ESTEROIDOGÉNICAS (CITOCROMO P450SC Y STAR) Y MIEMBROS DE LA FAMILIA DE BCL-2 POR WESTERN BLOT.	69
8. MORFOLOGÍA OVÁRICA	69
9. COLORACIÓN CON HEMATOXILINA-EOSINA	70
10. CLASIFICACIÓN Y RECuento DE FOLÍCULOS OVÁRICOS.	70
11. TUNEL	71
12. EXTRACCIÓN DE ESTEROIDES DE SUERO	71
13. EXTRACCIÓN DE ESTEROIDES DE TEJIDO (OVARIO Y FOLÍCULO)	72
14. MEDICIÓN DE ESTEROIDES	72
14.1. <i>Determinación de progesterona</i>	73
14.2. <i>Determinación de estradiol.</i>	73
15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	73
RESULTADOS	74
1. Efecto in vivo de LA sobre el crecimiento folicular y la apoptosis ovárica	75
1.1. MORFOLOGÍA OVÁRICA EN CORTES HISTOLÓGICOS	75
1.1.1. <i>Detección de apoptosis por la técnica de TUNEL</i>	81
1.1.2. <i>Cuantificación de la apoptosis por electroforesis en geles de agarosa.</i> ...	85
1.3. NIVELES DE PROTEÍNAS DE LA SUPERFAMILIA DEL GEN BCL-2 EN FOLÍCULOS PREOVULATORIOS.	87
2. Efecto in vivo de LA sobre la esteroidogénesis ovárica	91
2.1. NIVELES DE ESTRADIOL Y PROGESTERONA EN SUERO Y EN FOLÍCULO	91
2.2. NIVELES DE LA PROTEÍNA REGULATIVA AGUDA DE LA ESTEROIDOGÉNESIS (STAR) Y DE LA ENZIMA P450SCC	96
2.2.1. <i>Efecto crónico.</i>	96
2.2.2. <i>Efecto agudo</i>	99
3. Efecto in vitro de LA sobre la apoptosis en folículos preovulatorios. Interacción con factores de crecimiento	102
4. Efecto in vitro de LA sobre la apoptosis en folículos antrales tempranos. Interacción con FSH, AMPc y factores de crecimiento.	105
5. Efecto in vitro de LA sobre la producción de esteroides en folículos antrales tempranos	112

DISCUSIÓN	113
CONCLUSIONES GENERALES	126
BIBLIOGRAFÍA.....	129

INTRODUCCION

1. El ovario

1.1. Morfología del ovario

En los mamíferos, los ovarios son órganos que se localizan en la zona abdominal. Externamente, se encuentran rodeados de un epitelio cúbico simple o epitelio celómico; por debajo una capa delgada de tejido conectivo denso (falsa albugínea) y luego, una zona cortical, que comprende el estroma ovárico (formado por tejido conectivo laxo, fibroblastos y precursores de células tecales) y folículos en distintos estadios de maduración, folículos atresicos y cuerpos lúteos. También, se encuentra una zona medular que se encuentra muy vascularizada, innervada y con células musculares y tejido conectivo laxo (Byskow y col., 1988; Bloom y col., 1986). Externamente, está recubierto por serosa y en algunas especies, como en el caso de los roedores, por tejido adiposo.

En muchos mamíferos, el ovario es un ovoide pequeño y aplanado, de estructura compacta y con una superficie relativamente lisa. Al alcanzar la edad reproductiva, el órgano comienza a engrosarse, debido al crecimiento de los folículos, y aparecen protusiones sobre su superficie a medida que los folículos maduran. En animales con ovulación múltiple, como la rata, con varios folículos desarrollándose simultáneamente, la apariencia de la glándula es semejante a un racimo de uvas. En cambio, en otros animales, como el caballo, la oveja y los primates, el contorno normal del ovario se halla sólo localmente alterado (por ejemplo, por un cuerpo lúteo o un folículo de De Graff).

En el ovario adulto, las gametas no son liberadas continuamente desde el ovario, sino en forma recurrente a intervalos de tiempo que son especie-específicos; por ejemplo, 4-5 días en la rata, 28 días en la mujer, etc. Los ovocitos se encuentran rodeados por una o varias capas de células de múltiples funciones, que crecen gradualmente en número y forman eventualmente un folículo esférico lleno de líquido. En general, se observan tantos folículos como ovocitos, pero se encuentran simultáneamente en un amplio rango de tamaños y estadios de desarrollo. Los mecanismos involucrados en el crecimiento de los folículos actúan, en un mismo momento, sobre una pequeña proporción de folículos. De esta pequeña población que comienza crecer, sólo uno o unos pocos alcanzarán el tamaño especie-específico máximo que permita la ruptura y

liberación de la gameta desde el ovario; el resto de los folículos que iniciaron el crecimiento se perderán por mecanismos que los conducen a la atresia.

1.2. Desarrollo Folicular

La función del folículo ovárico es la de proveer el sistema de soporte necesario para que la célula germinal femenina, el ovocito, adquiera la capacidad para unirse a una célula germinal masculina, el espermatozoide, para producir un embrión capaz de desarrollarse hasta llegar al nacimiento. Además, sintetizan las hormonas sexuales femeninas que regulan la función reproductiva. Las células somáticas del folículo participan de varias maneras para cumplir esta función esencial para la reproducción y la supervivencia de las especies. Inicialmente, proveen los requerimientos nutritivos del ovocito que crece. Luego, controlan la maduración nuclear y citoplasmática de los ovocitos en folículos seleccionados para la ovulación y contribuyen a la atresia y destrucción de los ovocitos en los folículos no seleccionados. Estos efectos directos de las células foliculares sobre el desarrollo y destino de los ovocitos que circundan son mediados por cambios que producen en el microambiente del folículo, principalmente a través de hormonas y factores de crecimiento que secretan al fluido folicular que rodea al ovocito. Además, células foliculares especializadas (células del cúmulus) que forman la capa más interna que rodea al ovocito, están metabólicamente acopladas a él, a través de uniones estrechas (“gap junctions”), que permiten la entrada de nutrientes y moléculas regulatorias al ooplasma.

El desarrollo de los folículos comienza con la formación de los folículos primordiales en la etapa prenatal; tras el nacimiento, el proceso se interrumpe, y continúa en un período que transcurre desde la pubertad a la menopausia. La clasificación de los folículos puede estar basada en los cambios morfológicos observados durante su desarrollo o en el tamaño o diámetro folicular, o en el número de capas de células de la granulosa, y varía según los autores; algunos los clasifican como folículos primordiales, primarios, secundarios y de De Graaf (Bloom y col., 1986); otros, como folículos primordiales, primarios, secundarios, y terciarios tempranos y tardíos (Banka y col., 1985).

1.2.1. Folículo primordial

El *folículo primordial* está compuesto por un ovocito, arrestado en el estadio de diplotene de la profase meiótica, rodeado por una capa de células planas epiteliales llamadas células de la granulosa. Carece de células de la teca y tejido conectivo. Los folículos primordiales representan un reservorio de folículos en estado de reposo que disminuyen a lo largo de la vida reproductiva. La iniciación del crecimiento folicular es un proceso continuo e independiente de la acción de gonadotrofinas (Peters y col., 1973). En ausencia de influencias hipofisarias, el folículo puede alcanzar el estadio preantral temprano.

1.2.2. Folículo primario

La transformación de folículo primordial en *folículo primario*, ocurre durante la vida fetal; el ovocito aumenta de tamaño y la capa de células foliculares cambia su morfología de plana a cúbica en roedores (Balinsky, 1984; Richards, 1980; Bloom y col., 1986). En humanos, desde el quinto mes de vida fetal hasta la menopausia, la maduración folicular es continua. Es decir, todos los estadios de desarrollo folicular, incluyendo folículos primordiales, se pueden observar en los ovarios de niñas (Yeh, 2001). Entre el ovocito y las células foliculares, se desarrolla un espacio en el cual penetran microvellosidades del oolema y de las células foliculares vecinas; se acumula en ese espacio un material amorfo sintetizado por el ovocito y células foliculares llamado zona pelúcida. La zona pelúcida es una capa glicoproteica que envuelve las microvellosidades del ovocito y de las células foliculares. Los folículos primarios representan un reservorio de gametas durante el período fértil de la hembra.

1.2.3. Folículo secundario

La transformación del folículo primario a *secundario*, implica la transformación de células foliculares que forman un epitelio estratificado alrededor del ovocito, llamándose células de granulosa. (Bloom et al, 1986). Estas células poseen uniones estrechas (“gap junctions”) que permiten el acople metabólico del epitelio, asegurando

la nutrición de las capas más internas (Rabinovich, 1980; Balinsky, 1984, Bloom y col., 1986). Por fuera de la lámina basal que separa las células de la granulosa del estroma, se diferencia una teca incipiente. Además, en esta etapa se completa la maduración de la zona pelúcida (Rabinovich, 1980; Balinsky, 1984; Bloom y col., 1986). La zona pelúcida madura posee glicoproteínas, mucopolisacáridos, ácido siálico y ácido hialurónico. Las células de granulosa del folículo secundario tienen la capacidad potencial de sintetizar los tres tipos de esteroides ováricos (progestágenos, andrógenos y estrógenos) en cantidades limitadas. Sin embargo, se produce más estrógenos que andrógenos o progestágenos (Hillier y col., 1977). La enzima aromatasa cataliza la conversión de andrógenos a estrógenos (aromatización) y es el factor limitante de la producción ovárica de estrógenos. La enzima es inducida por la FSH (Moon y col., 1978), de modo que la producción de estrógenos está limitada, en parte, por el número de receptores para esta hormona. Las células de granulosa en el folículo secundario poseen receptores específicos de FSH y, en presencia de la hormona, el folículo puede aromatizar pequeñas cantidades de andrógenos y generar su propio microambiente estrogénico (McNatty y col., 1979). La FSH se combina con los estrógenos para ejercer un efecto mitogénico sobre las células de granulosa (Goldenberg y col., 1972). El destino del folículo secundario (preantral) depende de un delicado balance de esteroides. Es decir, en bajas concentraciones, los andrógenos aumentan su propia aromatización y contribuyen a la producción de estrógenos. En concentraciones más altas, la capacidad limitada de aromatización es sobrepasada y el folículo deviene androgénico y se transforma en atrésico. La atresia, al igual que el comienzo del crecimiento folicular, es un proceso continuo. Es posible que los folículos progresen en su desarrollo sólo si emergen cuando la FSH está elevada y la LH baja.

1.2.4. Folículo terciario

En el *folículo terciario* (antral), las células de la teca se dividen en dos capas: una interior, glandular y vascularizada, llamada teca interna; y otra exterior, formada por tejido conectivo y células del músculo liso, denominada teca externa. En cambio, las células de granulosa son avasculares hasta después de la ovulación. Una membrana, compuesta por colágeno tipo IV, laminina y fibronectina, separa a esta capa de la teca

interna. Bajo la influencia de los estrógenos y la FSH, se produce un aumento de la producción de fluido folicular, que empieza acumularse en los espacios intercelulares de las células de granulosa hasta que se forman los cuerpos de Call-Exner que corresponden a áreas de licuefacción o productos de secreción de celular. Estos cuerpos aumentan de tamaño, confluyen entre sí y dan origen a una cavidad llamada antro. El fluido folicular provee el medio en el cual el ovocito y las células de granulosa que lo rodean pueden nutrirse en un ambiente endócrino para cada folículo. Algunas sustancias que se encuentran en el fluido folicular son proteínas plasmáticas, enzimas intra y extracelulares, proteoglicanos, esteroides, hormonas proteicas hipofisiarias y factores no esteroideos (Chang y col., 1976; Edwards, 1974; McNatty, 1979). Las proteínas plasmáticas, las gonadotropinas y la prolactina alcanzan el ultrafiltrado antral por difusión desde los espacios vasculares externos a la membrana basal. Los proteoglicanos provienen de las células de granulosa cuya secreción depende de FSH y se cree que participan en el mantenimiento del antro mediante el aumento de su viscosidad. Ciertos esteroides son secretados por las células de la teca y por células intersticiales y difunden a través de la membrana basal hacia el antro. Los estrógenos son producidos por las células de granulosa, aunque las variaciones interfoliculares en los niveles hormonales del antro sugieren que la regulación se debería a mecanismos más complejos que la difusión.

El microambiente dado por el antro permite el acceso de hormonas como FSH y LH hasta sus receptores celulares, permitiendo amplificaciones de señales. Por lo tanto, en el ovario, folículos contiguos pueden estar en diferentes estadios de crecimiento, pero todas las células de un folículo determinado están inmersas en el mismo ambiente. La presencia de estrógenos y FSH en el fluido antral es esencial para la proliferación de las células de granulosa y para el crecimiento folicular continuo (McNatty y col., 1979). Los folículos antrales que tienen mayor proliferación celular, poseen altas concentraciones de estrógenos y menor relación andrógenos/estrógenos, permitiendo una mayor probabilidad de mantener un ovocito viable. En caso contrario, si existe un ambiente androgénico, promueve la degeneración del ovocito.

La síntesis de hormonas esteroideas parece estar compartimentalizada dentro del folículo. Si bien cada compartimento retiene la capacidad de producir andrógenos, estrógenos y progestágenos, la actividad de la aromatasas de las células de granulosa excede en gran medida a la observada en células tecaes (McNatty y col. 1979; Hillier

y col. 1989), carentes de receptores para FSH. Entonces, las células de granulosa muestran una producción preferencial de estrógenos, mientras que la síntesis de andrógenos predomina en células tecaes (McNatty y col. 1980). La biosíntesis de estrógenos dada por ambos tipos de células dio origen a la hipótesis “*dos células, dos gonadotrofinas*” (Fortune and Armstrong, 1977) (*Figura 1*). LH estimula la síntesis de andrógenos a partir del colesterol en las células tecaes. Los andrógenos difunden a través de la lámina basal por medio de una red de capilares y se convierten en estrógenos por medio de la enzima aromatasa inducida por FSH en las células de granulosa (Moon y col., 1978). Además, la progesterona liberada por las células de granulosa en respuesta a gonadotrofinas, puede difundir hacia las células tecaes convirtiéndose en sustrato para la síntesis de andrógenos. Aunque la actividad de la aromatasa es principalmente estimulada por FSH, estudios *in vitro* en células de granulosa provenientes de ratas inyectadas con FSH mostraron que LH también estimula directamente la producción de estrógenos.

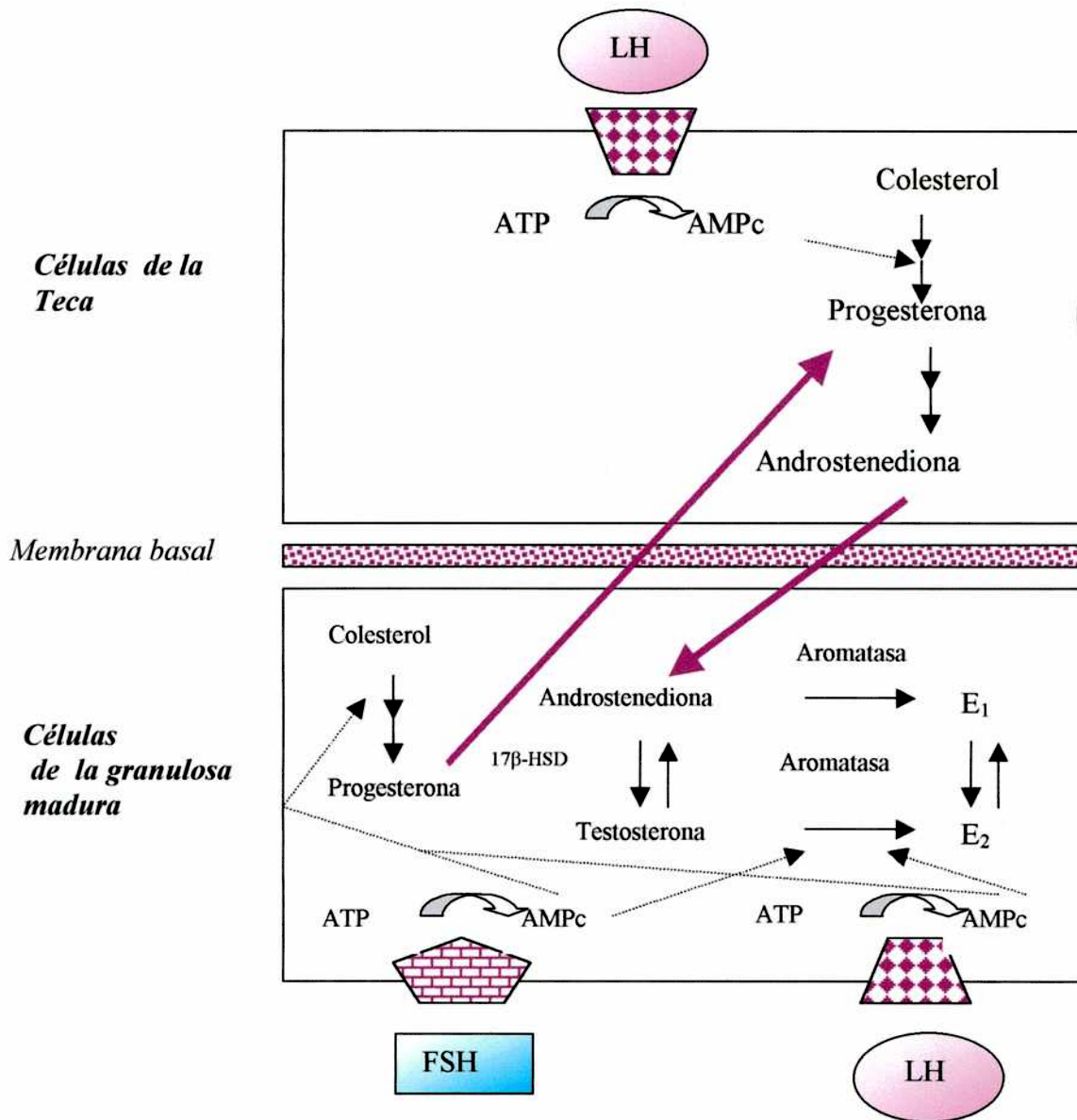


Figura 1. Esquema que describe la hipótesis de dos células-dos gonadotropinas. (Modificado de Fortune and Armstrong, 1977)

1.2.5. Selección del folículo dominante

Los estrógenos ejercen un efecto positivo sobre la acción de FSH dentro de los folículos que están madurando, pero la retroalimentación negativa que producen sobre la liberación de FSH a nivel hipotálamo-hipófisis puede servir para evitar que otros folículos sigan madurando (Zelevnik, 1981). La disminución de FSH provocaría un descenso de la actividad de la aromatasas dependiente de FSH y como consecuencia limitando la disponibilidad de estrógenos en los folículos menos maduros. Esto llevaría a la disminución de la proliferación de las células de granulosa y al aumento de andrógenos, provocando una atresia irreversible. El folículo dominante debe retener una sensibilidad única a la FSH y de esa manera aumentar la proliferación de células de granulosa, permitiendo una mayor cantidad de receptores para esta gonadotropina. Los folículos seleccionados tendrán un aumento de estrógenos que es mucho mayor que los folículos restantes. Además, estos folículos seleccionados tendrán una mayor cantidad de células de granulosa y una mayor vasculatura de la teca, permitiendo una entrada preferencial de FSH a estos folículos. Por lo tanto, los folículos dominantes tiene la ventaja de tener mayor número de receptores para FSH y poseer un fácil acceso para esta hormona. Bajo el estímulo de FSH y en presencia de estrógenos, las células expresan receptores para LH y prolactina, en la rata (Zelevnik y col. 1974; Wang y col. 1979). La síntesis de estrógenos provoca la estimulación del pico de LH e induce la expresión de receptores requeridos para la respuesta. Este mecanismo permitiría la selección de los folículos dominantes hasta llegar a la ovulación.

1.2.6. Mecanismos de retroalimentación

Los mecanismos de retroalimentación involucran esteroides gonadales y compuestos no esteroideos (inhibina, activina, folistatina). La síntesis de estrógenos está modulada por mecanismos de retroalimentación que involucran las gonadotropinas liberadas de la hipófisis. La secreción de FSH está regulada negativamente por los estrógenos (Knobil y col. 1974). En bajas concentraciones, la respuesta de FSH es inmediata; y a altas concentraciones, la supresión de FSH es profunda y sostenida. También, la LH

está regulada por los estrógenos. A niveles bajos y moderados, los estrógenos actúan negativamente sobre la liberación de la LH. Pero a concentraciones mayores, los estrógenos regulan positivamente a esta gonadotropina. Para que se produzca el pico preovulatorio de LH tanto en el humano como en los roedores, los estrógenos deben alcanzar un valor de 200 pg/ml aproximadamente (Young y col., 1976).

Por otro lado, la presencia de compuestos no esteroideos presentes en el fluido folicular influye en la liberación de las gonadotropinas. Por ejemplo, la inhibina es una proteína sintetizada por las células de granulosa de rata y humanas, que inhibe la liberación de FSH de hipófisis (Rivier y col.1986). Esta proteína pertenece a la familia de péptidos relacionados estructuralmente con el TGF- β y está formada por dos subunidades, α y β (βA y βB), unidas por puentes disulfuro (De Jong y col., 1988).

1.2.7. Folículo preovulatorio

En el folículo preovulatorio o folículo de De Graaf, las células de granulosa se agrandan y adquieren inclusiones lipídicas, mientras que en las células de la teca aparecen vacuolas y aumenta la vascularización. El ovocito reanuda la meiosis, acercándose a completar la división reduccional. El folículo aumenta de tamaño, por aumento de la población de las células foliculares y por la acumulación de fluido folicular entre las células de granulosa, cuyas uniones intercelulares se vuelven más laxas.

Los niveles de estradiol se elevan rápidamente por sobre el umbral, estimulando el pico de gonadotropinas. LH promueve la luteinización de las células de granulosa y tecales, lo que resulta en la producción de progesterona por dichas células.

La esteroidogénesis se encuentra modificada entre el momento del pico de LH y la ovulación. Las altas concentraciones de LH alcanzadas en el momento del pico preovulatorio causan una disminución de sus receptores, por internalización transitoria, en las células de granulosa y tecales (Fortune y Armstrong 1994). El incremento transitorio de la secreción de estrógenos causa la inhibición, en las células tecales, de la síntesis de andrógenos, favoreciendo la producción de progesterona. Sin embargo, luego de la ovulación, las células recuperan su capacidad de responder a la

gonadotropina; en los roedores, esta recuperación de receptores es estimulada por la prolactina.

En la rata, se observa un pico preovulatorio de progesterona y 20α -hidroxiprogesteroa cercano al momento del pico de LH. Estos altos niveles de progestágenos probablemente provengan de las células de granulosa que comienzan a luteinizarse, aunque se desconoce la contribución de las células tecaes. Este aumento en los niveles de progesterona tiene una importancia fisiológica. Tanto en humano como en rata, hay evidencias que sugieren que sin el incremento preovulatorio de progesterona, el pico de FSH que acompaña al de LH no ocurre (March y col. 1979). La hormona facilita la respuesta a la retroalimentación positiva de los estrógenos, estimulando el pico de las gonadotropinas, sólo cuando el aumento en sus niveles tenga lugar luego de una adecuada exposición a los estrógenos.

En la *Figura 2 y 3*, se puede observar un esquema donde describe los distintos estadios foliculares y su estructura celular durante el desarrollo y crecimiento.

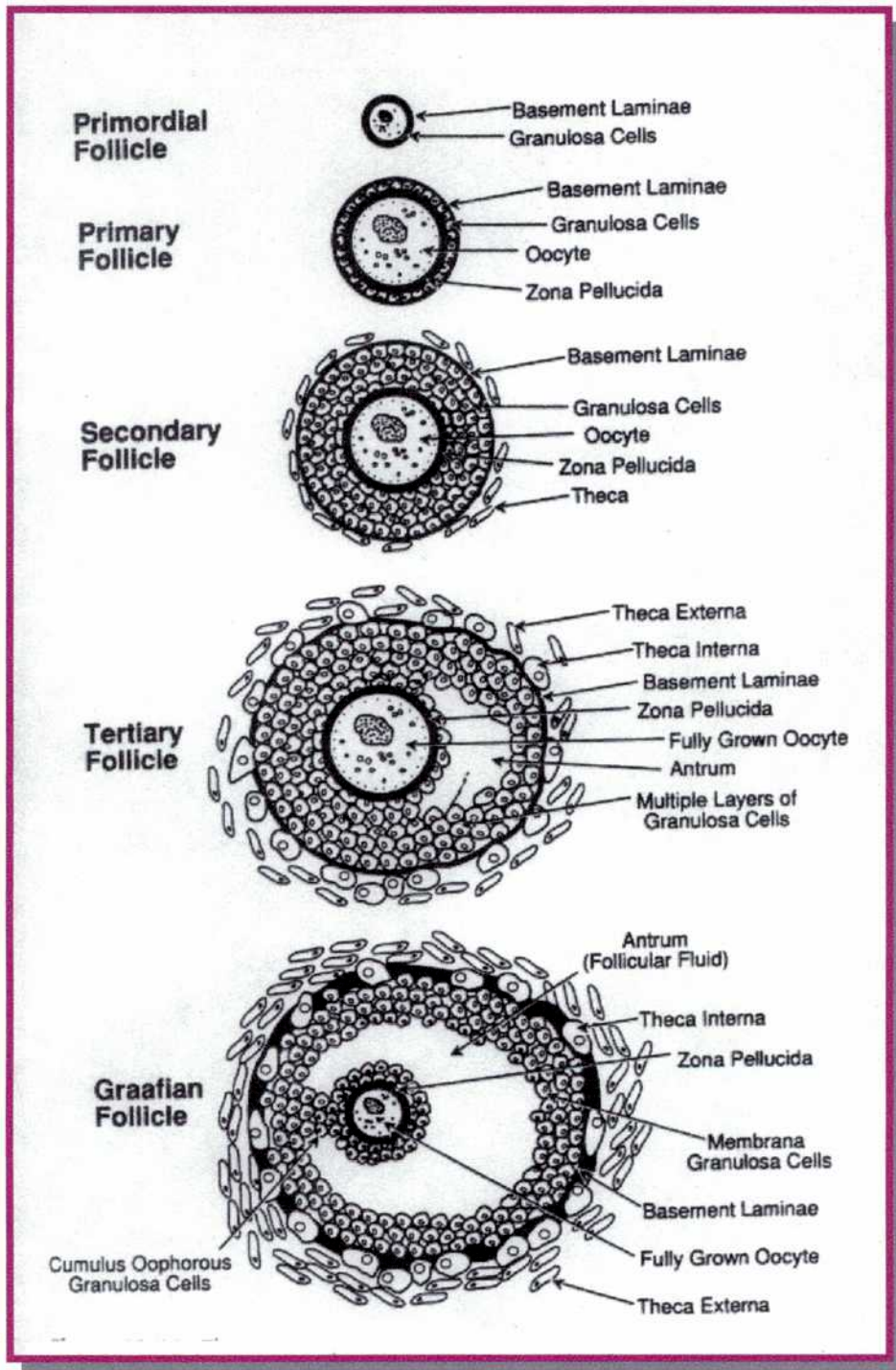


Figura 2. Estructura y clasificación del folículo ovárico durante su desarrollo y crecimiento (De Baker y col., 1999).

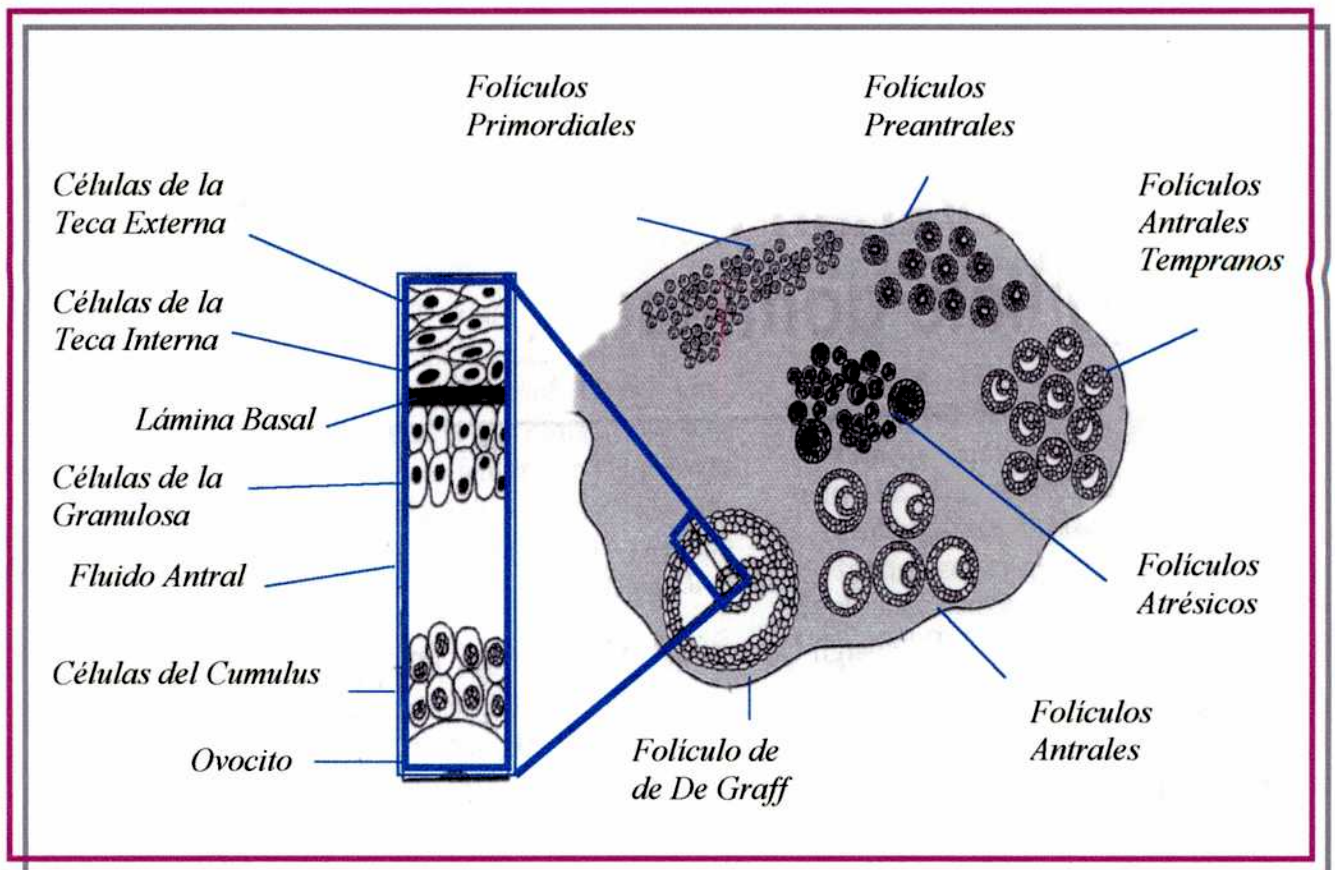


Figura 3. Estructura celular del folículo ovárico (De Erickson y col., 1985)

1.2.8. Regulación del desarrollo folicular

El término *reclutamiento* se ha usado para describir dos puntos claves durante el desarrollo folicular. Por un lado, los folículos primordiales se encuentran *reclutados hacia* una población de folículos en crecimiento de manera continua y quedan en un estado quiescente por meses o años (*reclutamiento inicial*). Por otro lado, el aumento de FSH durante el ciclo reproductivo *recluta* a una cohorte de folículos antrales (*reclutamiento cíclico*) (McGee y col., 2000) (*Figura 4*).

1.2.8.1. Reclutamiento inicial

Esta fase corresponde al crecimiento de folículos primordiales hasta el estadio antral temprano (Hsueh y col., 2000). Se caracteriza por un aumento en la proliferación de células de granulosa y por un crecimiento del antro. Con respecto al ovocito, se encuentra arrestado en profase meiótica. Durante esta etapa, factores intraováricos estimulan a los folículos primordiales a iniciar su crecimiento mientras que otros permanecen en estado quiescente. Esta fase de crecimiento no es independiente de las gonadotrofinas sino que el crecimiento es lento con bajos niveles de gonadotrofinas circundantes. La capacidad de crecimiento limitada de los folículos con niveles bajos de gonadotrofinas ha sido estudiada ampliamente. Por ejemplo, se ha observado un desarrollo folicular limitado en pacientes que toman anticonceptivos orales o que están embarazadas (Starup y col, 1974), en condiciones de hipogonadotropismo como la anorexia nerviosa (Tagatz y col, 1970) y en mujeres prepúberes.

1.2.8.2. Reclutamiento cíclico

Esta etapa comienza con el inicio de la pubertad y es el resultado del aumento de FSH circulante (en humanos: 28 días; en roedores: 4-5 días) (Hsueh y col., 2000). Aunque se sabe que el crecimiento folicular temprano es dependiente de gonadotrofinas, los estadios tardíos dependen en forma absoluta de ellas. El ovocito en esta fase adquiere la zona pelúcida y es competente para reasumir la meiosis. Los folículos antrales

maduros forman la población desde donde se reclutan los folículos destinados a ovular en el próximo ciclo. En la fase folicular temprana, la FSH estimula la actividad de la aromatasas de las células de la granulosa, lo que produce altas concentraciones intrafoliculares de estrógenos. Esto aumenta la sensibilidad del folículo a la acción de la FSH. Hacia la mitad del ciclo, un folículo, habrá producido más cantidad de estrógenos que el resto de los folículos de la cohorte. El aumento de los estrógenos e inhibina en el folículo dominante está acompañado por la disminución de los niveles circundantes de FSH. Por lo tanto, el resto de los folículos no alcanzan a desarrollarse. Estos folículos poseen alta cantidad de andrógenos y baja sensibilidad a FSH. Las gonadotropinas y los estrógenos cumplen una función determinante en la selección folicular. También, las células de la teca del folículo dominante tienen más receptores para LH y mayor vascularización respecto de los folículos no seleccionados. El aumento de la irrigación conduce a una mayor entrega de FSH a las células de la granulosa. Por lo tanto, el folículo dominante adopta un rol activo para asegurarse un medio propicio. Las causas exactas por las cuales ocurre la selección del folículo dominante no están claras. Algunas de ellas serían la expresión aumentada de los receptores para FSH y/o LH o aumento de factores de crecimiento locales que favorecen la sensibilidad del folículo frente a FSH (Evans y col., 1997). También se ha sugerido la presencia de factores atretogénicos producidos por el folículo dominante que actuarían sobre el desarrollo de folículos subordinados (Gougeon y col., 1990).

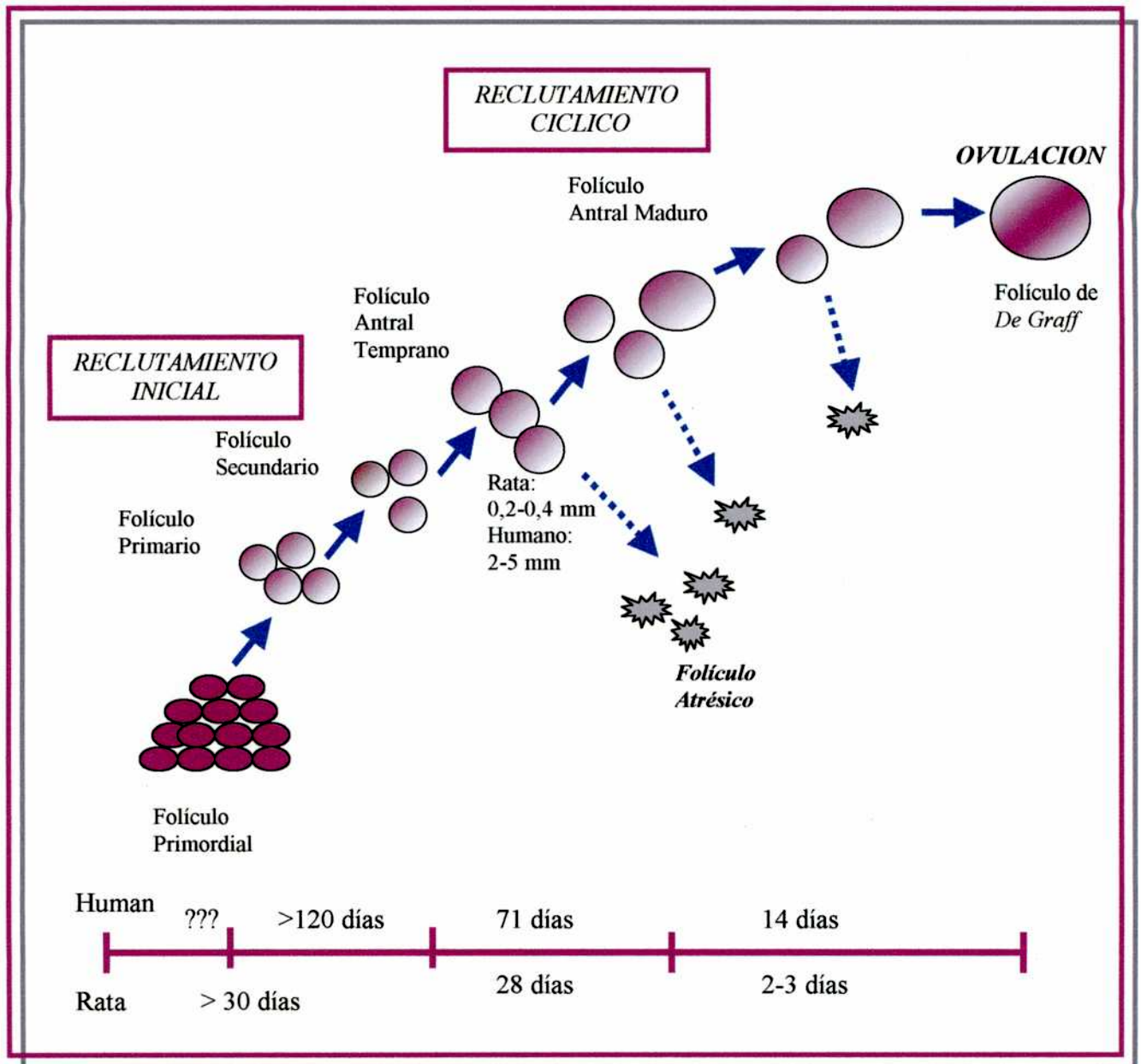


Figura 4. Duración del reclutamiento folicular en rata y humano. (Modificado de McGee and Hsueh, 2000)

1.2.8.3. Regulación del reclutamiento

El desarrollo de folículos primordiales y primarios a folículos preovulatorios requiere diferentes factores estimulatorios y de supervivencia dependiendo del estadio en que se encuentren (McGee y col., 2000). La FSH, activina y factor-9 de diferenciación y crecimiento (GDF-9) estimulan el crecimiento y la diferenciación de los folículos primarios y/o secundarios. Además, ligando/s desconocidos que activan el mecanismo de señales de GMPc podrían servir como factores de supervivencia para los folículos preantrales.

Por otro lado, FSH es el factor más potente para rescatar a los folículos antrales tempranos de la apoptosis durante el reclutamiento cíclico. Una vez que los folículos pasan a estadios más maduros, existen factores intrafoliculares (IGF-1, EGF, IL-1, GH) que son producidos localmente para asegurar la selección y el mantenimiento del folículo dominante (*Figura 5*).

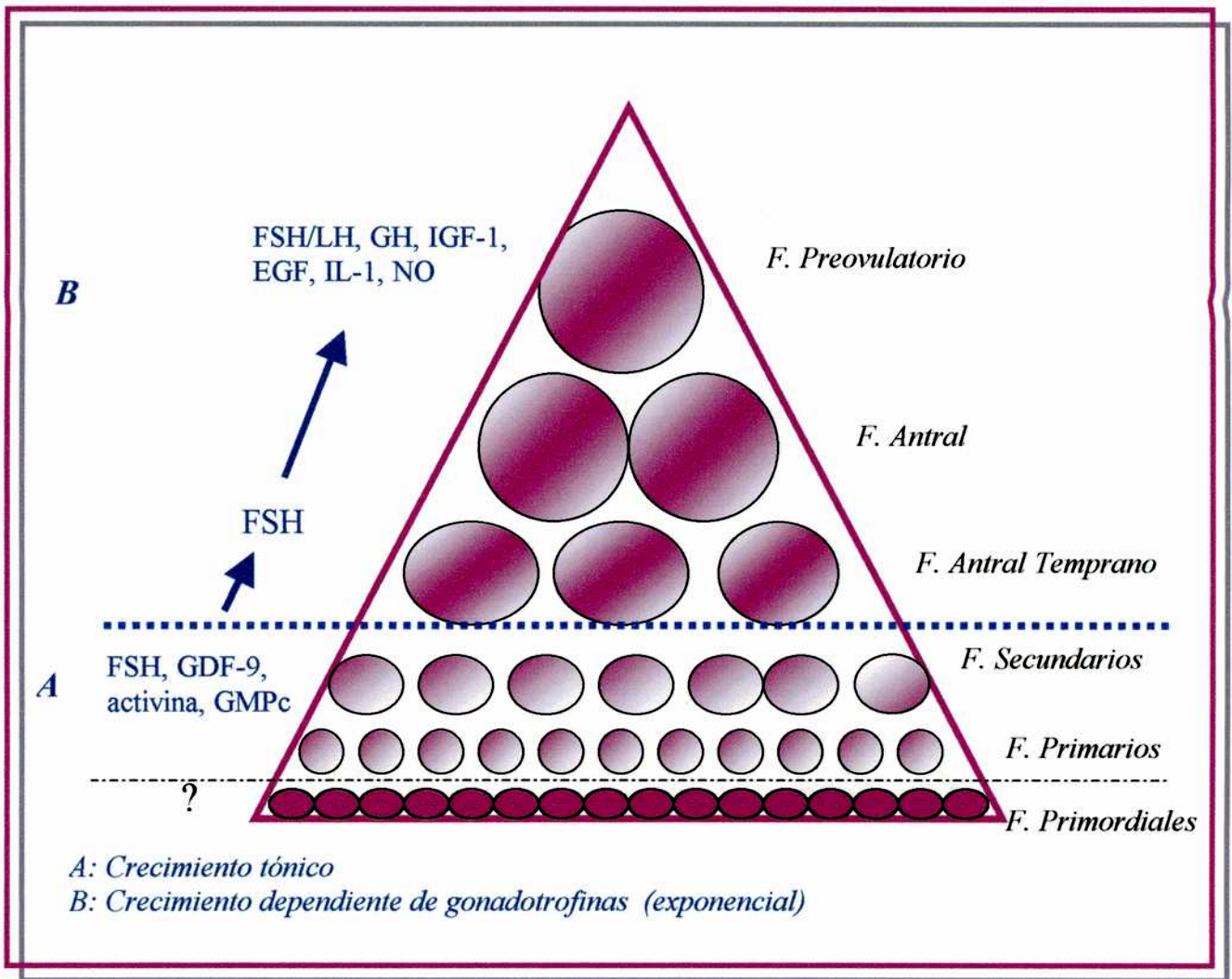


Figura 5. Factores hormonales estadio-específicos que regulan el desarrollo folicular en roedores (De McGee and Hsueh, 2000)

1.3. Atresia folicular

En el ovario humano, 2 millones de ovocitos se encuentran al nacer y alrededor de 400.000 folículos están presentes en la pubertad. Sin embargo, solamente 400 folículos serán ovulados durante la vida fértil de la mujer. Por lo tanto, 99,9 % de los folículos sufren cambios degenerativos. El proceso degenerativo por el cual los folículos son eliminados antes de llegar a la ovulación se denomina atresia. La palabra atresia deriva del idioma griego (a: no; tresia: perforado). Debido a esto, la atresia se refiere a los folículos antrales que sufren cambios degenerativos antes de llegar a la ruptura folicular.

La proporción de folículos antrales sanos y atrésicos se mantiene constante durante la vida fértil pero varía entre las especies. En la rata, 70% de los folículos antrales son atrésicos (Mandl y col., 1950); en el ratón, 50% (Jones y col., 1956) y en el humano 50-75% (Block, 1951).

Desde el punto de vista morfológico, los folículos atrésicos pueden dividirse en varios estadios (Tsafirri y col., 1994):

- Estadio I: se caracteriza por un bajo número de células de granulosa (<10%) con núcleo

picnótico cerca del antro folicular mientras otras células se encuentran en mitosis.

- Estadio II: se caracteriza por la presencia de varias células de granulosa picnóticas (10-

30%), pocas células en mitosis y restos celulares en el antro. La membrana celular pierde la integridad y existe infiltración de leucocitos en la capas de células de granulosa. En un estadio avanzado de atresia, los folículos de rata no pueden ser rescatados por tratamiento con PMSG y degeneran (Hirshfield, 1989).

Estadio III: se caracteriza por un reducción en el número de células de granulosa, ausencia de células en mitosis y un colapso del folículo. Las células de la teca se hiperatrofian y contienen gotas de lípidos. Estas células forman parte ahora de las células intersticiales del estroma y se cree que son activas a nivel esteroideogénico. También, ocurren cambios histológicos como separación de la membrana basal y presencia de cuerpos apoptóticos. Con respecto al ovocito, sufre ruptura de la vesícula germinal como resultado probablemente de los cambios ocurridos en células de granulosa.

Además de los cambios morfológicos observados durante la atresia folicular, se han identificado varios marcadores bioquímicos como la síntesis reducida de DNA en células de granulosa (Greenwald, 1989), inhibición de la expresión de la proteína conexina 43 que participa en las uniones gap (Wiesen y col., 1994) y disminución de la expresión de RNAm de los receptores para aromatasa y gonadotrofinas (Uilenbroek y col., 1980). También, se ha encontrado un aumento en la expresión de varios genes como proteínas que unen IGF-1 (IGFBPs) (Nakatani y col., 1991), catepsina D (Dhanasekaran y col., 1989) y angiotensina II (Daud y col. 1988).

1.4. Ovulación

La ovulación consiste en un aumento del tamaño folicular seguido de la protrusión del folículo desde la corteza ovárica debido a un ascenso de estrógenos, seguido de un pico de LH y FSH. Luego del pico de LH, la concentración de progesterona en el folículo preovulatorio continúa aumentando, hasta la ovulación. Este esteroide, mediante un mecanismo de retroalimentación negativa, sería el responsable de la finalización del pico de LH (Caron y col., 1975). Otra importante función de la progesterona es la de aumentar la dilatabilidad de la pared del folículo (Peters y McNatty, 1980). Un cambio en las propiedades elásticas de la pared folicular parece ser necesario para explicar el aumento de volumen del fluido folicular que ocurre antes de la ovulación, sin ninguna variación en la presión folicular (Lipner, 1973). También, la formación del estigma sobre la superficie del folículo y su posterior ruptura reflejan la acción de enzimas sobre sustratos proteicos de la membrana basal (Espey, 1974; Bjersing and Cajander, 1974). Una enzima proteolítica, el activador del plasminógeno, se ha localizado en concentraciones crecientes en las paredes foliculares ováricas de ratas justo antes de la ovulación (Beers, 1975). El activador del plasminógeno estimula la conversión de plasminógeno a una enzima proteolítica activa, la plasmina. Se conoce que ésta activa la colagenasa, presumiblemente obligatoria en la disolución de la membrana basal y del estroma folicular durante la ovulación. También, se considera que el activador del plasminógeno, puede estar envuelto en la disrupción de las uniones gap y alterar la comunicación entre el ovocito

y las células del cúmulus circundante. Luego, la ruptura folicular resulta en la extrusión de un complejo cúmulo-ovocito.

Las prostanglandinas de las series E y F también están involucradas. Su concentración aumenta en el folículo preovulatorio y es máxima en el momento de la ovulación (LeMaire y col., 1975).

Se ha demostrado que en los seres humanos, la LH y hCG estimulan la ruptura del folículo maduro. En ratas hipofisectomizadas, la FSH altamente purificada puede inducir la ovulación luego de que la maduración folicular haya sido estimulada con FSH y LH. También, se ha demostrado que los inhibidores de la síntesis de prostanglandinas (introducidos en el antro por vía sistémica o local) inhiben la ovulación en ratas y conejos (Bauminger y col., 1975).

1.5. Formación del cuerpo lúteo (CL)

1.5.1. Función y regulación del CL

Luego de la ovulación, el folículo dominante se reorganiza para convertirse en un cuerpo lúteo. Los capilares y los fibroblastos del estroma circundante proliferan y penetran la membrana basal. Esta vascularización del cuerpo lúteo puede ser dada por factores angiogénicos, algunos de los cuales pueden ser detectados en el líquido folicular. El factor de crecimiento vascular endotelial ha sido aislado del cuerpo lúteo y se ha postulado que junto al bFGF podría ser agente angiogénico potencial en el cuerpo lúteo (Kamat y col., 1995; Redmer y col., 1996). Las células de granulosa sufren cambios morfológicos conocidos como luteinización. El cuerpo lúteo representa la mayor fuente de hormonas esteroideas sexuales secretadas por el ovario durante la fase postovulatoria del ciclo.

El cuerpo lúteo está formado de por lo menos dos tipos de células esteroideogénicas, morfológicamente diferenciables: las células luteales grandes y las pequeñas. Las células luteales grandes tienen un tamaño que oscila entre 20 μm en los roedores y 40 μm o más en el humano (Enders, 1973), son de forma poliédrica, con un citoplasma claro y un núcleo central. Presentan gránulos de secreción que poseen progesterona o bien relaxina u oxitocina (Wathes y col., 1983).

Las células luteales pequeñas son de forma ahusada, presentan un citoplasma oscuro, un núcleo irregular y poseen gotas de contenido lipídico (Niswender y col., 1994). Su

tamaño no supera los 20 μm . La diferencia fundamental con este tipo celular es la ausencia de gránulos de secreción. En la rata, la diferencia entre células luteales grandes y pequeñas podría residir, no sólo en un origen celular diferente, sino también en la capacidad de responder diferencialmente a determinados estímulos del ambiente folicular, como los factores de crecimiento (O'Hara y col., 1987; Parmer y col., 1991). El regulador clave de la esteroidogénesis es la LH. Otro regulador potencial es el IGF-1 que promueve la producción de estrógenos y progesterona en las células luteínicas humanas (Johnson y col., 1996). Los receptores de estrógenos y progesterona se han localizado en el cuerpo lúteo y se ha postulado que estas hormonas también pueden regular la función del cuerpo lúteo (Revelli y col., 1996).

La producción de progesterona en la fase lútea se caracteriza por una primera etapa ascendente, un plateau y una etapa descendente. Esta síntesis de progesterona es una medida de la capacidad funcional del cuerpo lúteo y depende de varios factores. La acumulación de receptores de LH y la adecuada producción de esteroides y otros factores durante la fase folicular predetermina el grado de luteinización y la capacidad funcional del cuerpo lúteo.

Al cuerpo lúteo se lo considera una glándula endócrina ya que produce progesterona por estímulo de hormonas tróficas hipofisarias. Sin embargo, se diferencia del resto de las glándulas porque no existe una única hormona trófica para el cuerpo lúteo de todas las especies (Rothchild, 1981) En algunas, esta luteotrofina puede ser la LH; en otras, la prolactina, y hasta en otras, combinaciones de prolactina, LH y FSH (Colombo y col., 1973; Rothchild y col., 1974). En el caso de la rata, el cuerpo lúteo puede secretar progesterona en respuesta a la prolactina durante la primera semana de vida, pero solamente en respuesta a prolactina y LH juntas durante la segunda semana (Morishige and Rothchild, 1974).

1.6. Luteólisis

El cuerpo lúteo involuciona espontáneamente y es reemplazado por una cicatriz avascular conocida como cuerpo albicans, a menos que ocurra el embarazo.

En el embarazo, la hCG secretada por el trofoblasto mantiene la capacidad de secreción de progesterona por el cuerpo lúteo, lo que ayuda a mantener la gestación temprana hasta que la placenta retome esa función

En cuanto al mecanismo de la involución luteínica, la apoptosis podría ser el medio por el cual los cuerpos lúteos humanos son eliminados. Shikone y col. (1996) han demostrado que los cuerpos lúteos tempranos no mostraban evidencias de fragmentación apoptótica de DNA. Los cuerpos lúteos de fase media y los tardíos muestran dichos cambios. También, se ha postulado que la interrelación de la progesterona con las prostanglandinas sería necesaria para la luteolisis. Durante la etapa ascendente del ciclo de vida del cuerpo lúteo, éste no responde a los efectos luteolíticos de la prostanglandinas, mientras que en etapas más tardías sí lo hace (Khan y col., 1979; Lamprecht y col., 1975). En la rata y otros mamíferos, se ha descrito una relación inversa entre la secreción de progesterona y la síntesis intraluteal de prostanglandinas (Billig y col., 1988). Se han propuestos diferentes mecanismos para explicar los efectos producidos por las prostanglandinas. Uno de ellos es la disminución en el número de receptores de LH (Behrman y col., 1978), un desacoplamiento de receptor de LH y la adenilato ciclasa (Adashi y col., 1986) y un efecto citotóxico (Silvia y col., 1984). Cabe destacar que los efectos dados por las prostanglandinas varían entre distintas especies.

Durante la regresión del cuerpo lúteo en la rata, se pueden observar diferentes cambios morfológicos (Anderson and Little, 1985). Las células en degeneración parecen ser removidas por macrófagos (Paavola, 1979). El citoplasma se llena de gotas lipídicas y aumenta la cantidad de vacuolas autofágicas. La vascularización del cuerpo lúteo se empobrece y disminuye el tamaño de las células esteroideogénicas, lo que resulta en un aglomeramiento de los componentes subcelulares. Esto hace que en la fase final de la regresión luteal se observen células en las cuales las organelas más prominentes son las gotas lipídicas y los lisosomas, mientras que las demás organelas se encuentran totalmente desorganizadas.

1.7. Ciclo ovárico de la rata

El término *estro* se utilizó por primera vez por Heape (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* caracterizado como el momento en que el animal entra en celo. En ausencia de concepción, el estro es seguido por el *metaestro*, también conocido como diestro 1. El período siguiente, *diestro* (o diestro 2), tiene una duración variable de acuerdo a las especies, y es el tiempo durante el cual la secreción ovárica prepara los tejidos reproductivos para la recepción del óvulo fertilizado luego del coito en estro. En la rata dura normalmente 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 (*Figura 6*).

A nivel vaginal, los distintos estadios del ciclo se pueden determinar por observación con microscopio a bajo aumento, según los tipos celulares presentes en el extendido. En el proestro predominan células epiteliales nucleadas, redondas y algunas veces escamosas. En el estro predominan las células escamosas mientras que en el diestro 1 y 2, los leucocitos son mayoritarios.

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 lo tanto, la rata de laboratorio por estas características, y por su fácil reproducción y mantenimiento en bioterio, representa un buen modelo para el estudio de la fisiología ovárica gonadal.

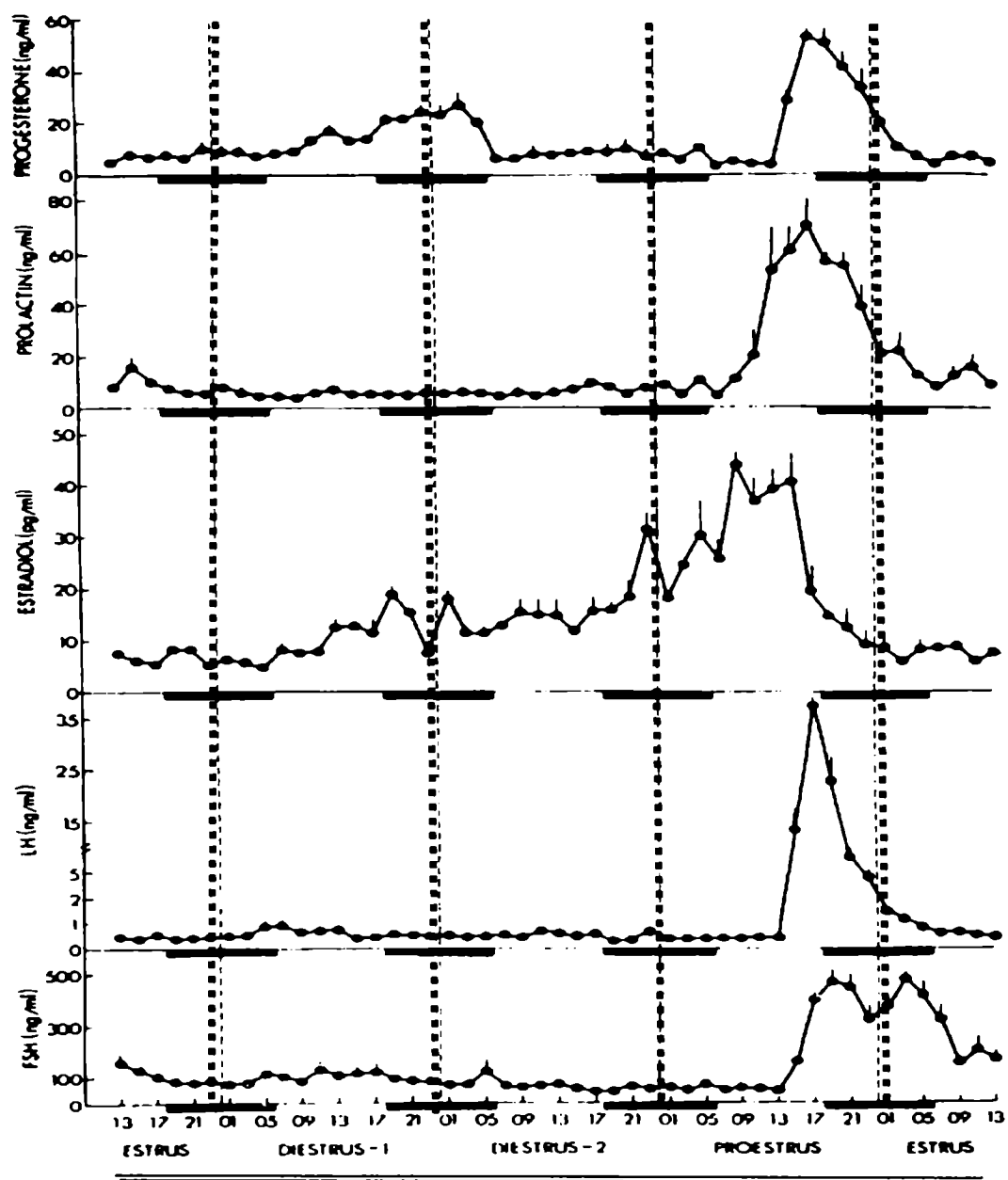


Figura 6. Niveles séricos de progesterona, prolactina, estradiol, LH y FSH, a lo largo de los cuatro días del ciclo estral en la rata. Las barras negras representan el período de oscuridad de (1800 a 0600), los números en la abscisa indican la hora del día. (De Smith y col., 1975).

2. Regulación hormonal en el ovario

Los ovarios no sólo son la fuente de ovocitos, sino también de hormonas esteroideas cuya regulación está dada por hormonas hipofisarias. Estudios posteriores demostraron la presencia de sustancias ováricas no esteroideas que ejercen efectos biológicos dentro del ovario o sobre otros órganos, y permiten explicar mecanismos de regulación en la función gonadal.

Sharpe (1984) sugirió como criterio de hormona intragonadal: a) que exista evidencia de síntesis gonadal de la hormona; b) que los receptores para dicha hormona estén presentes en la gónada; y, c) que se encuentren acciones biológicas de la hormona dentro de la gónada.

2.1. Patrones de secreción hormonal durante el ciclo estral

2.1.1. Hormonas esteroideas

2.1.1.1. Transporte intracelular del colesterol

Las hormonas esteroideas pueden clasificarse, en base a su función biológica y estructura química, en tres clases: progestágenos, andrógenos y estrógenos. Son sintetizados a partir del colesterol derivado de una de estas tres fuentes: a) incorporado de la circulación sanguínea, unido a lipoproteínas; b) almacenado dentro de la célula, como colesterol libre en las membranas celulares, o como ésteres de colesterol en gotas lipídicas citoplasmáticas; c) sintetizado *de novo* en la célula. La importancia relativa de cada una de estas rutas varía con la especie, con el tipo celular involucrado y con el estado fisiológico (Strauss y col., 1981).

En el ovario, la LH estimula la actividad de la adenilato ciclasa, produciendo AMPc que actúa como un segundo mensajero, y una de sus acciones es el aumento de la expresión del receptor para LDL. De esta manera, aumenta la entrada de colesterol a la célula y la formación de ésteres de colesterol.

La transferencia intramitocondrial del colesterol requiere una proteína de recambio, identificada como una fosfoproteína de 30 kDa designada proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR) (Clark y col., 1995). También, se han descrito otras tres proteínas, la proteína transportadora de esteroides 2 (Chanderbhan y col, 1982), el

polipéptido activador de la esteroidogénesis (Pedersen y col., 1987) y una proteína homóloga de la endozepina o del inhibidor de la fijación del diazepam (Besman y col., 1989, Yen y col., 2001), que han sido implicadas en la respuesta esteroidogénica aguda a las hormonas tróficas en la glándula suprarrenal y las gónadas.

Se creyó por muchos años que el paso limitante de la esteroidogénesis era la conversión de colesterol a pregnenolona mediada por la enzima P450 scc. Sin embargo, actualmente se considera que otro paso importante de regulación se encuentra en el transporte del colesterol desde la membrana externa hacia la membrana interna mitocondrial, atravesando el espacio intermembrana acuoso. Ese transporte está mediado por la proteína StAR nombrada anteriormente. StAR se sintetiza como un precursor de 37 kDa que posee una secuencia señal mitocondrial en el N-terminal. Además, esta proteína adquirió mayor importancia cuando se la asoció a una enfermedad conocida como hiperplasia adrenal lipídica congénita (Lin y col., 1995) que se caracteriza por la ausencia de síntesis de esteroides y por altos niveles de colesterol y ésteres de colesterol en células testiculares y adrenales. Los pacientes no sobreviven a menos que se realice una terapia hormonal esteroidea.

Los transcritos de la proteína StAR están ausentes en el ovario inmaduro debido a que es un órgano no esteroidogénico en esa etapa del desarrollo, indicando que la StAR es una proteína que está confinada solamente a células que producen esteroides. En cambio, en el ratón y humano adulto, se observó expresión de la StAR en adrenal, testículo y ovario (Clark y col., 1995).

Estudios en la expresión de StAR y de su mensajero en función del tiempo, evidenciaron una expresión bifásica de esta proteína en ovarios de ratas inmaduras tratadas con PMSG/hCG. Se observó un primer pico en respuesta a la administración de PMSG el cual duró 24 hs, y un segundo aumento con la administración de hCG. Estos resultados mostraron que esta proteína se expresa de forma variable de acuerdo al momento y estímulos bajo los cuales se encuentra el desarrollo folicular (Ronen-Fuhrmann y col., 1998).

La expresión de la StAR puede ser regulada por AMPc en forma positiva ya que se han encontrado sitios de respuesta en el promotor de la StAR cerca del sitio de comienzo de transcripción (Sugawara y col., 1995).

Estudios realizados previamente proponen varios modelos que explicarían la transferencia del colesterol a la mitocondria. Uno de los modelos sugiere la formación

de sitios de contacto entre la membrana interna y externa mitocondrial, permitiendo que se forme un puente lipídico que permitiría el pasaje del colesterol hidrofóbico hacia el interior de la mitocondria. Kallen y col. (1998), proponen otra hipótesis que sugiere que la StAR sería una proteína transportadora de esteroides que favorecería el pasaje del colesterol de una membrana a otra. En cambio, Song y col. (2001), proponen otro modelo que consiste en la formación de un “molten globule state” de la proteína StAR bajo condiciones de bajo pH. Es decir, la proteína sufriría un cambio conformacional donde perdería su estructura terciaria y mantendría su estructura secundaria, permitiendo una zona de apertura donde se expondrían dominios llamados START, que son dominios hidrofóbicos y tienen la capacidad de unir lípidos. El colesterol se uniría al dominio START y sería transferido hacia la membrana interna, donde tomaría contacto con el sistema enzimático citocromo P450 scc.

2.1.1.2. Ruptura de la cadena lateral del colesterol

El primer paso en la conversión de colesterol a esteroides es el clivaje de la unión C20-C22 que da como productos un compuesto de 21 carbonos, la pregnenolona, y un fragmento de 6 carbonos, el aldehído isocaproico. El sistema enzimático que cataliza esta reacción (SCC, por “side-chain cleavage”: ruptura de la cadena lateral) está ubicado en la cara que da a la matriz de la membrana mitocondrial interna. Es un complejo multienzimático formado por tres componentes: un citocromo P450 (P450 scc), que es la oxigenasa terminal (aceptor de electrones), una flavoproteína que contiene flavin adenin dinucleótido (FAD) y una proteína que contiene hierro y azufre, llamada luteodoxina o adrenodoxina, que transporta electrones entre los otros dos componentes. La reacción utiliza NADPH, generado dentro de la mitocondria por oxidación de intermediarios del ciclo de Krebs o de ácidos grasos.

2.1.1.3. Síntesis de pregnenolona

La pregnenolona es el intermediario clave de la biosíntesis de esteroides. Una vez sintetizada, abandona la mitocondria y en el retículo endoplasmático liso es convertida en progesterona por una enzima (o complejo enzimático): Δ^5 -3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa: Δ^5 -4-isomerasa (3 β -HSD). Las actividades de isomerasa y deshidrogenasa no se han podido separar en tejidos esteroideogénicos de mamíferos y parecen funcionar como una unidad. La enzima utiliza NAD⁺ como aceptor de electrones y la reacción es irreversible en condiciones fisiológicas.

Durante el ciclo estral de la rata, se observan dos picos de secreción de progesterona. Un primer incremento de origen folicular (células de granulosa del folículo preovulatorio) tiene lugar durante la tarde y noche del proestro, recuperando valores basales en la mañana del estro. Un segundo aumento, cuyo origen es luteal, comienza a mediodía del diestro 1 y se extiende hasta la mañana del diestro 2, cayendo a valores basales. Esta caída en los niveles de progesterona refleja la corta vida del cuerpo lúteo recién formado.

La progesterona se requiere para la implantación del ovocito fertilizado y el mantenimiento del embarazo/preñez. También, induce la desdualización del endometrio, inhibe las contracciones uterinas, aumenta la viscosidad del mucus cervical, promueve el desarrollo glandular de las mamas y aumenta la temperatura corporal basal.

2.1.1.4. Síntesis de andrógenos

El complejo enzimático que cataliza la conversión de progestágenos a andrógenos es la 17 α -hidroxilasa (C17,20-liasa). Este sistema enzimático, situado en la membrana del retículo endoplasmático liso, es una oxidasa de función mixta que contiene un citocromo P450 y requiere NADPH y O₂. La reacción puede utilizar tanto pregnenolona como progesterona como sustratos, resultando en los respectivos productos dehidroepiandrosterona (DHEA) o androstenediona. Estos dos vías alternativas son conocidas como vías Δ^5 y Δ^4 , respectivamente.

2.1.1.5. Síntesis de estrógenos

Un complejo enzimático denominado aromatasa presente en células de la granulosa, ubicado en las membranas del REL de las mismas, convierte los andrógenos: androstenediona y testosterona, provenientes de las células de la teca, en los estrógenos estrona y 17β -estradiol (esteroides C_{18}), respectivamente. El complejo contiene un citocromo P450 y cataliza una reacción en varios pasos, lo que resulta en la transformación del anillo A del esteroide en una estructura aromática. La reacción requiere NADPH y O_2 .

En el hígado, los estrógenos son metabolizados e inactivados, siendo oxidados o conjugados a glucurónico y sulfato.

El período preovulatorio del ciclo estral se caracteriza por el crecimiento folicular y el consecuente aumento en la secreción de estrógenos. En ratas con ciclo de 4 días, los niveles de estradiol periféricos comienzan a aumentar significativamente en el diestro 1 tardío hasta la mañana del diestro 2. Este incremento persiste durante el diestro 2 y proestro temprano, alcanzando su máxima concentración en la mañana del proestro. En la noche del proestro, los niveles disminuyen a valores mínimos.

2.1.1.6. Metabolismo de la progesterona

La secreción de progesterona por las células de granulosa puede ser modulada por cambios en la conversión de progesterona a sus metabolitos. La principal vía de ruptura de la progesterona es mediada por la enzima 20α -hidroxiesteroide deshidrogenasa cual convierte en forma reversible a la progesterona en su metabolito inactivo, 20α -hidroxiprogesterona (20α -OH-P). Se ha observado que la enzima 20α -OH-P se encuentra aumentada en cuerpos luteos que van a luteolisis (Lahav y col., 1977). En general, el aumento sérico del cociente de 20α -OH-P/progesterona se encuentra correlacionado con el aumento de la actividad de la enzima 20α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Hsueh y col., 1984).

En la *Figura 7*, se pueden observar las principales enzimas que intervienen en la biosíntesis de esteroides.

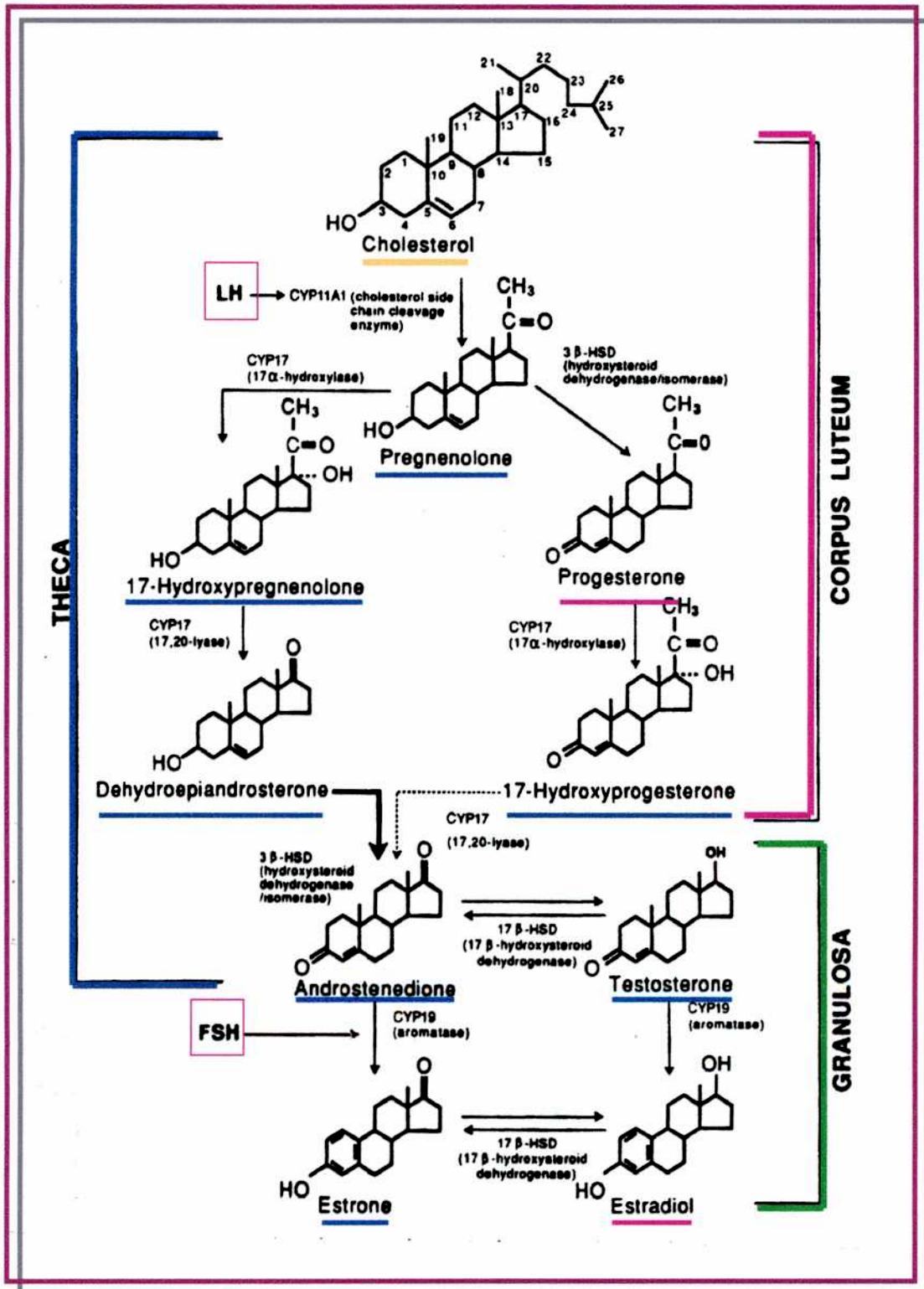


Figura 7. Principales pasos y enzimas en la biosíntesis de esteroides. (Modificado de Carr RC, 1998).

2.1.2. Hormonas no esteroideas

Aunque el rol de las gonadotrofinas y de los esteroides gonadales es indiscutible en la foliculogénesis ovárica, los diferentes destinos de los folículos sugieren la existencia de sistemas moduladores intraováricos. Entre los reguladores intraováricos potenciales que han sido estudiados, se encuentran los factores de crecimiento, las citoquinas y los neuropéptidos. Estos agentes no actúan a nivel endócrino tradicional sino que actuarían como reguladores intraováricos putativos que participan en la modulación in situ del crecimiento y de la función de los compartimentos celulares ováricos. Por ejemplo, los moduladores de las células de granulosa pueden regular el funcionamiento de las células tecointersticiales para coordinar el desarrollo folicular.

2.1.2.1 Sistema EGF/TGF- α

El EGF (factor de crecimiento epidermal) maduro comprende una cadena polipeptídica única de 53 aminoácidos que presenta tres uniones disulfuro internas. El EGF es capaz de inducir una gran variedad de respuestas celulares y fisiológicas (Celis, 1998). En cultivos de células, estimula la proliferación de diferentes tipos celulares como células epidermales, fibroblastos, células de cristalino, células gliales y endotelio vascular. El receptor para este factor es una glicoproteína intrínseca de membrana, monomérica, que une EGF con alta afinidad y especificidad. La unión de EGF con su receptor induce su autofosforilación como la fosforilación de otros sustratos celulares, siendo el sitio de autofosforilación una tirosina. Trabajos realizados con genisteína, un inhibidor de la actividad de la tirosin quinasa, demostraron el bloqueo de la supresión de la apoptosis en células de granulosa de folículos ováricos dada por EGF (Tilly y col., 1992).

El TGF- α (factor de crecimiento transformante) es un análogo estructural del EGF y está formado por 50 aminoácidos capaz de unirse a un receptor común de EGF/TGF- α (Yeh y col., 1989). El TGF- α fue aislado, por primera vez, de sobrenadantes de cultivos de células tumorales pero luego se vió que también se expresaba en hipófisis, cerebro, ovario y en macrófagos. Además, el receptor está presente en células de la teca, en células de granulosa y en cuerpo lúteo (Maruo y col., 1993). Los niveles del

ARN mensajero de EGF y TGF α son regulados positivamente por estimulación in vivo con FSH (Kudlow y col., 1987; Tsafiriri y col., 1994). Aunque estudios inmunohistoquímicos localizan al TGF- α en células tecales de los folículos tanto en rata (Kudlow y col., 1987) como en bovino (Lobb y col., 1989), se ha detectado la presencia de receptores de alta afinidad para EGF/TGF- α en células de granulosa de folículos en rata (Hsueh y col., 1992). Es posible que la muerte celular apoptótica en células de granulosa de folículos seleccionados a ovular sea prevenida por acciones parácrinas de EGF/ TGF- α secretados por las células tecales intersticiales o por acciones autócrinas de FGFb (factor de crecimiento fibroblástico) sintetizado por las células de granulosa (Hsueh y col., 1992).

2.1.2.2. Familia de factores de crecimiento similares a insulina

El IGF-1 es un polipéptido de 70 aminoácidos que es ubicuo porque tiene diversas funciones en varios tejidos. El EGF-II es un polipéptido de 67 aminoácidos con un 62% de homología con el IGF-I. El IGF-II se expresa en tejidos fetales y adultos. En el ovario de rata, el ARN mensajero de IGF-I se localiza en células de granulosa de folículos en desarrollo (Oliver y col., 1989). Estas células poseen receptores para IGF-I, los cuales unen IGF-1 con alta afinidad comparado a IGF-II o insulina. (Hsueh y col., 1994). IGF-I se sinergiza con las gonadotropinas en la estimulación de la producción de estradiol y progesterona como en la síntesis de receptores para LH/hCG (Hsueh y col., 1994). Estos resultados indicarían un importante rol de IGF-I en la selección de los folículos preovulatorios mediante la amplificación de la acción de las gonadotropinas. El EGF-II se localizó en folículos antrales como en folículos dominantes (El-Roeiy y col., 1994) y se ha considerado que representa el principal IGF en los seres humanos (Geisthovel y col., 1989). Este factor actúa en forma autócrina en las células de la teca y en forma parácrina en las células de granulosa de folículos antrales tempranos. Mientras que en los folículos dominantes, el IGF-II es un agente parácrino. Estas observaciones llevarían a pensar que los IGF participarían en las comunicaciones intercompartimentales favoreciendo el desarrollo folicular.

La acción hormonal de los IGF está modulada por proteínas de bajo peso molecular que se unen en forma específica. Existen 6 proteínas (IGFBP) que regulan los efectos de los IGF sobre el ovario por medio de la unión a proteínas o por efecto directo en la Oosteroidogénesis. La regulación de la expresión de las IGFBP que unen IGF depende de FSH y los IGF (Iwashita y col., 1996). En células de granulosa de rata, se ha encontrado IGFBP-4 y -5, y el tratamiento con FSH disminuye la secreción de estas proteínas en ovario de rata (Hsueh y col., 1994). El análisis in situ demostró la presencia de IGFBPs en folículos atrésicos pero no en los sanos (Erickson y col., 1992). También, Chun y col. (1994) demostraron que el tratamiento con IGF-1 como con FSH y hCG suprimían la apoptosis espontánea en el folículo preovulatorio de rata. Estos resultados sugerirían que IGF-1 actuaría como un factor de supervivencia en las células foliculares.

2.1.2.3. Familia de factores de crecimiento transformantes

Los factores de crecimiento transformadores forman una familia de polipéptidos de 25 kDa constituidos por dos cadenas homodiméricas. Se han identificado tres isoformas (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3). Además, el TGF- β se une a receptores de tipo I y tipo II. Estos factores ejercen acciones regulatorias sobre una variedad de tejidos. Entre las funciones de la familia de TGF β , se pueden mencionar: la respuesta antiproliferativa que involucra el control de la expresión del gen myc, la estimulación de la quimiotaxis de los fibroblastos y de otros tipos celulares; la estimulación de la reparación tisular y la formación de hueso y el incremento en la supervivencia de las neuronas. En el ovario, el TGF- β 1 altera la proliferación y la diferenciación de las células de granulosa en ratas (Magoffin y col., 1989). Se ha demostrado la presencia de RNAm de TGF- β 1 y TGF- β 2 en ovocitos, células de granulosa y de la teca (Chegini y col, 1992; Li y col, 1994).

2.1.2.4.1. Inhibina

Como se mencionó anteriormente, es una glucoproteína de 32 kDa formada por dos subunidades llamadas α (18kDa) y β (12 kDa), ligadas por uniones disulfuro. La inhibina es un heterodímero constituido por una subunidad α común pero con diferentes subunidades B, conocidas como β_A y β_B , respectivamente. Las formas de $\alpha\beta_A$ y $\alpha\beta_B$ se llaman A y B. La mayor parte de la inhibina es sintetizada por las gónadas. En el ovario, la fuente de inhibina son las células de granulosa. Su función es inhibir la síntesis de FSH en la hipófisis. La síntesis de las isoformas parece estar reguladas de forma distinta durante la fase folicular y luteínica.

La inhibina B es secretada durante la fase folicular temprana y luego decrece. Los niveles de inhibina A son bajos en la fase folicular pero aumenta en la fase luteínica.

Las tres subunidades se expresan en respuesta a gonadotrofinas o factores que aumentan las concentraciones de AMPc intracelulares (Aloi y col, 1995).

2.1.2.4.2. Activina

Está compuesta por dímeros de la subunidad β de la inhibina ($\beta_A\beta_B$, $\beta_A\beta_A$ o $\beta_B\beta_B$). A diferencia de la inhibina, es posible que la activina no desempeña un rol endógeno en el eje hipofiso-gonadal dado que en los seres humanos la mayor cantidad de activina sérica se encuentra unida a proteínas (folistatina principalmente). Durante el ciclo menstrual se observan menos variaciones de la activina A que de la inhibina. Se observaron niveles altos en la mitad del ciclo y al final de la fase lútea. También, los niveles séricos de activina son altos durante el embarazo. La activina derivada de células de granulosa estimula la expresión de receptores de LH dada por FSH en células de granulosa e inhibe la síntesis de andrógenos inducida por LH en células tecales.

2.1.2.4. Familia del factor de crecimiento fibroblástico (FGF)

El FGF es un polipéptido de 146 aminoácidos y posee un rol mitogénico en varias células derivadas del mesodermo y neuroectodermo. Existen varios homólogos del FGF, como por ejemplo, el FGFb es una forma trunca que carece de los primeros 15 residuos y fue identificado en el cuerpo lúteo ovárico (Dodson y col., 1987). El RNAm del FGFb y el receptor han sido identificados en células de granulosa humanas (Di Blasio y col., 1993). Se ha sugerido que este polipéptido modula la angiogénesis, la proliferación, la síntesis de progesterona y la apoptosis en ovario (Tapanaiem y col., 1987; Chun y col., 1996). Al igual que EGF y TGF α , FGF actúa mediante un receptor que posee actividad tirosina kinasa. Estudios realizados en cultivos de células de granulosa y en folículos preovulatorios de ratas demostraron que FGFb, EGF y TGF α son capaces de inhibir la fragmentación apoptótica de ADN (Tilly y col., 1992). Estos resultados sugerirían importantes funciones para estos factores de crecimiento en la modulación de la muerte celular programada en folículos ováricos.

3. Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)

3.1. GnRH y receptores de GnRH en hipófisis

La GnRH es un decapeptido producido por el núcleo arcuato del hipotálamo. La molécula tiene una configuración en horquilla, haciendo los aminoácidos 6-7 más vulnerables a la degradación por las endopeptidasas hipofisiarias. La acción de las peptidasas hipofisiarias es responsable de la vida media corta de la GnRH (2-8 minutos).

Los aminoácidos 1, 6 y 10 son esenciales en el mantenimiento de la configuración necesaria para la unión de la hormona a las células gonadotropas. La capacidad de la GnRH para inducir la síntesis y liberación de las gonadotropinas (FSH y LH) reside en el segundo y tercer aminoácido

Embriológicamente las neuronas GnRH provienen de la placa olfatoria. Por migración a través del nervio olfatorio, alrededor de 500-1000 neuronas GnRH terminan localizadas en el hipotálamo, en el área peróptica-supraquiasmática y en el hipotálamo medio basal, (centro funcional oscilador), y proyectan sus axones hacia la eminencia media (Libertun y col, 1995). Luego la GnRH es liberada en los capilares del sistema portal hipotálamo-hipofisario, actuando en la adenohipófisis. La GnRH es secretada en forma pulsátil con el fin de provocar la liberación de LH y FSH. La reproducción en mamíferos, tanto en machos como hembras, depende de la neurosecreción apropiada de GnRH. Se ha demostrado en varios estudios en los cuales el bloqueo de la acción de GnRH por inmunoneutralización o antagonistas del receptor, conduce a una disminución o cese de la liberación de gonadotrofinas. La naturaleza pulsátil es esencial para el mantenimiento de las gonadotrofinas en niveles normales. Se ha observado que en mujeres amenorreicas y en monjas con lesión hipotalámica, la administración de GnRH en forma pulsátil (1 pulso cada 60-90 minutos) restablece las secreción de FSH y LH. Pero si se administra en forma pulsátil variando la frecuencia (2-3 pulsos/hora o 1 pulso/hora), no se logra inducir la secreción de gonadotrofinas (Levine y col., 1982; Levine y col., 1991).

Las infusiones continuas de altas dosis de GnRH resultan en una supresión gonadal o “castración química o farmacológica”, la cual puede ser mantenida indefinidamente en respuesta a la administración crónica del péptido (Imai y col., 1992).

Se han propuesto dos mecanismos mediante los cuales se explican la acción antigonadotrófica de GnRH: la desensibilización y la regulación inhibitoria. El primero se refiere a un desacoplamiento de la unión GnRH-receptor de la liberación de las gonadotrofinas. El segundo se refiere a un número reducido de receptores disponibles debido a una internalización de los complejos hormona-receptor; aunque puede existir síntesis *de novo* de receptores, la administración continua de GnRH no permitiría la restitución de receptores no ocupados (Friedman y col., 1988).

En cuanto a su mecanismo de acción, una vez que la hormona se une a su receptor, se promueve la liberación de calcio (Ca^{2+}) de los depósitos intracelulares, debido al incremento en la hidrólisis de fosfoinosítidos, con la formación de diacilglicerol (DAG) y de inositol-3 fosfato (IP_3), el cual se une a receptores específicos presentes en dichos depósitos (Figura 9). El aumento en los niveles de Ca^{2+} intracelular, conduce a los procesos secretorios dependientes de Ca^{2+} y la formación simultánea de

DAG, activa proteínas kinasas, entre ellas a la proteína kinasa C (PKC), que es una enzima dependiente de calcio y de fosfolípidos (Friedman y col., 1988). La PKC está presente en la adenohipófisis, y podría participar en la liberación de ACTH (Hormona Adrenocorticotropa), prolactina, GH (Hormona de Crecimiento), TSH (Hormona estimuladora de la tiroides), β -endorfinas y gonadotrofinas (FSH y LH). El rol de PKC en la secreción de gonadotrofinas, se sugiere por la capacidad de GnRH de causar la traslocación de la enzima citosólica a la membrana (Stojilkovic y col., 1989). Del total de receptores presentes en la célula, sólo se requiere el 10% ocupado para producir la máxima liberación de gonadotrofinas; posteriormente se produce una microagregación de los complejos hormona-receptor, lo cual amplifica la acción de GnRH. Luego de la activación, los complejos son internalizados en la célula, donde la GnRH es degradada y el receptor, reciclado o degradado.

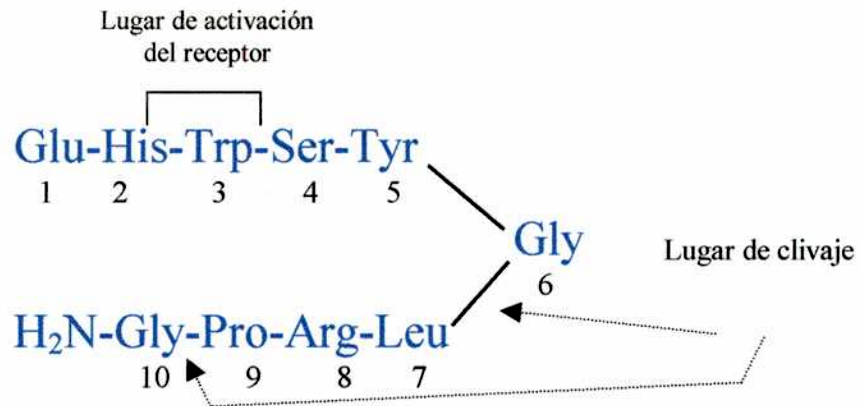


Figura 8. Estructura química del decapeptido hipotalámico GnRH. (De Friedman y col., 1988).

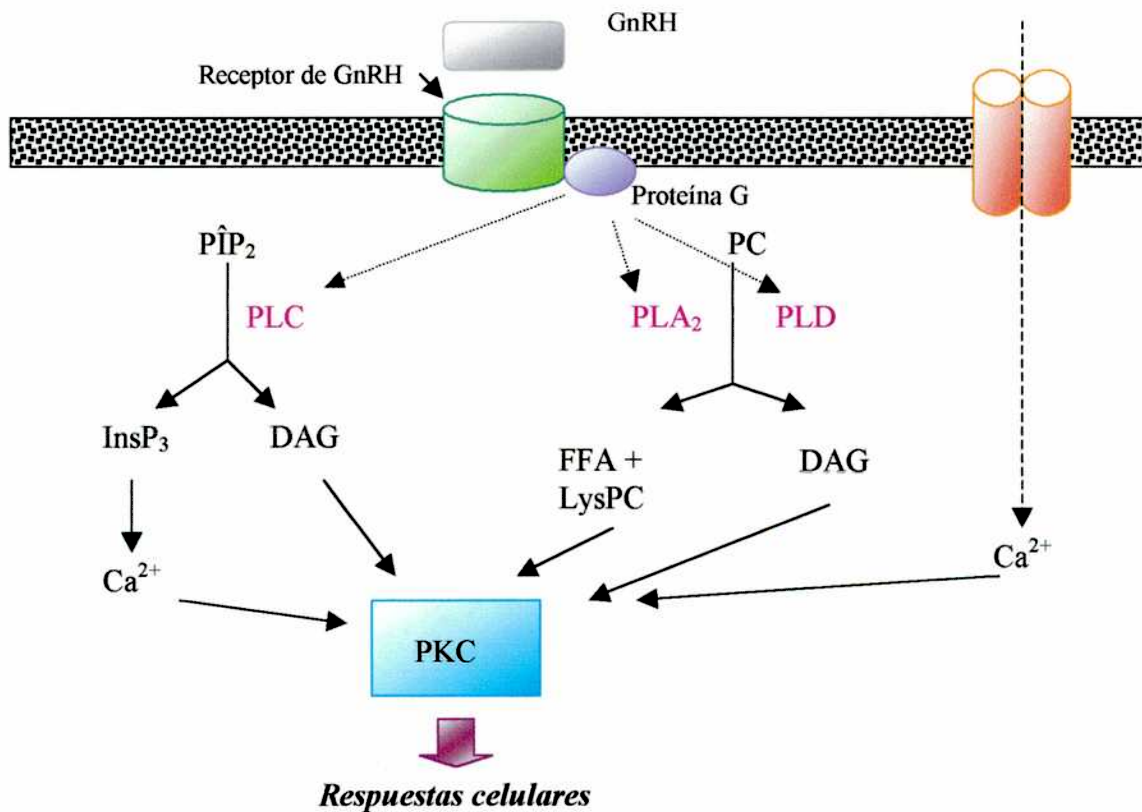


Figura 9. Mecanismo de acción de GnRH. Las fosfolipasas (PLC, PLA₂ y PLD) intervienen en los mecanismos de señales que conducen a la activación de las vías dependientes de PIP₂ (fosfatidilinositol bifosfato) y ácido araquidónico. InsP₃, inositol trifosfato; DAG, diacilglicerol; FFA, ácido graso no saturado; LysPC, lisofosfatidilcolina. (De Stojilkovic y col., 1994).

3.2. GnRH y receptores de GnRH en ovario

En un principio se creía que la GnRH hipotalámica actuaba exclusivamente en hipófisis, aumentando la síntesis de gonadotrofinas. Pero luego se encontraron receptores para GnRH en tejidos extrahipofisarios, como ovario, testículo, mamas, cerebro y placenta (Fraser y col., 1986; Guerrero y col., 1993; Erickson y col., 1994). Los receptores de GnRH se han caracterizado en células de la teca interna, granulosa y cuerpo lúteo de numerosas especies (Seguin y col., 1982; Hazum y col., 1982; Whitelaw y col., 1995). En ratas se han descrito receptores de alta afinidad en células de granulosa y luteales (Tsafriri y col., 1994). En cambio, en bovinos, equinos, porcinos y en humanos, no se encontraron receptores de alta afinidad para GnRH, pero sí de baja afinidad, en cuerpos lúteos y células de granulosa de folículos dominantes humanos (Tsafriri y col., 1994)

Estudios de unión con la hormona marcada con un fluorocromo, revelaron una distribución inicial uniforme de los receptores sobre la superficie de las células de granulosa, seguida por la formación de agregados e internalización (Tsafriri y col., 1994).

La caracterización del receptor de GnRH ovárico resultó en la identificación de dos componentes con peso molecular aparente de 60 y 54 kDa; dado que sólo el de 60 kDa está presente en la hipófisis, se sugiere que el componente extra participaría en funciones específicas en el ovario (Tsafriri y col., 1994). Por ejemplo, estudios realizados en humanos demostraron que el tratamiento *in vitro* con GnRH afecta la secreción basal y estimulada por FSH y LH de progesterona y estradiol en células de granulosa (Oloffson y col., 1994; Guerrero y col., 1993).

El número de receptores para GnRH estaría regulado por gonadotrofinas (Oloffson y col., 1995) y por el propio ligando en células de granulosa de rata (Tsafriri y col., 1994). Se ha descrito el efecto de LH exógena en cultivos de granulosa de rata, que produce un “down regulation” de los transcritos del receptor de GnRH. También, dosis bajas de GnRH o en forma pulsátil, causa “up-regulation” de su propio receptor. Pero la administración crónica, produce una disminución de sus receptores en cultivos de células de granulosa de rata (Oloffson y col., 1995).

La respuesta producida por la unión de GnRH en ovario es similar a la observada en hipófisis. Es decir, involucra la activación de la fosfolipasa C (PLC), movilización de

Ca²⁺, fosforilación de proteínas y metabolismo de ácido araquidónico (Wang y col., 1992; Naor y Yavin, 1982).

3.3. Péptidos similares a GnRH producidos en el ovario

Los niveles circulantes de GnRH son muy bajos para interactuar con el receptor ovárico ya que se requieren niveles constantes y altos de hormona para desencadenar una respuesta. Para ello, se ha propuesto la presencia de péptidos que serían sintetizados en el ovario y tendrían un rol autócrino o parácrino en la función gonadal. Se han identificado estos péptidos (GnRH-like) así como también el receptor y el RNAm para GnRH en ovario (Birnbaumer y col., 1985; Goubau y col., 1992; Peng y col., 1994; Minaetzi y col., 1995; Whitelaw y col., 1995; Séguin y col., 1982; Olofsson y col., 1995). Además, varios estudios demostraron el efecto antigonal de los análogos de GnRH administrados *in vivo* e *in vitro* en rata (Clayton y col., 1979; Knecht y col., 1982; Srisvastava y col., 1994; Jones and Hsueh, 1981; Hsueh y col., 1984). Estos resultados sugieren que la GnRH sería una hormona intraovárica con funciones biológicas específicas.

También, estudios realizados anteriormente sugieren que GnRH en ovario regularía la síntesis de progesterona mediante la inhibición de la enzima P450 scc o de la enzima 3 β -HSD, o de ambas (Birnbaumer y col., 1985).

3.4. Análogos de GnRH

Los análogos de GnRH pueden clasificarse en agonistas o antagonistas, los antagonistas bloquean al receptor y no permiten una respuesta biológica a GnRH, y los agonistas, dependiendo de la forma de administración, producen o no una respuesta biológica.

Con respecto a los agonistas, éstos se sintetizan mediante la sustitución del sexto aminoácido de la GnRH por un D-aminoácido con o sin la supresión y reemplazo del décimo aminoácido por una media etilamida (NH-Et). El reemplazo de Gly10-NH₂ por NH-Et produce un análogo cinco veces más potente que la GnRH original debido

a una degradación menor por las peptidasas hipofisarias y resistente a la filtración glomerular. Los agonistas tienen una vida media prolongada que varía desde 80 a 480 minutos.

Algunos agonistas de GnRH utilizados en ensayos químicos se muestran en la siguiente tabla:

<i>Leuprorelina</i>	D-Leu	-NH ₂ Et
<i>Buserelina</i>	D-Sert (tBu)	-aza-Gly
<i>Nafarelina</i>	D-Nal(2)	
<i>Histrelina</i>	D-His(Bzl)	-NH ₂ Et
<i>Goserelina</i>	D-Sert(tBu)	-aza-Gly

La unión de los agonistas de GnRH a los receptores hipofisarios de GnRH da lugar a la microagregación de complejos agonista de GnRH-receptor y a su internalización. La alta afinidad de los agonistas por los receptores lleva a una unión más prolongada y a una mayor pérdida de receptores. Esta situación imita a la administración continua de altas dosis de GnRH, produciendo una estimulación inicial de liberación de gonadotrofinas, seguido de una supresión crónica de las mismas y de esteroides gonadales. Este efecto se conoce como la respuesta bifásica de gonadotrofinas y esteroides ováricos producidos por la administración crónica de agonistas de GnRH.

La capacidad de los agonistas de producir un hipogonadismo mantenido y reversible es utilizado en tratamientos de alteraciones dependientes de los esteroides sexuales, como en el útero miomatoso, endometriosis, inducción de la ovulación, hiperandrogenismo, síndrome premenstrual y hemorragias uterinas disfuncionales.

Meldrum y col. (1984) evaluaron el efecto del agonista de GnRH administrado en forma crónica sobre la inmunoreactividad y bioactividad de LH en mujeres con endometriosis y ovario poliquístico, y observó que la tasa de LH bioactiva/inmunoreactiva disminuía drásticamente luego de 48 hs de tratamiento. Estos resultados sugerían que las gonadotrofinas secretadas durante el tratamiento crónico con el agonista de GnRH estaban alteradas biológicamente y describe, como consecuencia, una disminución en la esteroidogénesis.

También, se describió el efecto inhibitorio de estos análogos en el desarrollo folicular inducido por FSH (Ying y col., 1979), en la esteroidogénesis en células de granulosa aisladas (Hsueh y col., 1980) y en los cambios morfológicos que ocurren en cultivos de granulosa estimuladas con FSH (Knecht y col., 1981). Por otro lado, los agonistas de GnRH estimulan directamente la síntesis de progesterona y prostaglandinas (Clark y col., 1982), la maduración del ovocito (Hillensjo y col., 1980), la ovulación (Corbin y col., 1981) y la actividad de la enzima 20α -hidroxiesteroideshidrogenasa en células de granulosa de rata (Jones y col., 1981).

Entre los análogos de GnRH más usados en la clínica, se encuentra el acetato de leuprolide (LA) que posee una sustitución de D-leucina en la posición 6 y una supresión de Glicina con una hemitilamida unida a la prolina en posición 9. Esta molécula es de 15 a 80 veces más potente que la GnRH original y tiene una vida media de 2,9 hs cuando se administra en forma subcutánea

En nuestro laboratorio, se ha demostrado la acción inhibitoria del análogo de GnRH (LA) sobre los receptores de LH y la actividad de la aromatasa en células luteales (Guerrero y col, 1993), como también, el aumento de apoptosis en folículos ováricos provenientes de ratas tratadas con el análogo (Andreu y col., 1998; Parborell y col., 2001). Otros trabajos demuestran que un agonista de GnRH (Buserelina) inhibe directamente la proliferación de las células de granulosa a través de la apoptosis (Yano y col., 1997). Sin embargo, poco se sabe acerca del mecanismo de acción de estos agonistas sobre el crecimiento y la atresia folicular.

En particular, el análogo de GnRH, LA, es utilizado en programas de reproducción asistida, asociados a gonadotrofinas, en los ciclos de hiperestimulación ovárica (Lewinthal y col., 1988; Fraser and Bouchard, 1994). En estos pacientes, inicialmente, la hiperestimulación se realizaba con hMG y/o FSH. Alrededor de un 20 % de estas mujeres producen un aumento prematuro de LH. Este pico prematuro provocaba luteinización de células de granulosa lo que llevaba a una disminución de la proliferación y a una elevada producción de progesterona, aumento en la síntesis de prostaglandinas y colagenasas foliculares, y pérdida de contacto de célula a célula entre las células de granulosa y células ováricas. Todo esto afecta a la maduración del ovocito y a la fertilidad. Por todo esto, actualmente, los agonistas de GnRH son administrados en los ciclos de hiperestimulación ovárica para inhibir el pico endógeno prematuro de LH. Además, este tipo de tratamiento favorece a la sincronización del

desarrollo folicular debido a que impide que maduren los folículos antrales tempranos de una manera asincrónica, mejorando el reclutamiento folicular de folículos preovulatorios al final del ciclo de estimulación. Varios trabajos demostraron que la administración del análogo junto a gonadotrofinas causa un mayor número de ovocitos recuperados, un aumento en el número de embriones y una frecuencia alta de embarazos (Neveu y col., 1987)

Sin embargo, cuando se administran análogos es necesario aumentar las dosis de gonadotrofinas (hMG o FSH) utilizadas para la estimulación ovárica. Esta menor sensibilidad es probablemente debido a un efecto inhibitorio directo de estos péptidos sobre el ovario. Actualmente, en algunos laboratorios de reproducción asistida, a las pacientes bajas respondedoras a FSH (“low responders”), se les reduce la dosis administrada de análogos de GnRH.

4. Muerte celular

4.1. Necrosis vs Apoptosis (Muerte celular programada)

En base a consideraciones morfológicas y bioquímicas, existen dos tipos de muerte celular: Necrosis y Apoptosis (*Figura 10*).

La necrosis es una consecuencia de una injuria o traumatismo y se caracteriza por pérdida de integridad de membrana, hinchamiento y ruptura celular que puede dañar a las células vecinas, conduciendo a una infiltración celular e inflamación. La necrosis afecta generalmente a un grupo de células contiguas y no involucra síntesis de RNAm ni de proteínas. Además, esta muerte celular pasiva no utiliza energía. En cambio, la apoptosis es un evento activo que ocurre en tejidos en crecimiento o en respuesta a estímulos fisiológicos. Este suicidio se caracteriza por pérdida de volumen celular (condensación citoplasmática) acompañada por picnosis nuclear que resulta de la marginación de la cromatina y su redistribución a lo largo de la membrana nuclear. Además, muchas organelas se mantienen intactas antes del estadio final de la muerte celular, que es observado en la formación y liberación de vesículas rodeadas por membrana plasmática (cuerpos apoptóticos). Estas vesículas contienen componentes celulares que luego son fagocitados por células vecinas (Tilly, 1996).

Uno de los rasgos característicos de la apoptosis es la activación de una endonucleasa dependiente de calcio/magnesio que cliva al DNA en forma específica en unidades nucleosomales. El resultado final es la generación de fragmentos de DNA en múltiplos de 185-200 pb, que pueden ser visualizados en una electroforesis en gel de agarosa. En cambio, en la necrosis ocurre un ruptura inespecífica de DNA.

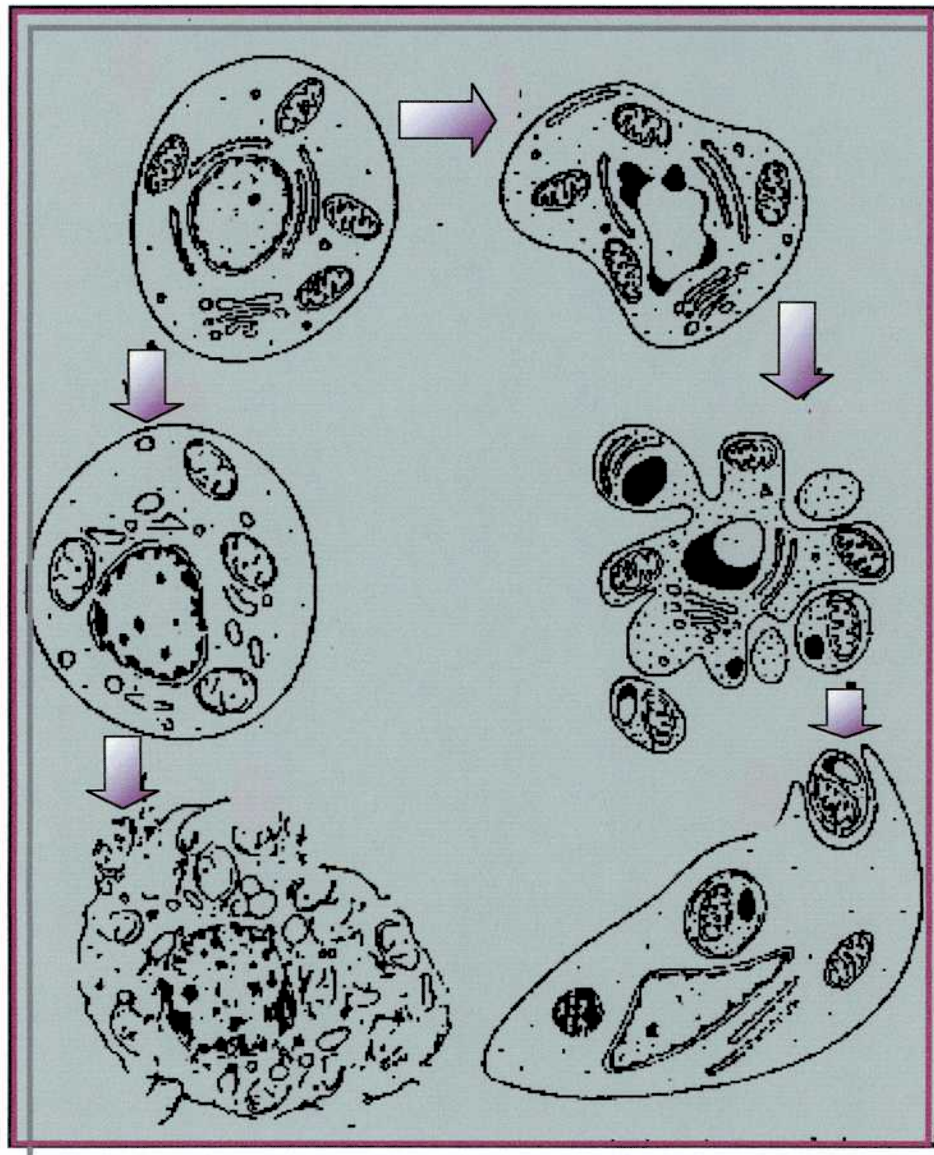


Figura 10. Diagrama que describe los cambios estructurales en la apoptosis (derecha) y en la necrosis (izquierda) (De Steller y col., 1995).

4.2. Apoptosis como mecanismo de atresia folicular

Durante el desarrollo del ovario ocurren tres procesos relacionados con la apoptosis: degeneración de la ovogonia y del ovocito, luteolisis y atresia folicular.

Estudios *in vivo* demuestran que la degeneración de la ovogonia y de ovocitos fetales de ratón está dada por apoptosis (Coucovanis y col., 1993). También, se demostró por estudios de microscopía electrónica que cultivos de células germinales primordiales de ratón en ausencia de factores tróficos (LIF: factor inhibitorio de leucemia) mostraban rasgos morfológicos característicos de la apoptosis (Pesce y col., 1994).

Orlicky y col. (1992) demostró que la degeneración del cuerpo lúteo estaba dada por apoptosis y que la prostanglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) era un factor proapoptótico. Otros trabajos demostraron que la $PGF_{2\alpha}$ inducía la generación de especies de oxígeno reactivas en células luteales de rata, provocando la apoptosis (Sawada y col., 1991).

En la mayoría de los mamíferos, los folículos ováricos degeneran por atresia y se ha observado por análisis inmunohistoquímico que la marca apoptótica está confinada a las células de granulosa (Tilly y col., 1993; Tilly y col., 1996). La fragmentación del DNA se encontró en folículos atrésicos y no en los saludables (“healthy”), demostrando el rol de la apoptosis en la atresia folicular (Tilly y col., 1991). Similares estudios mostraron la presencia de actividad de endonucleasa en ovarios de ratas tratadas con PMSG y hCG; indicando que la atresia dada por apoptosis involucra la activación de endonucleasa (Zeleznik y col., 1989).

4.2.1. Control hormonal de la atresia folicular

Los factores que disparan la apoptosis actúan en células específicas. Muchos trabajos demuestran el importante rol de los factores de crecimiento como factores de supervivencia que suprimen la apoptosis. Estos incluyen EGF (Hassell y col., 1977), factor estimulante de colonias (William y col., 1990), IGF-1 (Barres y col., 1992), $FGFb$ (Araki y col., 1990), $TGF\beta$ (Lin y col., 1992), activina (Schwall y col., 1993) y gonadotrofinas (Tapanain y col., 1993). También, las hormonas esteroideas actúan como factores supresores o estimuladores de la apoptosis dependiendo del tejido.

Como por ejemplo, los glucocorticoides aumentan la apoptosis en timo (Wyllie, 1980), los andrógenos estimulan la apoptosis en ovario pero no en testículo (Tapanain y col., 1993) y los estrógenos inhiben la apoptosis en ovario (Billig y col., 1993).

Las gonadotrofinas son consideradas como factores de supervivencia folicular. Se ha demostrado que los folículos atrésicos tempranos son rescatados por administración exógena de gonadotrofinas (Braw y col., 1980). El tratamiento con FSH en ratas hipofisectomizadas inmaduras provocó una disminución en la apoptosis folicular de células de granulosa (Billig y col., 1994). También, se observó que el tratamiento in vitro con FSH o hCG/LH previene la fragmentación de DNA apoptótico en cultivos de folículos preovulatorios (Chun y col., 1994).

El EGF/TGF α y el FGFb son factores que rescatan a los folículos de la apoptosis folicular. Tilly y col. (1992) demostraron que el EGF, TGF α y el FGF inhibían la apoptosis espontánea en cultivos de células de granulosa de rata, mientras que el IGF-1, la insulina, el TGF- β y el TNF α resultaron no tener efecto. Además, el uso de un inhibidor de tirosina kinasa (genisteína) bloqueó completamente la habilidad de EGF, TGF α y FGFb de suprimir la apoptosis en estas células. Similares resultados fueron obtenidos en cultivos de folículos preovulatorios.

El IGF-1 es producido por las células de granulosa y es estimulada su producción por FSH y GH. Los IGF-1 se encuentran en parte unidos a IGFBP en fluidos corporales, inhibiendo la acción del factor de crecimiento. IGFBP-4 y IGFBP-5 son producidos por células de granulosa de rata (Adashi y col., 1990). Estudios de análisis in situ demostraron la presencia de IGFBP en folículos atrésicos pero no en los saludables (Erickson y col., 1992). En cultivos de folículos preovulatorios de rata, se mostró que el tratamiento con IGF-1 previene la apoptosis espontánea y que con hCG aumentan los niveles de RNAm de IGF-1, siendo este efecto anulado por cotratamiento con IGFBP-3 (Chun y col., 1994).

Los estrógenos aumentan el crecimiento folicular y el índice mitótico de las células de granulosa. Mientras que los andrógenos disminuyen el peso ovárico en ratas hipofisectomizadas tratadas con estrógenos, aumentando el número de células de granulosa picnóticas (Azzolin y col., 1983). Además, la tasa de andrógenos/estrógenos es alta en el fluido folicular de folículos atrésicos (Carson y col., 1981). Por otro lado, si se considera la dependencia de los folículos antrales de los estrógenos en roedores y los altos niveles de 5 α -dihidrotestosterona observados en

el fluido folicular de folículos atrésicos en todas las especies (McNatty, 1980), es probable que cambios en los niveles de esteroides estén involucrados en la iniciación de la atresia.

Como se ha visto anteriormente, en ratas, el péptido GnRH y sus agonistas tienen efectos directos inhibitorios en la diferenciación folicular a través de sus receptores en células de granulosa y teca. Se ha observado que en ratas hipofisectomizadas tratadas con estrógenos, agonistas de GnRH inducen directamente la fragmentación de DNA apoptótica con o sin FSH (Billig y col., 1994). Además, GnRH aumenta los niveles de Ca^{2+} y de fosfatidil inositol en células de granulosa de rata (Wang y col., 1992). Estos estudios representan un buen modelo para analizar la activación de la endonucleasa dependiente de Ca^{2+}/Mg^{2+} durante la apoptosis inducida hormonalmente.

4.2.2. Mecanismos hormonales intraováricos involucrados en la atresia folicular

Como ya hemos visto los diferentes péptidos y hormonas esteroideas cumplen importantes roles en la regulación de la atresia folicular. Hsueh y col. (1994) propusieron un modelo que explica los mecanismos involucrados en la regulación de la apoptosis folicular (*Figura 11*). Estos estudios demostraron que en cultivos de células de granulosa, no existe efecto de FSH, LH/hCG e IGF-1 en la prevención de la apoptosis espontánea pero sí se observaba en cultivos de folículos. Los receptores de FSH están presentes exclusivamente en células de granulosa y cumplen un importante rol en las células vecinas, las células teca. FSH o LH pueden actuar en las células de granulosa, produciendo un factor estimulador que aumenta la secreción de EGF o $TGF\alpha$ por células teca. Luego, estos factores de crecimiento podrían difundir hacia las células de granulosa, inhibiendo la apoptosis. También, el FGFb es producido por células de granulosa (Neufeld y col., 1987) y el $TGF\alpha$ es producido por células de la teca y de granulosa (Yeh y col., 1993), indicando que estos factores cumplirían un rol autócrino en la regulación de la apoptosis.

También, el IGF-1 y la insulina no previenen la apoptosis en cultivos de células de granulosa pero son capaces de hacerlo en cultivos de folículos (Chun y col., 1994). Debido a que las células de granulosa son el principal sitio de síntesis ovárica de IGF-

1 en ratas, se podría hipotetizar que las gonadotrofinas estimulan la producción de IGF-1 en células de granulosa y que el IGF-1 secretado actúa en células tecales, estimulando la producción de EGF/TGF- α . El TGF α /EGF de células tecales y otros factores difundirían a las células de granulosa para inhibir la apoptosis.

Existen mecanismos de segundos mensajeros que se encuentran involucrados en la regulación hormonal de la actividad de endonucleasa. Los estrógenos y andrógenos interactúan con los receptores intracelulares, actuando como factores transcripcionales y regulando la expresión génica. Las gonadotrofinas actuarían vía proteína kinasa A (PKA) y GnRH actuaría vía proteína kinasa C (PKC). Por otro lado, los efectos de EGF/TGF α y FGFb en la supresión de apoptosis estarían mediados por vía tirosina kinasa (TK).

En conclusión, las hormonas actúan a través de diferentes segundos mensajeros para regular la apoptosis en células de granulosa, siendo la identificación de los genes esencial para comprender los mecanismos moleculares que llevan a la atresia folicular.

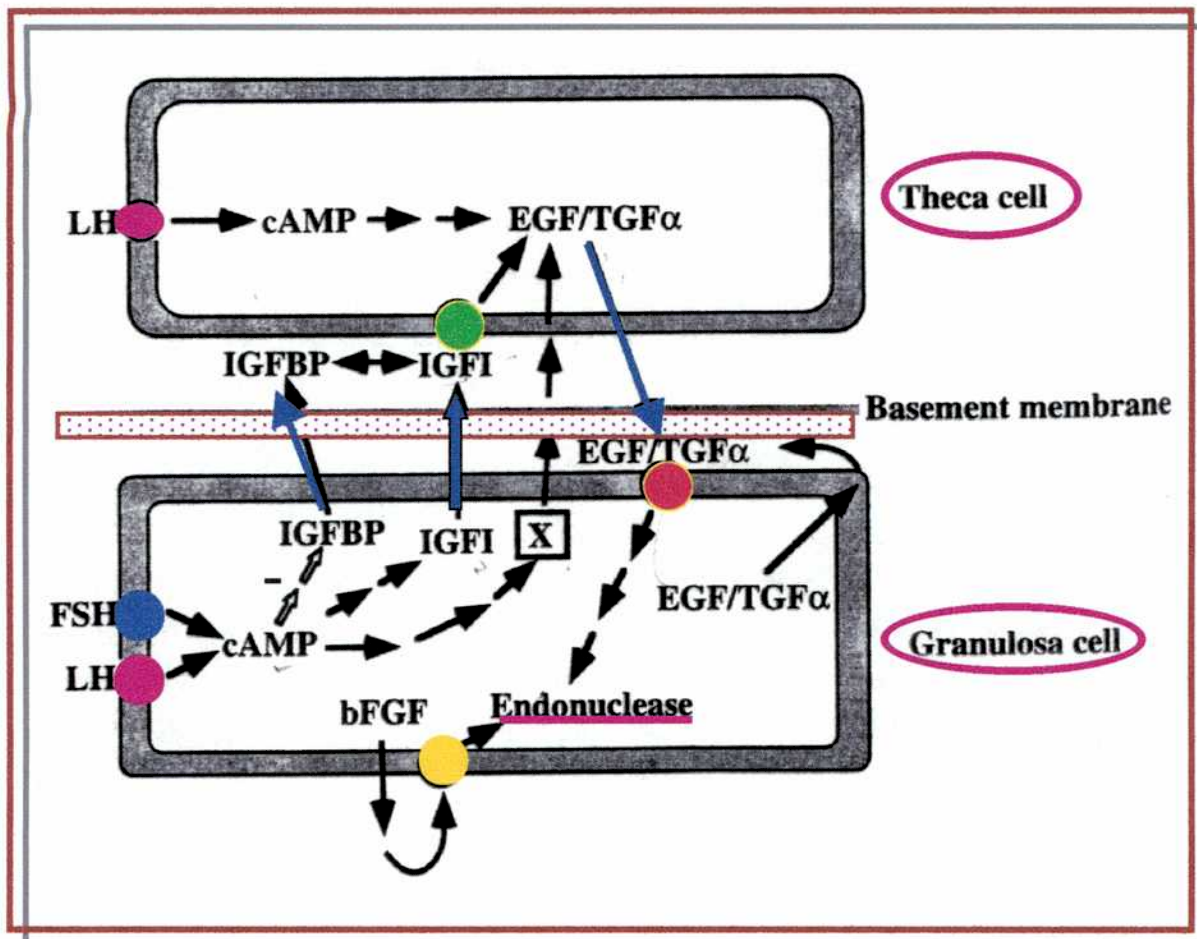


Figura 11. Mecanismos intraováricos hormonales involucrados en la atresia folicular (De Tsafiri y col., 1994).

4.2.3. Mecanismos moleculares de la atresia

4.2.3.1. Miembros de la familia de Bcl-2

El gen *bcl-2* (B-cell leukemia/lymphoma 2) se aisló por primera vez como un protooncogen cuya translocación cromosomal se asociaba al linfoma de células B (Tsujimoto y col., 1986). Esto conduce a la sobreexpresión de Bcl-2 en células linfocíticas, ocasionando una tumorigénesis.

La proteína Bcl-2 se localiza en la mitocondria, en la membrana perinuclear y en el retículo endoplásmático liso. Cuando se sobreexpresa, la proteína Bcl-2 suprime la apoptosis inducida por una variedad de agentes, tanto *in vitro* como *in vivo* (McDonnell y col., 1990; Núñez y col., 1991; Baffy y col., 1993).

Las proteínas de la superfamilia de Bcl-2 se pueden dividir en tres grupos: 1) proteínas de Bcl-2 antiapoptóticas formadoras de canales con dominios BH (BH1 a 4) y con una secuencia de anclaje a membrana (Bcl-2, Bclx-L; Mcl-1), 2) proteínas de Bcl-2 proapoptóticas formadoras de canales con los dominios BH menos el dominio BH4, esencial para la inhibición de la apoptosis (Bax, Bak, Bok) y 3) ligandos proapoptóticos que poseen solamente el dominio BH 3 (Bik, Hrk, Bad, Bod) (Figura 12). Los dos primeros grupos de proteínas se cree que se anclan a la membrana de la mitocondria, mientras que el tercer grupo de proteínas actúa como ligando que dimeriza con los “receptores” de Bcl-2 formadores de canales. El dominio de BH3 es esencial para la unión de los ligandos a las proteínas formadoras de canales. En la *Figura 13*, se pueden observar los distintos dominios funcionales presentes en las proteínas de Bcl-2.

Las proteínas de Bcl-2 ancladas en la membrana mitocondrial forman probablemente canales iónicos capaces de mantener la homeostasis y evitar la liberación de citocromo C, favoreciendo la sobrevivencia de la célula.

Las proteínas proapoptóticas de Bcl-2 forman heterodímeros con las proteínas antiapoptóticas de Bcl-2, alterando la homeostasis mitocondrial y consecuentemente, promoviendo la apoptosis (Pan y col., 1998; Srinivasula y col., 1998).

Proteínas antiapoptóticas formadoras de canales



Proteínas proapoptóticas formadoras de canales



Ligandos proapoptóticos



Figura 12. Estructura de los miembros de la familia de Bcl-2. BH: Bcl-2 homology domain; TM: transmembrane region (De Hsu y col., 2000).

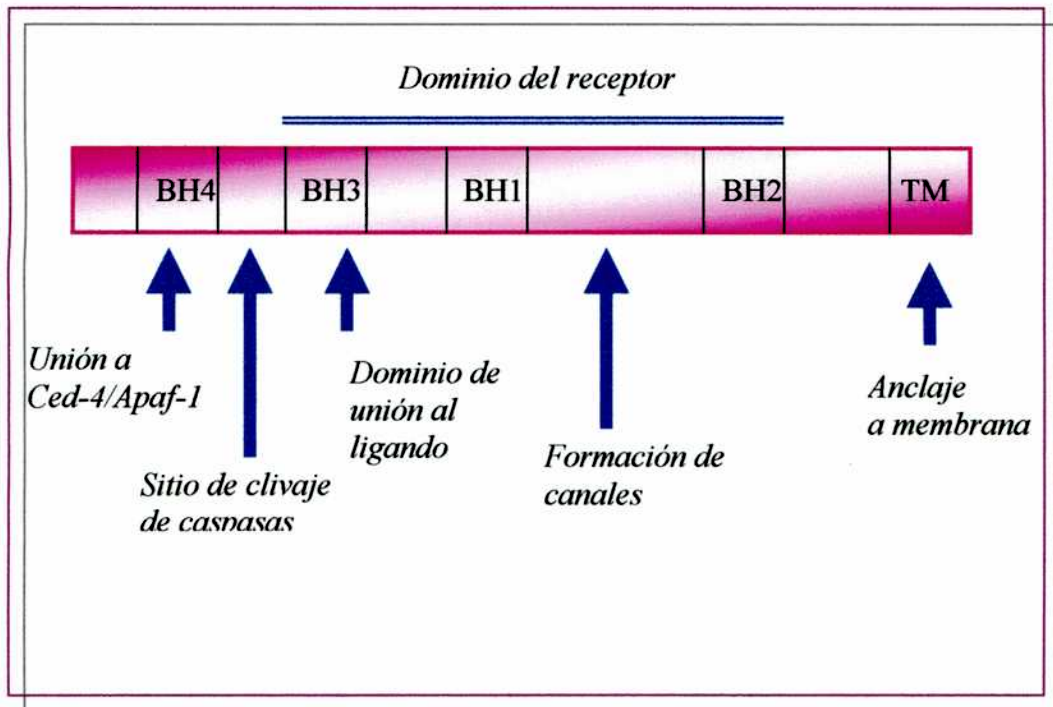


Figura 13. Dominios funcionales diferentes de las proteínas de Bcl-2. (De Hsu y col., 2000)

Los miembros de la familia de Bcl-2 son proteínas multifuncionales y las interacciones proteína-proteína cumplen un importante rol en la regulación de la apoptosis. Uno de los mecanismos por los cuales las proteínas de Bcl-2 regulan la apoptosis es a través de la homodimerización y heterodimerización con proteínas de la misma familia (*Figura 14*).

La relación existente entre las proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bclx-L) respecto a las proteínas proapoptóticas (Bax, Bclx-S) funciona como un “reostato” que determina la susceptibilidad de la célula a la apoptosis (Oltvai y col., 1993; Yin y col., 1994).

Como se vio anteriormente, la proteína Bax (21 kD) fue originalmente identificada por su capacidad para unirse no covalentemente con Bcl-2. Sin embargo, Bax probablemente actúa en forma independiente para inducir la apoptosis por un mecanismo desconocido aún.

Bcl-x es otro miembro de la familia de Bcl-2 y sufre splicing alternativo, dando una isoforma corta, Bclx-S (proapoptótica), y una isoforma larga, Bclx-L (antiapoptótica). En el ovario, la presencia y los cambios en la expresión de Bcl-2, Bax y Bcl-x ha sido documentada en varias especies (Tilly y col., 1995b, Jhonson y col., 1996; Rueda y col., 1997). En el ovario del roedor, el modelo más estudiado para la investigación de la muerte celular ovárica, Bax tiene un importante rol en la regulación de la muerte de células de granulosa y en células germinales. Tilly y col. (1995b) evaluaron el efecto *in vivo* de gonadotrofinas en la expresión ovárica de Bcl-2, Bax y Bcl-x y encontraron una fuerte correlación positiva entre la expresión de Bax respecto a Bcl-2 y Bcl-x, y la inducción de la apoptosis en cultivos de células de granulosa de folículos atrésicos. Además, estos resultados son reforzados por otros análisis realizados en ratones deficientes de Bax (Knudson y col., 1995) donde se observó que folículos provenientes de estas ratas mostraban resistencia a la inducción de la muerte celular durante la atresia. Estos resultados llevaron a proponer un modelo que explica el rol de la proteína Bax en la selección del folículo dominante en presencia de gonadotrofinas (Tilly y col., 1995). Las células de granulosa de diferentes folículos tendrían niveles distintos de la proteína Bax y los folículos que tienen células con bajos niveles de esta proteína serían seleccionados como folículos dominantes.

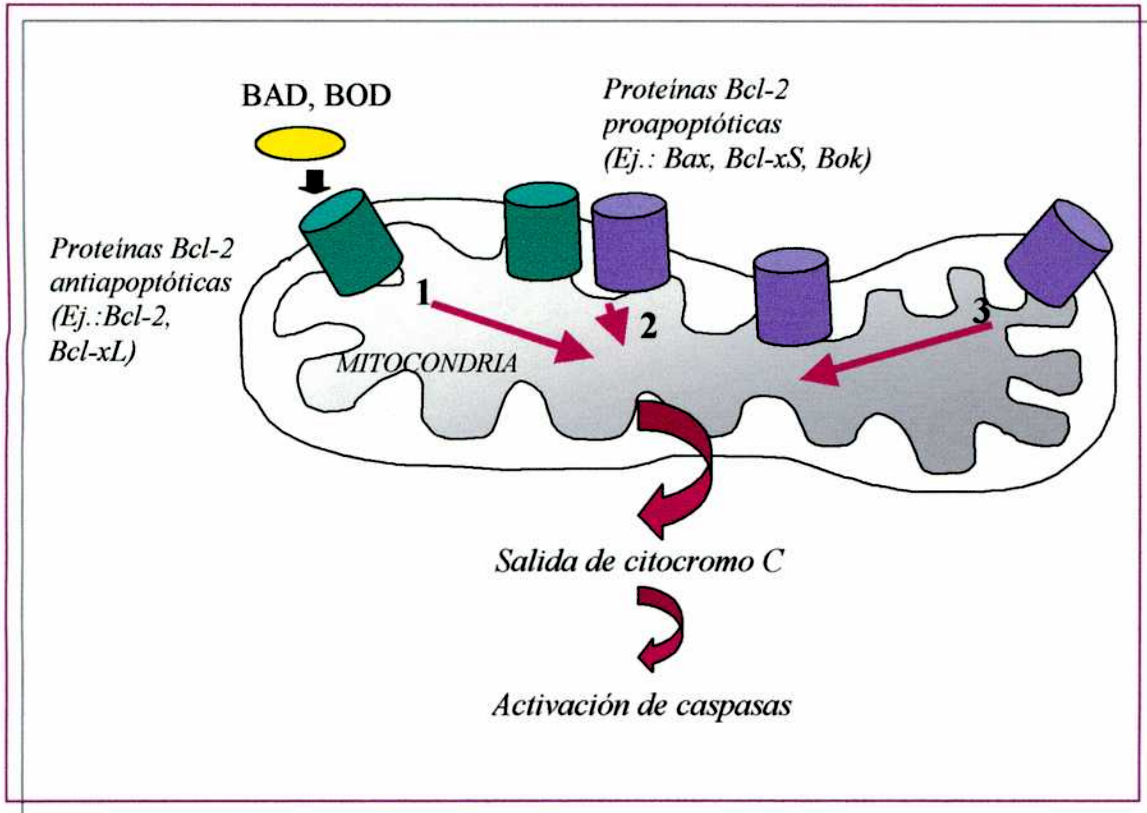


Figura 14. Modelo de regulación de apoptosis por proteínas de la familia de Bcl-2. (De Hsu y col., 2000).

4.2.3.2. Caspasas como ejecutoras de la apoptosis

Las caspasas son proteasas intracelulares que actúan como reguladores de la muerte celular. Estas proteasas presentan una alta homología al gen de muerte de *Caenorhabditis elegans*, *ced-3* y contribuyen a la iniciación o progresión de la apoptosis en las células de granulosa durante la atresia (Hengartner y Horvitz, 1994). Las proteínas de muerte codificadas por miembros de esta familia de genes en vertebrados incluyen a la enzima convertidora de interleukina-1 β (ICE), al homólogo-I-*ced-3* y ICE (ICH-1), a la proteasa cisteína P32 (CPP32), ICE_{rel} II (TX, ICH-2), ICE_{rel} III y MCH-2 (Martin y Green, 1995). Estas proteasas comparten una secuencia conservada QACRG que actúa como un dominio que cliva proteínas en residuos aspartato. Los miembros de esta familia degradan a un diverso espectro de proteínas específicas estructurales y homeostáticas como la polimerasa ADP-ribosa (enzima que repara ADN), ribonucleoproteínas nucleares (factores responsables del ensamblaje del spliceosoma y procesamiento del ARN) y proteínas estructurales responsables del plegamiento nuclear (Martin y Green, 1995). En ovario de rata, la expresión y la regulación por gonadotrofinas de ICE, CPP32 y ICH-1 ha sido demostrada por varios trabajos (Flaws y col., 1995). ICE *per se* no intervendría en la apoptosis de células de granulosa ya que se observaron bajos niveles de RNAm de ICE en ovario y ausencia de actividad de ICE en folículos cultivados *in vitro* para inducir la apoptosis. Además, se mostró que la expresión del gen ICE en el ovario no estaba regulada por gonadotrofinas (Flaws y col., 1995). Por otro lado, la expresión de CPP32 e ICH-1 en ovario es inhibida por gonadotrofinas, y junto con datos previos, se sugeriría que la activación de endonucleasas está dada por estas proteasas en células de granulosa.

4.2.3.3. Sistema Fas/Fas ligando y proteína p53

El antígeno Fas (Fas) pertenece a la familia de glicoproteínas integrales de membrana que incluyen al receptor del factor de crecimiento nervioso y al receptor del factor de necrosis tumoral. Su ligando (FasL) es una proteína integral de membrana de tipo II

homóloga al factor de necrosis tumoral cuya función es ser un potente factor de muerte celular (Suda y col., 1993). Los transcritos de Fas y FasL son detectables en una variedad de tejidos como timo, hígado, corazón, pulmón, riñón y testículo (Watanabe-Fukunaga y col., 1992; Suda y col., 1993). En cambio, solamente se ha demostrado la presencia de la proteína Fas y su mensajero en células de granulosa (Hakuno y col., 1996; Quirk y col., 1995).

Otro componente importante en el mecanismo de señales de muerte en células, particularmente en células tumorales expuestas a radioterapia o quimioterapia, es la proteína p53. Este factor transcripcional se comporta como una proteína bifuncional en cuanto a la regulación de la proliferación y muerte celular (Tilly y col., 1998). El p53 puede interactuar con otros factores regulatorios de muerte celular a nivel transcripcional. Por ejemplo, existe un elemento de respuesta a p53 en el promotor del gen de Bax, produciendo altos niveles de expresión de Bax cuando este elemento de respuesta está activado (Miyashita y Reed, 1995). Además, el promotor del gen de Bcl-2 posee un elemento represor que interactúa con p53, suprimiendo la expresión génica (Miyashita y col., 1994). En el ovario, se ha identificado la presencia nuclear de p53 en células de granulosa de folículos ováricos destinados a la atresia. Estos resultados son consistentes con el rol de p53 en promover la apoptosis mediante la expresión inducida de Bax en este tipo de células (Tilly y col., 1995a). Además, Kim y col. (1999) demostraron la participación del sistema Fas/FasL en la apoptosis de células de granulosa mediada por p53 durante el desarrollo y la atresia folicular.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de la administración de un análogo de GnRH (Acetato de Leuprolide) sobre la apoptosis y la esteroidogénesis ovárica en ratas inmaduras tratadas con dietilestilbestrol (DES) o superovuladas con gonadotrofinas (PMSG: gonadotrofina de suero de yegua preñada).

HIPÓTESIS

La hipótesis a ser testeada en este trabajo es que las altas dosis de gonadotrofinas requeridas cuando se utilizan análogos de GnRH en ciclos de hiperestimulación ovárica, se correlacionan con el efecto inhibitorio de estos análogos sobre el proceso de crecimiento y diferenciación del folículo ovárico; y que éste efecto inhibitorio estaría mediado por cambios en la apoptosis y esteroidogénesis ovárica.

Para probar esta hipótesis se diseñaron dos modelos experimentales. Por un lado, se administró DES a ratas prepúberes para obtener una población de folículos antrales tempranos y ensayar el efecto *in vitro* del análogo de GnRH, Acetato de Leuprolide. Por otro lado, se utilizó un modelo de ratas inmaduras superovuladas con gonadotrofinas (PMSG) con el objetivo de estimular la foliculogénesis hasta el estadio de folículos preovulatorios; parte de estos animales fueron también tratados *in vivo* con el análogo de GnRH, el agonista Acetato de Leuprolide (LA), tanto en forma crónica como aguda. Además, en folículos preovulatorios se estudió el efecto *in vitro* del Acetato de Leuprolide.

Los **objetivos específicos** que se plantearon fueron los siguientes:

1. Estudiar el efecto *in vitro* y/o *in vivo* del análogo de GnRH en folículos ováricos en distintos estadios de desarrollo sobre :
 - a) la producción de hormonas esteroideas.
 - b) la apoptosis medida por fragmentación del ADN en geles de agarosa.
 - c) el contenido de proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas pertenecientes a la familia de bcl-2 (Bcl-2, Bax, Bcl-xcorto y Bcl-xlargo).

d) el contenido de proteínas esteroideas (citocromo P450_{scc} y proteína reguladora de la esteroidogénesis, StAR).

2. Estudiar la morfología del ovario, mediante la realización de cortes histológicos y coloración con hematoxilina-eosina, para establecer si la administración del agonista de GnRH *in vivo* altera el desarrollo folicular, cuantificando el número de folículos preantrales, antrales y atrésicos.

3. Evaluar por inmunohistoquímica (TUNEL) la presencia de células apoptóticas en cortes de ovarios provenientes de ratas tratadas con el antagonista de GnRH, LA.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos

La gonadotropina coriónica equina (eCG) (Norvomom) fue obtenida de Syntex S.A (Buenos Aires). El análogo de GnRH, Acetato de Leuprolide, fue una donación de Laboratorios Abbott (Buenos Aires, Argentina). La acetona fue adquirida en Merck y el etanol absoluto y éter dietílico, en Anedra (Buenos Aires, Argentina). Las hormonas esteroideas: [1,2-³H (N)]-progesterona (40 Ci/mmol), [2,4,6,7-³H (N)]-estradiol (74 Ci/mmol); carbón activado, acrilamida, bis-acrilamida, dodecil sulfato sódico (SDS), peroxidasa conjugada a extravidina, IgG anti conejo conjugado a biotina y diaminobenzidina (DAB), Tris, glicina, persulfato de amonio, N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina (TEMED), PMSF (fenilmetilsulfonil fluoruro), TPCK (N-tosil-L-fenilalanina-clorometil cetona), ZPCK (N-CBZ-L-fenilalanina clorometil cetona), TLCK (1-cloro-3-tosilamido-7-amino-L-2-heptanona) y el EGF fueron obtenidos en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A). También fueron adquiridos en este último, los esteroides no tritizados correspondientes. El tolueno fue de Sintorgan (Buenos Aires, Argentina). Los factores de crecimiento FGF e IGF-1 se adquirieron de Collaborative Research (Bedford, MA). Ovine FSH (FSH S17) fue donada gentilmente por The National Pituitary Agency, NIH (Bethesda, MD, USA). Los anticuerpos utilizados en los radioinmunoensayos, anti-estradiol y anti.progesterona fueron adquiridos en el laboratorio del Dr. D. G. Niswender (Colorado State University, U.S.A). El marcador de peso molecular preteñido fue adquirido en Amersham Life Science. Los anticuerpos policlonales hechos en conejo anti-bax (N-20) y anti bcl-x (S-18) fueron adquiridos en Santa Cruz Biotechnology. En este mismo lugar, fue obtenido el anticuerpo policlonal hecho en cabra anti bcl-2 (N-19). El anticuerpo hecho en conejo anti-P450scc, fue donado gentilmente por la Dra. Anita Payne (University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA) y el anticuerpo anti-StAR fue también donado generosamente por el Dr. Douglas Stocco (Texas Tech University Health Sciences Center). Dulbecco's Modified Eagle Medium con 4,5 g glucosa/litro (DMEM) and Ham's F-12 nutrient mixture (F-12), fungizona (250 µg/ml) y gentamicina (10 mg/ml) fueron obtenidos en Gibco Laboratories (Grand Island, NY, USA).

2. Animales

En todos los experimentos que conforman esta tesis se emplearon ratas vírgenes de la cepa Sprague Dawley (23-25 días), del Instituto de Biología y Medicina Experimental. Los animales se encontraban en el bioterio en condiciones controladas de temperatura (22°C) y con un fotoperíodo de 12 hs (las luces se encienden a las 7.00 hs y se apagan a las 19.00hs), recibiendo alimento balanceado y agua *ad libitum*.

3. Tratamientos

3.1. Obtención de ratas superovuladas.

Los animales fueron superovulados con gonadotrofinas: PMSG (que posee actividad de FSH): una única inyección de 25 UI/rata, siendo los animales sacrificados luego de 48 hs. Este tratamiento produce hiperestimulación ovárica, desarrollo múltiple de folículos y superovulación.

3.2. Obtención de ratas tratadas con DES

Los animales fueron tratados con dietilestilbestrol (DES: 1mg/rata disuelto en aceite) en forma diaria durante tres días para estimular el desarrollo de folículos antrales tempranos. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y los ovarios se extrajeron para la disección folicular.

3.3. Administración de GnRH en forma crónica

Los animales superovulados con gonadotrofinas fueron divididos en dos grupos:

Control (C): tratado con Solución Fisiológica.

LA: tratado con Acetato de Leuprolide 0,5µg/0.1 ml/rata cada 12 hs. durante 48 hs. Iniciándose el tratamiento con la inyección de PMSG y las ratas se sacrificaron 3 hs después de la última inyección de LA. Los animales se sacrificaron luego de 48 hs de la administración de PMSG por dislocación cervical. Los ovarios se extrajeron y se limpiaron de tejido adherente en medio de cultivo para la disección folicular.

3.4. Administración de GnRH en forma aguda

Los animales superovulados con gonadotrofinas fueron divididos en dos grupos:

Control (C): tratado con Solución Fisiológica

LA: una única inyección de Acetato de Leuprolide 2µg/0.1 ml/rata simultanea a la administración de PMSG.

Las ratas se sacrificaron a las 0, 2, 4 y 8 hs después de la administración subcutánea de LA.

4. Aislamiento y cultivo de folículos ováricos de rata

4.1. Folículos antrales tempranos

Los ovarios de ratas tratadas con DES durante 3 días se desgrasaron y se extrajeron los folículos antrales tempranos (~350 µm de diámetro) bajo la lupa utilizando agujas finas. Los folículos de 6 animales se recogieron para diferentes tratamientos y el cultivo se inició dentro de 1h de la extracción ovárica. Se incubaron 8 folículos por eppendorf en medio libre de suero a 37°C en 500 µl DMEM:F12 (1:1 vol/vol), conteniendo 10 mM HEPES, suplementado con estreptomycin y gentamicina en presencia o ausencia de FSH (200ng/ml), dAMPc (1mM) y factores de crecimiento (EGF: 200ng/ml, FGFb: 1000ng/ml, IGF-1: 1000ng/ml). El cultivo se realizó en estufa bajo condiciones gaseadas 95%O₂-5% CO₂ durante 24 hs. Los folículos se guardaron a -70°C hasta la extracción de ADN.

4.2. Folículos preovulatorios

Los ovarios de ratas Controles (n=6) y tratadas con LA (n=6) durante 48 hs se desgrasaron y se extrajeron los folículos preovulatorios (>400 µm de diámetro) bajo la lupa utilizando agujas finas. Los folículos se recolectaron para análisis de la fragmentación del DNA, inmunoblots para miembros de la familia de Bcl-2 y para cultivo folicular. El cultivo se inició dentro de la hora de la extracción ovárica. Se incubaron 4 folículos por eppendorf en medio libre de suero a 37°C en 500 µl DMEM:F12 (1:1 vol/vol), conteniendo 10 mM HEPES, suplementado con estreptomycin y gentamicina en presencia o ausencia de: EGF: 200ng/ml, FGFb:

1000ng/ml, IGF-1: 1000ng/ml. El cultivo se realizó en estufa bajo condiciones gaseadas 95%O₂-5% CO₂ durante 24 hs. Los folículos se guardaron a -70°C hasta la extracción de ADN y proteínas.

5. Determinación de apoptosis en folículos ováricos por electroforesis en geles de agarosa

Se incubaron 4 folículos preovulatorios u 8 folículos antrales tempranos saludables por Eppendorf, se agregó 200 µl de buffer de digestión (NaCl 100 mM, Tris -HCl 50 mM, EDTA 4 mM, SDS 0,5%, pH 8) junto con proteinasa K (100 µg/ml) y se incubó a 55°C durante 4 -5 hs para facilitar la ruptura de membrana y de proteínas. Luego se precipitaron las proteínas con acetato de potasio 1 M y 50 % de cloroformo durante 30 minutos en hielo y se centrifugó a 9.000 x g durante 8 minutos a 4°C. La fase acuosa se precipitó con 2,5 vol de etanol durante 30 minutos a -70°C y se centrifugó a 5.000 x g durante 20 minutos a 4°C. Las muestras se extrajeron en etanol 70%, se resuspendieron en agua estéril y se midió la absorbancia a 260nm. Finalmente, las muestras se incubaron con RNAasa (10µg/ml) a 37°C.

6. Electroforesis en geles de agarosa y cuantificación de la fragmentación de ADN

Las muestras de ADN (4 µg) se separaron electroforeticamente en geles de agarosa 1,7% conteniendo bromuro de etidio (0,4 µg/ml) en buffer TBE. Para mejorar la sensibilidad, los geles se tiñeron con bromuro de etidio por 15 minutos. El ADN se visualizó en un transiluminador de UV (302 nm) y se fotografió con un sistema de cámara Polaroid. El análisis de ADN de bajo peso molecular (<15kb) se realizó con un scanner de imagen (Genius), utilizando un programa de software de cuantificación de imágenes (Image Quant, Molecular Dynamics). Los resultados obtenidos por análisis densitométrico de los fragmentos de ADN de bajo peso molecular representan el promedio ± SEM de 4 corridas de geles independientes.

7. Medición de los niveles de proteínas esteroideogénicas (citocromo P450sc y StAR) y miembros de la familia de bcl-2 por western blot

Se obtuvieron 100 folículos preovulatorios por microdissección de ratas controles (n=6) y tratadas con LA (n=6) y se incubaron 0, 1, 2 y 5 hs. Luego, 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 (Bio-Rad). Luego de hervir 5 minutos las muestras, se sembraron 100 µg de proteína en un gel de poliacrilamida 15% con SDS (SDS-PAGE). Se sembró igual cantidad de proteína en cada calle. Las proteínas separadas por electroforesis fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa en buffer Tris-base 0,025 M (pH 8,3), glicina 0,192 M, metanol 20%, a 35 V (200 mA) durante 2 hs a 4°C. Los sitios de unión remanentes sobre las membranas se bloquearon en TBS con 20 mg/ml de leche en polvo descremada, Tween 20 (0,2 %) durante 1h a temperatura ambiente. Luego se incubaron con el anticuerpo policlonal de conejo correspondiente (StAR, 1:2.000; P450 scc, 1:2.500; Bcl-2, Bax, y Bcl-x, 1:200) en buffer de bloqueo durante toda la noche. Luego de lavar con el mismo buffer, se incubó con el 2^{do} anticuerpo: anti-IgG de conejo acoplado a biotina diluido 1:500 en TBS con Tween 20 (0,01%) por 1h a temperatura ambiente. Se lavó con TBS con Tween 20 (0,1%) y se realizó una tercera incubación con extravidina unida a peroxidasa en TBS con BSA 1mg/ml durante 1h. Se reveló con 3,3'-diaminobencidina 0,4 mg/ml y H₂O₂ 0,0001% en buffer de revelado. El control negativo se realizó en ausencia del primer anticuerpo. El contenido de las proteínas en las distintas calles se cuantificó luego por densitometría. Los datos de densidad óptica se expresan como unidades arbitrarias ± SEM (n=3). Las cantidades iguales de proteína sembrada se evaluaron por tinción de la membrana con Rojo Ponceau.

8. Morfología ovárica

Los ovarios de animales superovulados con PMSG fueron extraídos e inmediatamente fijados en formalina 4% durante 12 hs. El fijador fue removido mediante numerosos

lavados con poco volumen de etanol 70%, seguido por una deshidratación en alcoholes de gradación creciente hasta etanol 100%, y aclarado con xilol. Los ovarios fijados fueron incluidos en Histowax Reichert-Jung (mezcla de parafina y polímeros con mejor capacidad de penetración; punto de fusión 67°C). El paso siguiente fue el montaje sobre tacos de madera; se tallaron los tacos y se procedió a cortarlos con un micrótopo rotativo Reichert-Jung (espesor de 5µm), adhiriéndoselos a portaobjetos sin recubrir si los cortes fueron preparados para tinción con hematoxilina-eosina, o cubiertos con polisina, si los cortes se utilizaban para inmunocitoquímica. Los cortes se realizaron con un espesor de 3 µm a intervalos de 50 µm para evitar el conteo del mismo folículo.

9. Coloración con hematoxilina-eosina

Los cortes fueron desparafinados e hidratados, y se procedió a sumergirlos en un coplin con hematoxilina de Mayer (laboratorios Biopur) durante 10 minutos. Se efectuó el viraje en agua común de 2 a 5 minutos, hasta que se observó color violeta. Se colocó el corte en un coplin con eosina alcohólica durante 2 minutos. Este procedimiento y el mencionado anteriormente en el punto 8 lo realizó el laboratorio histológico de la Dra Sara Orrea.

10. Clasificación y recuento de folículos ováricos

En secciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina se contó el número de folículos por ovario. Los folículos se clasificaron en preantrales o antrales según la presencia o ausencia de una cavidad antral. La atresia se definió como la presencia de más de 10 células picnóticas de granulosa. En folículos pequeños, el criterio para la atresia fue un ovocito degenerado y/o la formación de un antro precoz. El número de folículos preantrales, antrales y atrésicos se determinó en secciones ováricas obtenidas de ratas (n=8) controles o tratadas con LA durante 48 hs. Para estudiar la morfología ovárica o el número de células apoptóticas por TUNEL, se analizaron campos seleccionados al azar de cada sección ovárica (6 secciones/ovario, 6-8 ovarios).

11. TUNEL

Para la cuantificación inmunohistoquímica de la apoptosis, secciones de ovario fijadas con formalina se procesaron para la localización *in situ* de núcleos que exhiben fragmentación de ADN mediante la técnica de TUNEL (marcado del extremo terminal con dUTP-digoxigenina mediante la enzima deoxinucleotidil transferasa (TdT)) (Herde y col., 1994), utilizando un kit de detección de apoptosis (Oncor, Gaithersburg, MD) (1). Los cortes de ovario de 3 μm de espesor se desparafinaron y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente con proteinasa K (GIBCO, Grand Island, NY) (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La peroxidasa endógena se inactivó con peróxido de hidrógeno 2% en PBS. Luego los preparados se incubaron con la enzima TdT por 1 hora a 37°C y la reacción de marcación se llevó a cabo incubándolos en un buffer que contenía digoxigenina-dUTP durante 30 minutos. Los tejidos se incubaron con el anticuerpo monoclonal antidigoxigenina conjugado a peroxidasa durante 30 minutos y se visualizaron las células apoptóticas como positivas luego de la reacción con diaminobencidina. Los controles negativos no incluyeron la enzima TdT. Las secciones fueron contrastadas con hematoxilina. El número de células apoptóticas se determinó por conteo de células marcadas en folículos preantrales y antrales en campos seleccionados al azar con aumento de 400x. El índice apoptótico se calculó como el porcentaje de células apoptóticas respecto al número total de células.

12. 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°C . Se extrajo el sobrenadante (extracto etéreo) y se evaporó a sequedad. Sobre el suero congelado se realizó la segunda extracción con éter. Las muestras se resuspendieron en 200 μl de buffer RIA.

13. Extracción de esteroides de tejido (ovario y folículo)

Previamente a realizarse la extracción, se determinó el peso de los ovarios. Los pools foliculares y los ovarios de ambos grupos, 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 °C 10 min, en agitación. Sobre estos resuspendidos se realizaron dos extracciones con éter dietílico (1:2,5 vol/vol) para lo cual se homogeneizaron durante 2 min. Las fracciones etéreas se separaron por congelación durante 20 min. a -70°C, y la fase líquida 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°C hasta realizarse las correspondientes mediciones.

14. Medición de esteroides

Las hormonas producidas por las células foliculares (progesterona y estradiol) se midieron en suero, en folículo y en tejido ovárico por radioinmunoensayo (RIA). Se utilizaron antisueros provistos por el Laboratorio del Dr. Niswender. los antisueros se usaron en una dilución apropiada para ligar el 40% del ³H-esteroide utilizado como trazador (25 pg, aproximadamente 10.000 cpm). Luego de la incubación de 16 hs a 4°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: Na₂HPO₄ 40mM, NaH₂PO₄ 39,5 mM, 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 2,75 ml de mezcla centellante (PPO 0,5% y POPOP 0,05% en tolueno). La radiactividad se determinó en un contador de centelleo líquido Beckman LS 1801, con una eficiencia del 62%.

14.1. Determinación de progesterona

El rango de utilidad de ensayo fue de 12,5 a 800 pg de progesterona en un volumen final de 0,5 ml. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron 8,0 y 14,2%, respectivamente.

14.2. Determinación de estradiol

El rango de utilidad de ensayo fue de 1,562 a 800 pg de estradiol en un volumen final de 0,5 ml. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron 7,2 y 12,5%, respectivamente.

15. Análisis estadístico de los datos

Los resultados se presentan como el promedio \pm SEM. Los geles mostrados fueron obtenidos de experimentos representativos. Las incubaciones se realizaron por triplicado. Todos los experimentos se realizaron como mínimo tres veces con 6 animales por grupo experimental. Las comparaciones estadísticas entre los grupos fueron hechas utilizando el Análisis de Varianza (ANOVA), seguido por los test de Scheffé o test de Tuckey. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa Statistica v5.0. Valores de probabilidad menores que 0,05 fueron considerados significativos.

RESULTADOS

1. Efecto in vivo de LA sobre el crecimiento folicular y la apoptosis ovárica

1.1. Morfología ovárica en cortes histológicos

Se realizó un recuento de folículos en distintos estadios de maduración en cortes teñidos con hematoxilina y eosina en el grupo Control (C) y en el grupo tratado con LA.

En el análisis histológico se observó un efecto inhibitorio de LA sobre el desarrollo folicular inducido por PMSG (Figura 1). Después de 48 hs. de tratamiento con LA, aumentó el número de folículos preantrales (FP) y atrésicos (FAT) comparado al Control (FP=C: $2,06 \pm 0,13$, LA: $7,37 \pm 0,43$; FAT=C: $2,95 \pm 0,17$; LA: $5,49 \pm 0,23$; $p < 0,05$). En cambio, el número de folículos antrales (FA) disminuyó (FA=C: $48,26 \pm 1,03$, LA $37,39 \pm 1,06$, $p < 0,05$) (Figura 2). Estos resultados sugieren que LA estaría interfiriendo en el reclutamiento follicular, causando una disminución del número de folículos reclutados por las gonadotrofinas o bien llevando a la atresia a un mayor número de los mismos.

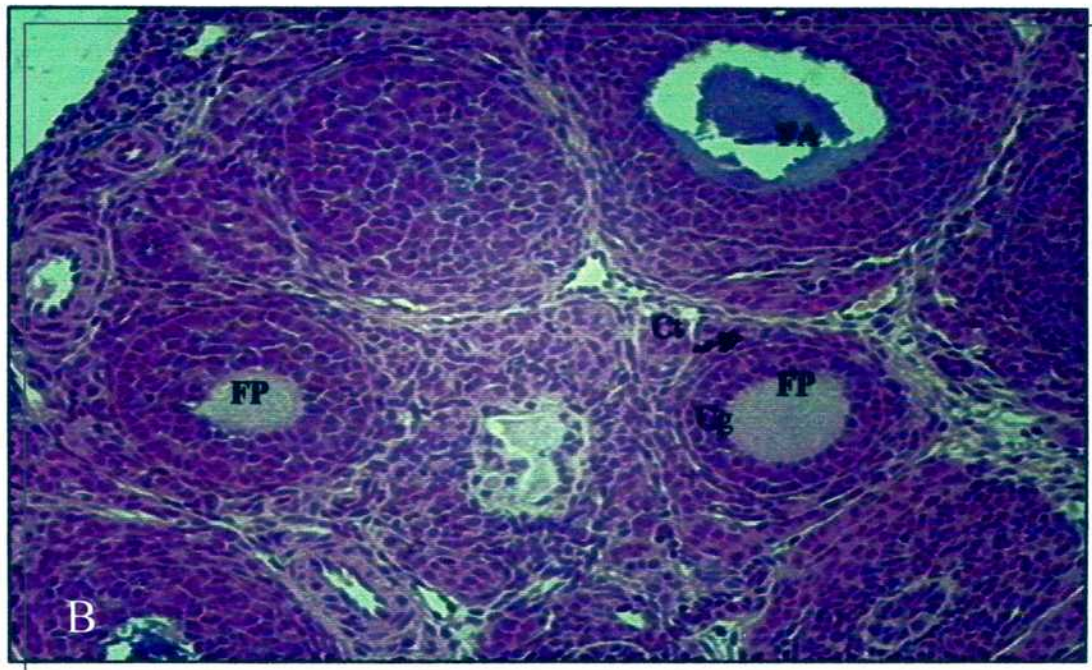
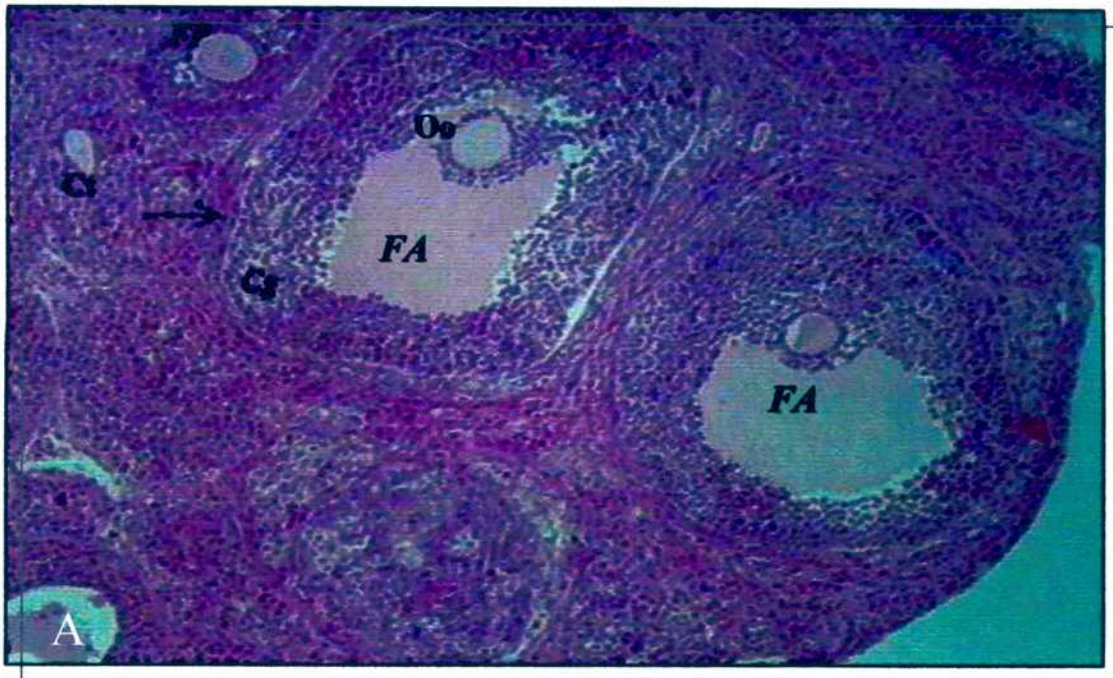


Figura 1. Microfotografías de secciones ováricas de ratas estimuladas con gonadotrofinas tratadas con vehículo (C) y tratadas con Acetato de Leuprolide (LA) (0,5 µg/rat) cada 12 hs durante 2 días. Panel A: Control; Panel B: LA. Notar la presencia de numerosos folículos preantrales en el panel B (grupo LA) comparado con el panel A (Grupo Control). (Ct: células de la teca; Cg: células de granulosa; Oo: ovocito; FA: folículo antral; FP: folículo preovulatorio). Panel A y B: Aumento 100X.

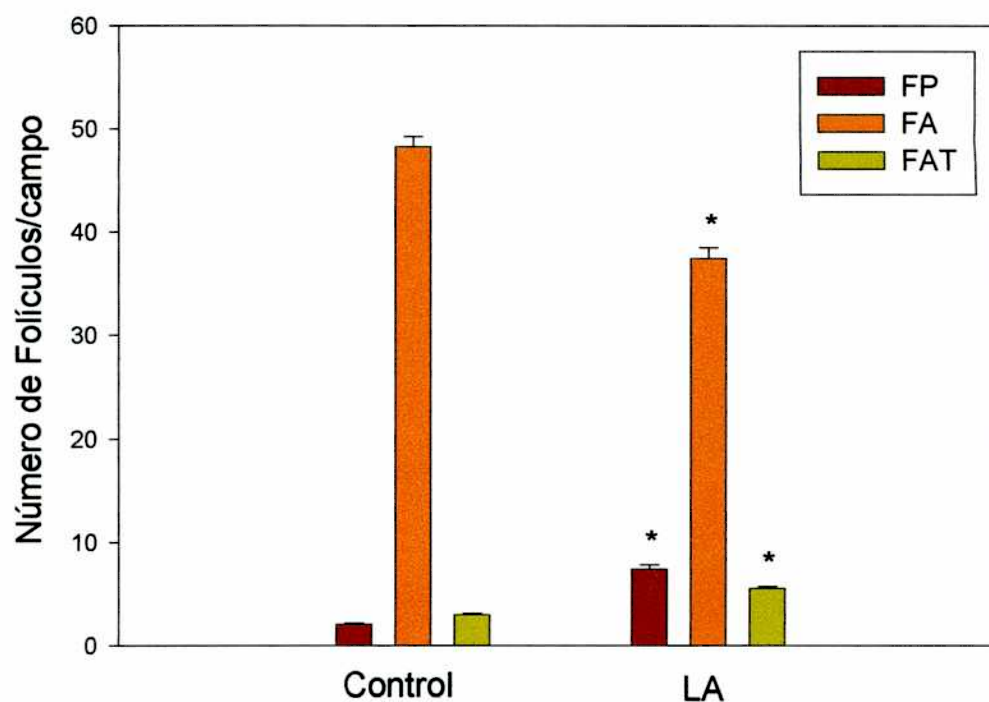


Figura 2. Recuento de folículos en secciones ováricas provenientes de ratas superovuladas. Los valores representan el número de folículos contados en secciones teñidas con hematoxilina-eosina de ovarios de ratas Control y tratadas con LA. Los datos se expresan como el promedio \pm SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al Control. (FP: folículo preantral; FA: folículo antral; FAT: folículo atrésico).

La *Figura 3* representa a un folículo antral en el estadio II de la atresia proveniente de un ovario tratado con LA. Este estadio se caracteriza por la presencia de núcleos picnóticos en células de granulosa (10-30%) y restos celulares en la cavidad antral.

La *Figura 4* representa a un folículo en el estadio III de la atresia proveniente de un ovario tratado con LA. Este estadio se caracteriza por la presencia de un ovocito fragmentado, de macrófagos en el fluido folicular y por la desaparición en parte de células de granulosa. Además, las células de la teca interna se hiperatrofian y el folículo se colapsa.

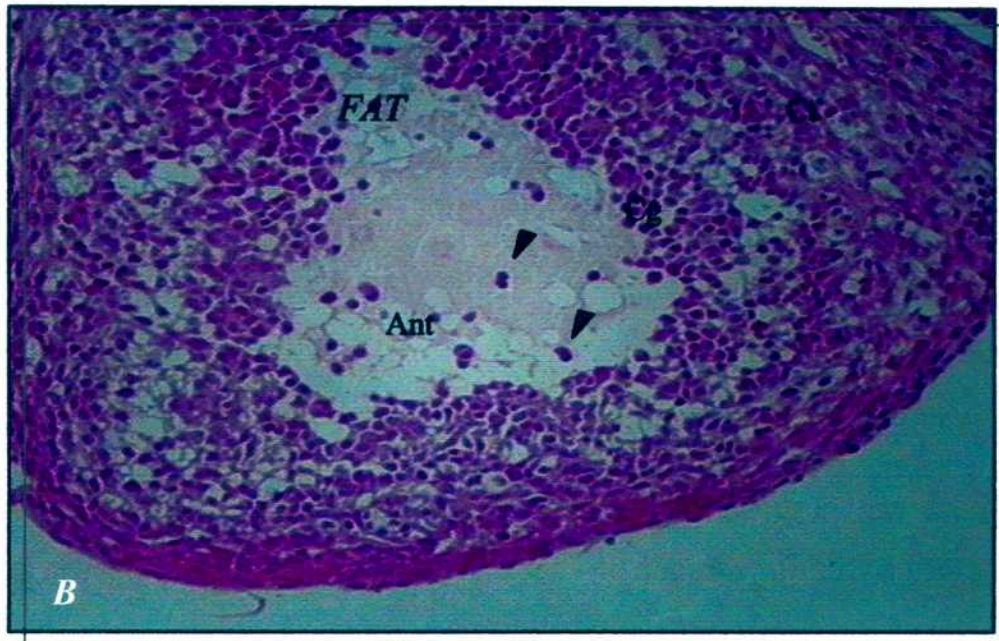
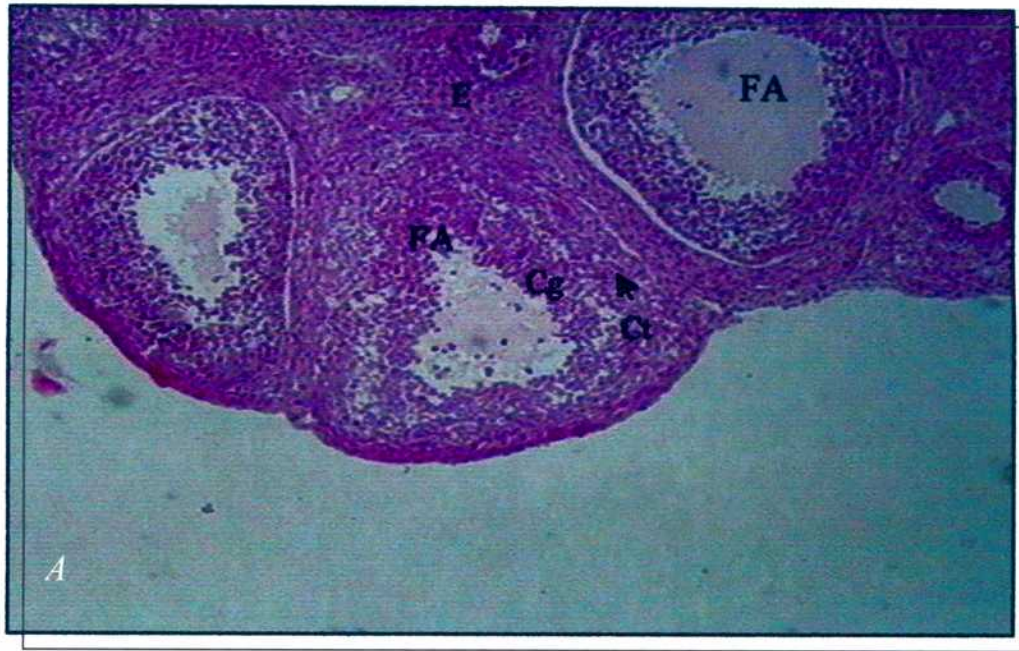


Figura 3. Microfotografías de un folículo en estadio II de la atresia de un ovario de rata estimulada con gonadotrofinas tratadas con LA (LA) durante 48 hs. Nótese la presencia de núcleos picnóticos de células ubicadas dentro de la cavidad antral (Flechas negras). (FA: folículo antral; FAT: folículo atrésico; E: estroma; Ant: cavidad antral; Ct: células de la teca; Cg: células de la granulosa). Panel A: Aumento 40X; Panel B: Aumento 100X.

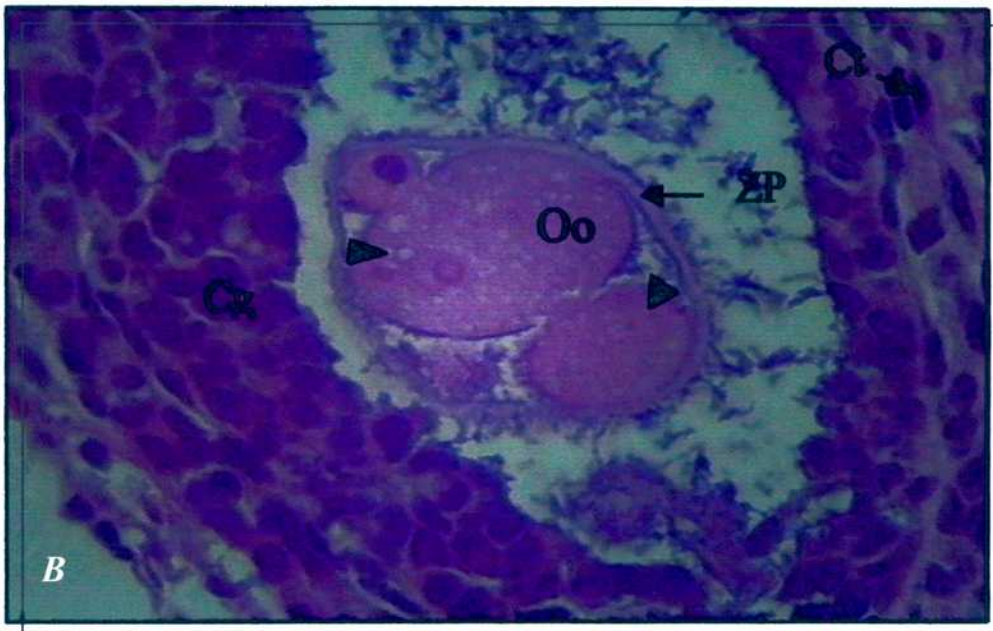
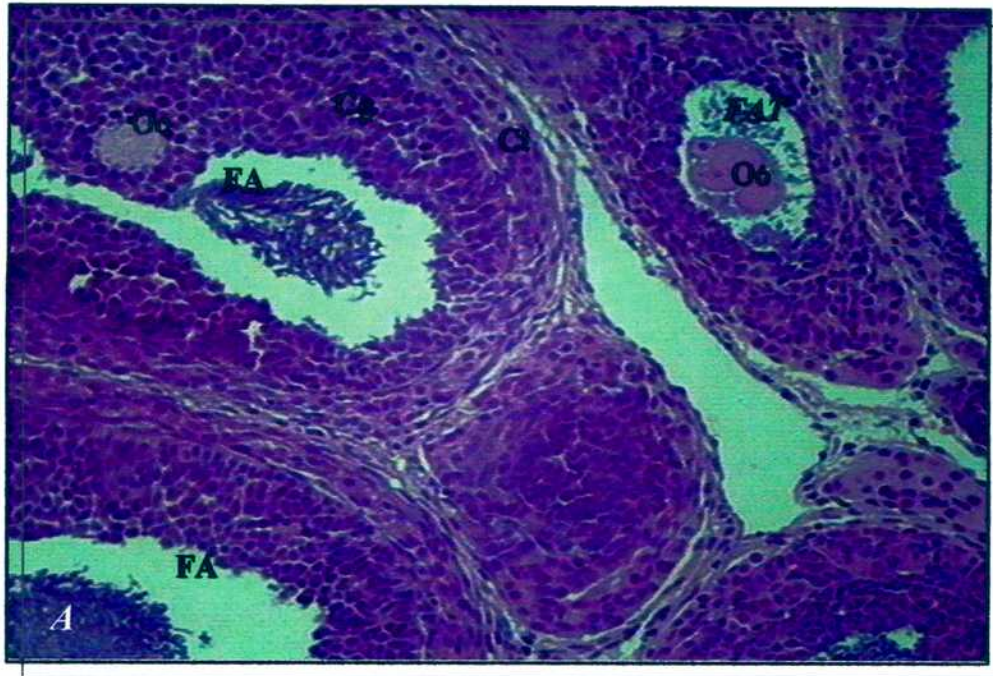
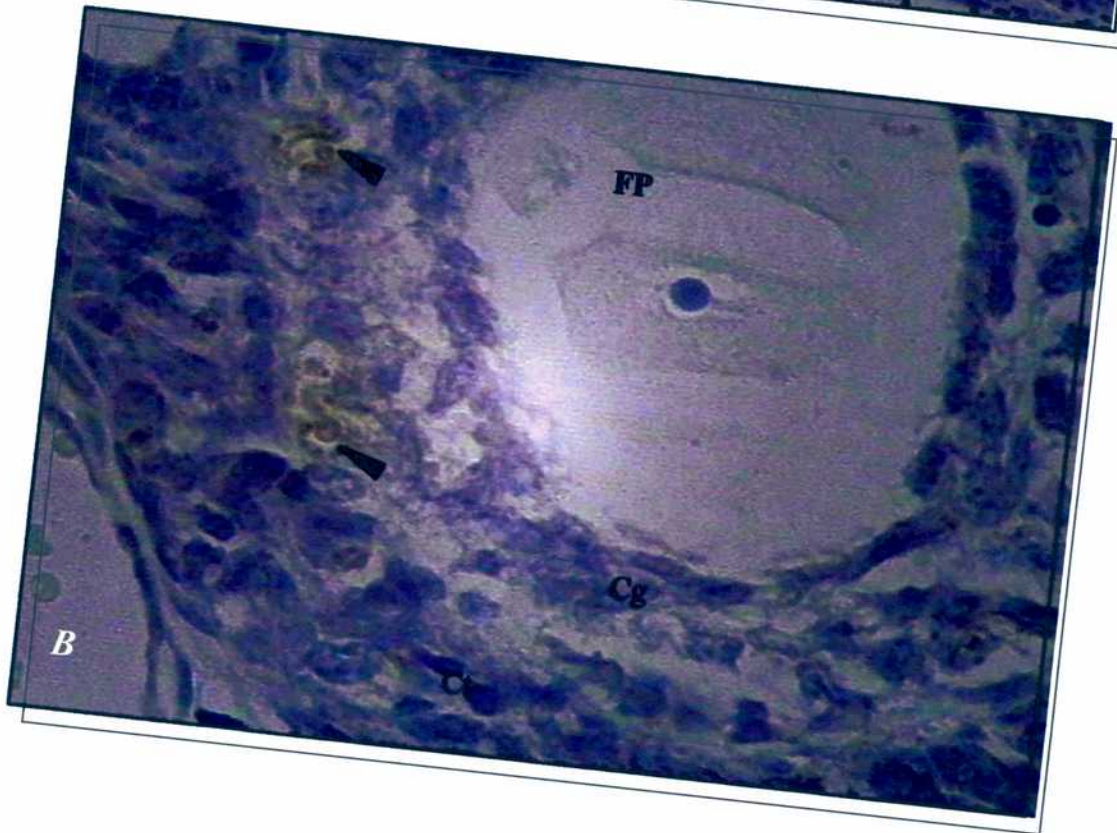
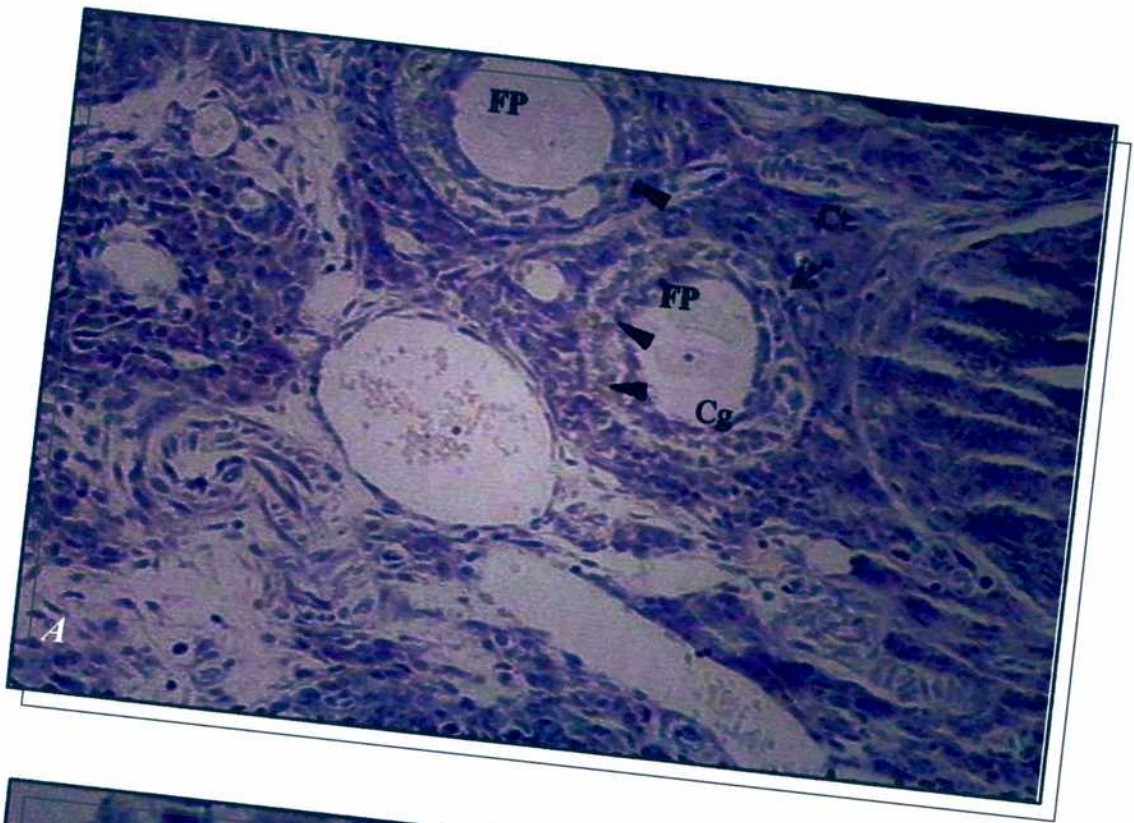


Figura 4. Microfotografías de un folículo en estadio III de la atresia de un ovario de rata estimulada con gonadotrofinas tratadas con LA durante 48 hs. Nótese el oocito fragmentado y la teca interna hiperatrofiada (Flechas negras). (FA: folículo antral; FAT: folículo atrésico; Oo: ovocito; ZP: zona pelúcida; Cg: células de granulosa; Ct: células de la teca). Panel A: Aumento 100X; Panel B: Aumento 400X.

1.2. Fragmentación internucleosomal del ADN

1.2.1. Detección de apoptosis por la técnica de TUNEL

Para investigar si los cambios observados en los cortes de ovario son mediados por un aumento en la muerte celular programada en células de granulosa inducido por LA, se determinó el grado de apoptosis presente en los folículos. Para ello, se procesaron secciones ováricas fijadas en formalina para la localización inmunohistoquímica de la fragmentación de ADN en el núcleo mediante la técnica de TUNEL (Figura 5). El tratamiento con LA causó un aumento en el porcentaje de células apoptóticas tanto en folículos preantrales como en antrales (Figura 6). En todos los folículos analizados, la apoptosis estuvo confinada a las células de granulosa. En la Figura 5C se puede observar la condensación y la marginación de la cromatina que son rasgos característicos de las células apoptóticas. Estos resultados sugerirían que el efecto de LA en el reclutamiento o atresia folicular estaría mediado por la apoptosis.



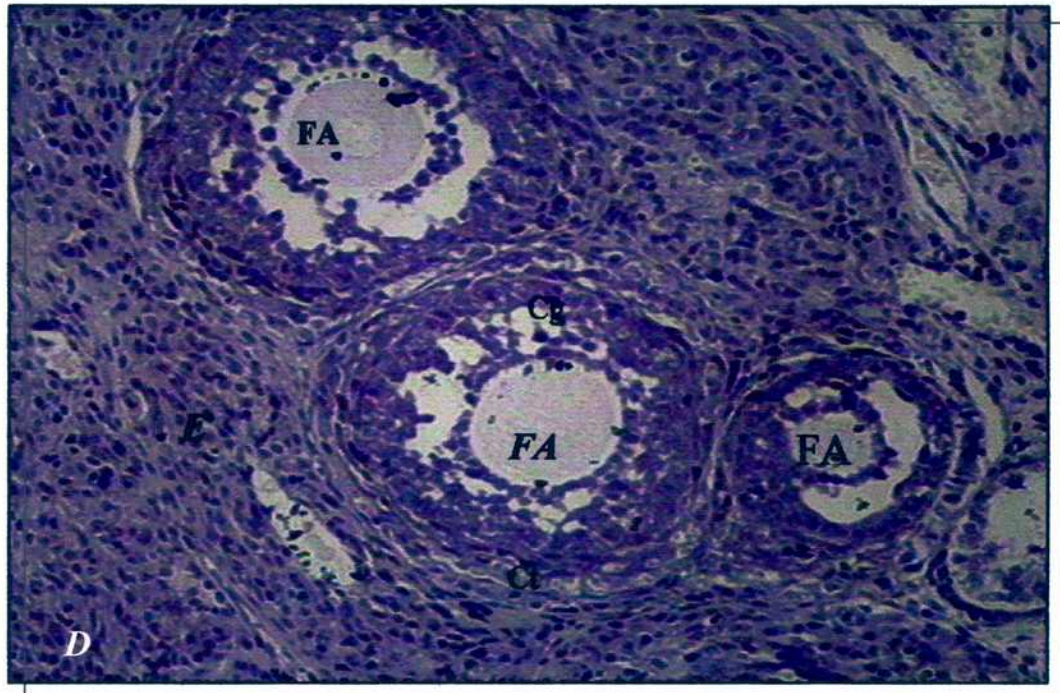
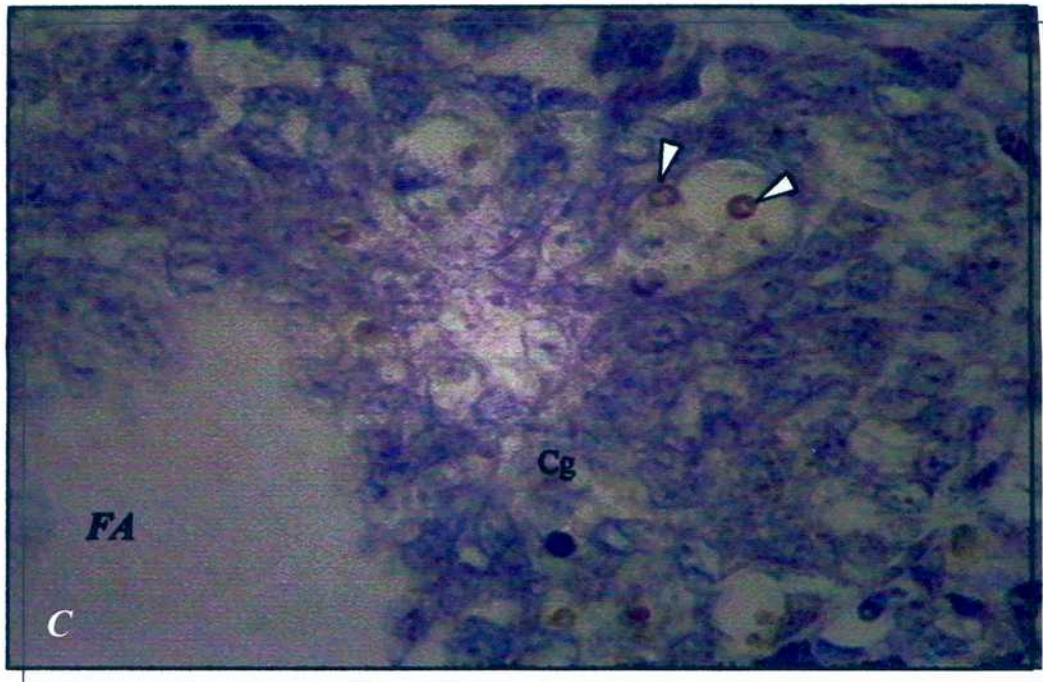


Figura 5. Análisis in situ de la fragmentación de ADN (TUNEL) en secciones de ovario de rata tratadas con LA.. Panel A y B: Nótese las células apoptóticas inmunomarcadas en un folículo preantral (Flechas negras). Panel C: Notar la cromatina condensada y marginada cerca de la envoltura nuclear en células apoptóticas de un folículo antral (Flecha blancas). Panel D: Control negativo sin la enzima TdT. Panel A y D: Aumento 100 X; panel B y C: Aumento 400 X.

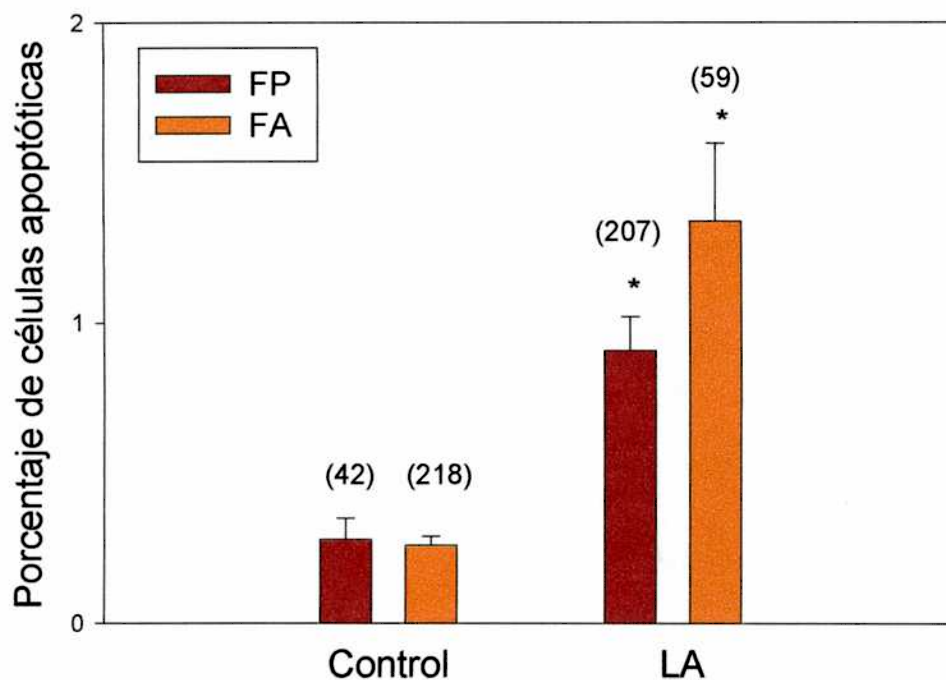


Figura 6. Análisis *in situ* de la fragmentación de ADN (TUNEL) en secciones de ovario de rata tratadas con LA. Se analizaron 5 campos seleccionados al azar de folículos preantrales y antrales (6 secciones/ovario, 6-8 ovarios/grupo). El porcentaje de células apoptóticas se determinó por conteo de las células marcadas en campos (400 X) seleccionados al azar de folículos preantrales y antrales. El número de folículos analizados se encuentran entre paréntesis. El índice apoptótico se calculó como el porcentaje de células apoptóticas respecto al número total de células. El asterisco indica una diferencia significativa ($p < 0,05$) con respecto al grupo Control.

1.2.2. Cuantificación de la apoptosis por electroforesis en geles de agarosa.

Para dilucidar los mecanismos involucrados en la apoptosis folicular inducida por LA, se realizaron cultivos de folículos antrales preovulatorios provenientes de ratas superovuladas. Las incubaciones se llevaron a cabo en medio libre de suero en ausencia o presencia de factores de crecimiento. El cultivo de folículos en medio libre de suero representa un buen modelo para estudiar los factores hormonales y los mecanismos de segundos mensajeros que regulan la apoptosis y la atresia folicular. Además, este sistema tiene la ventaja de conservar la integridad del folículo.

El ADN aislado de los folículos incubados durante 24 hs en medio libre de suero mostró el patrón típico apoptótico de degradación de ADN que consiste en múltiples de fragmentos internucleosomales de 180 pb (*Figura 7*). En cambio, no hubo fragmentación apoptótica de ADN en folículos preovulatorios sin incubar. Los folículos preovulatorios obtenidos de ratas tratadas con LA mostraron un aumento significativo en la fragmentación apoptótica espontánea de ADN (Línea 3; cultivo folicular de 24 hs: 253%, $p < 0,05$ vs. controles). Cuando los folículos se incubaron con EGF (200 ng/ml), el clivaje de ADN apoptótico disminuyó significativamente comparado a los folículos sin el factor de crecimiento. Este efecto supresor se observó tanto en los folículos Control como los tratados con LA (línea 2: 38% y línea 4: 57% respectivamente, $p < 0,05$ vs. controles).

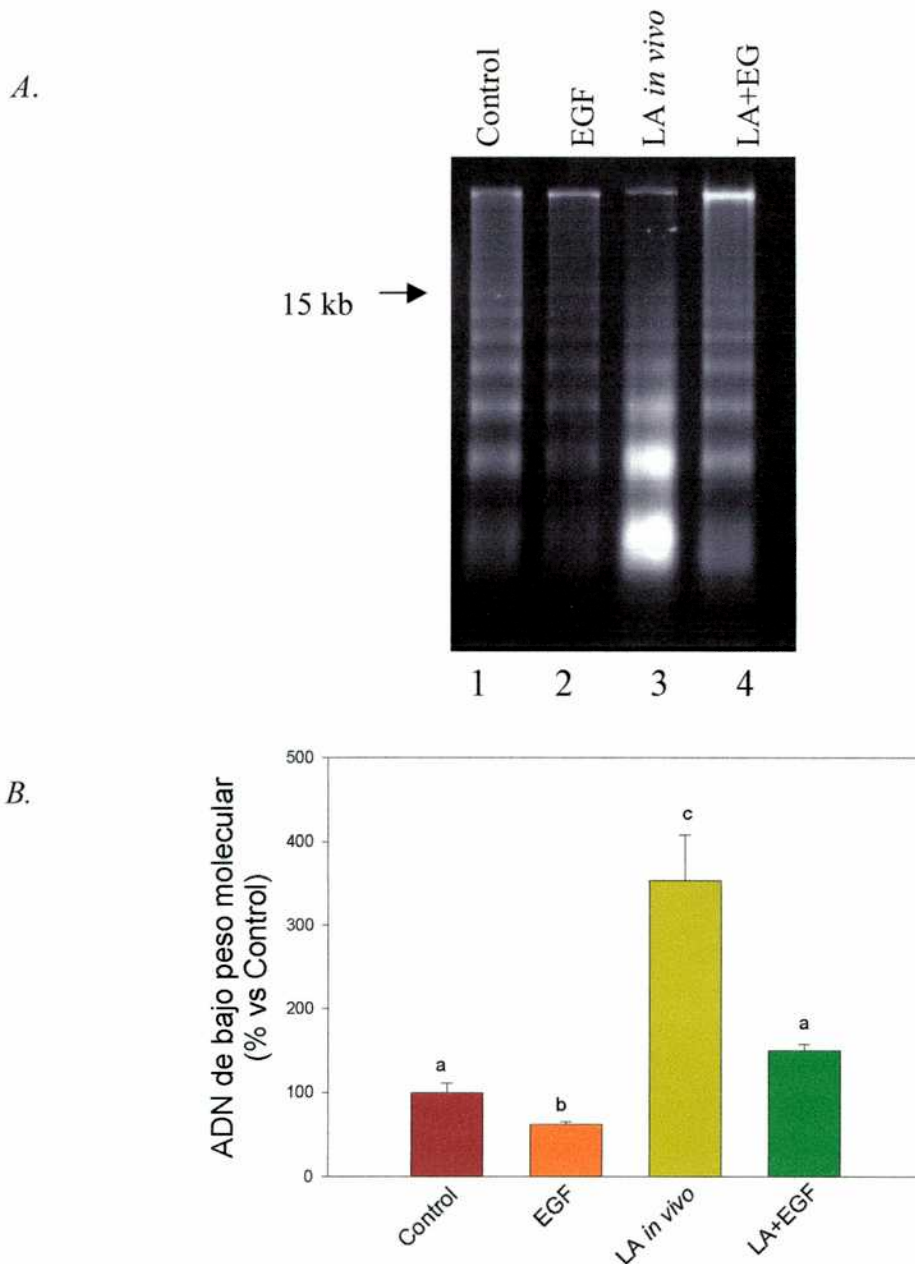


Figura 7. Efecto del tratamiento *in vivo* de LA en la fragmentación de ADN en folículos preovulatorios. Panel A: Gel de agarosa mostrando la fragmentación de ADN. Panel B: Análisis densitométrico del clivaje de ADN (<15 kb). Los animales tratados con eCG se inyectaron cada 12 hs durante 48 hs con LA (0,5µg/rata). Los animales Controles se trataron con vehículo. Luego de 3 hs de la última inyección, los folículos preovulatorios (4/vial) se aislaron y se cultivaron por 24 hs en medio libre de suero en presencia o ausencia de EGF (200 ng/ml). 4µg de ADN folicular extraído de cada cultivo fueron analizados luego de corrida electroforética en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio. Los valores obtenidos por densitometría se expresan como porcentajes referidos a los folículos colectados luego de 24 hs de incubación en ausencia de factor de crecimiento. Los datos representan el promedio ± SEM de tres corridas de geles de experimentos independientes. Las barras con diferentes supraíndices son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

1.3. Niveles de proteínas de la superfamilia del gen bcl-2 en folículos preovulatorios

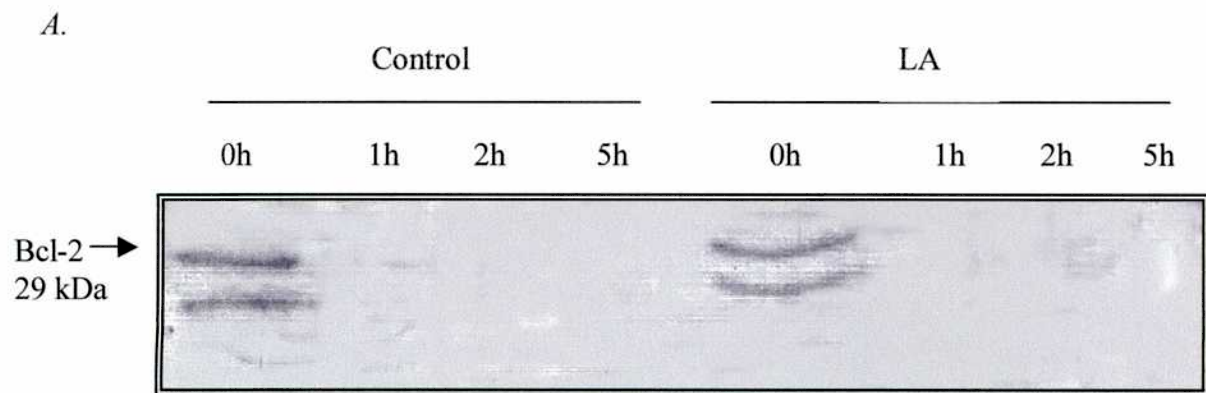
Los miembros de la familia de genes de bcl-2 han sido postulados como mediadores intracelulares de la sobrevivencia celular. Las proteínas de Bcl-2 y Bax se comportan como factores anti o proapoptóticos, respectivamente. El gen bcl-x genera por splicing alternativo varias proteínas. Una de ellas es la isoforma larga (Bcl-xL) que tiene efecto antiapoptótico y otra es la isoforma corta (Bcl-xS) que se comporta como una proteína proapoptótica. Para correlacionar el efecto estimulador de la apoptosis dado por LA en ovario de rata con la estabilidad de las proteínas pro- o antiapoptóticas, se realizaron inmunoblots con anticuerpos anti Bax, anti Bcl-x y anti Bcl-2.

Los contenidos proteicos foliculares de Bcl-2, Bax y Bcl-x (isoforma larga y corta) se analizaron a diferentes tiempos de incubación (0, 1, 2 y 5 hs.) en medio libre de suero de forma similar a lo realizado para medir apoptosis por geles de agarosa.

En la *Figura 8*, se puede observar que los niveles de Bcl-2 se mantienen constantes en los folículos preovulatorios sin incubar provenientes del grupo control y LA. En cambio, cuando los folículos de ambos grupos se incubaron 1, 2 y 5 hs, no se observó la presencia de la proteína.

En la *Figura 9*, los niveles de la proteína Bax en los extractos proteicos provenientes del grupo control y LA varían similarmente a lo largo de los tiempos estudiados.

En la *Figura 10*, se puede observar que la relación entre Bcl-xL y Bcl-xS disminuye significativamente en los folículos provenientes de ratas tratadas con LA (C=0h: $2,52 \pm 0,27$; 1h: $2,47 \pm 0,23$; 2h: $1,4 \pm 0,1$ y 5h: $1,29 \pm 0,05$; LA= 0h: $3 \pm 0,1$; 1h: $1,73 \pm 0,19$; 2h: $0,83 \pm 0,04$ y 5h: $0,62 \pm 0,08$; $p < 0,05$).



B.

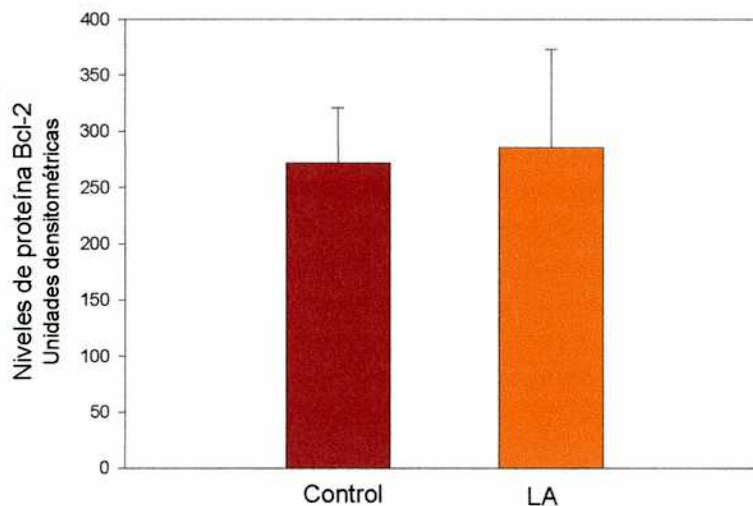
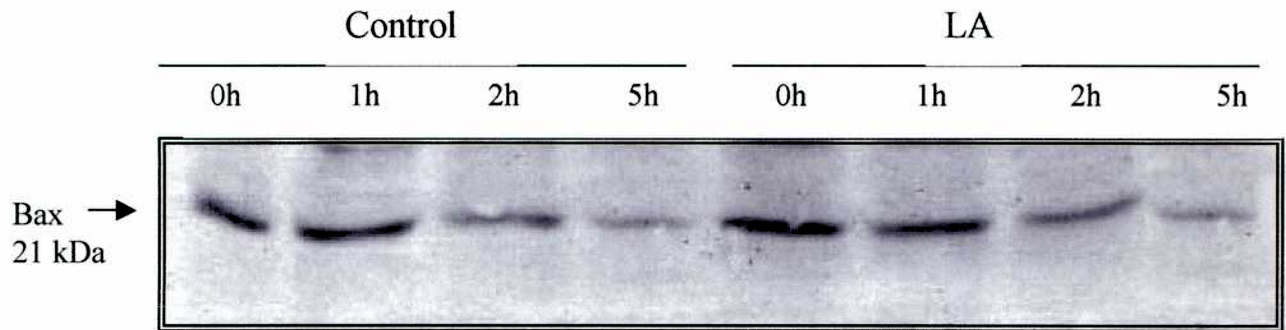


Figura 8. Efecto del Acetato de Leuprolide en el contenido de Bcl-2 en los folículos preovulatorios. Los folículos preovulatorios se aislaron por microdissección ovárica y se incubaron en medio libre de suero durante diferentes tiempos. Luego de la homogenización, las proteínas se extrajeron, se corrieron en un gel de poliacrilamida 15 % en SDS y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La proteína Bcl-2 se visualizó por medio de un anticuerpo anti Bcl-2. Panel A : Inmunoblot de la proteína Bcl-2. Panel B: Análisis densitométrico del inmunoblot. La densidad óptica se expresa como unidades arbitrarias \pm SEM ($n=3$.)

A.



B.

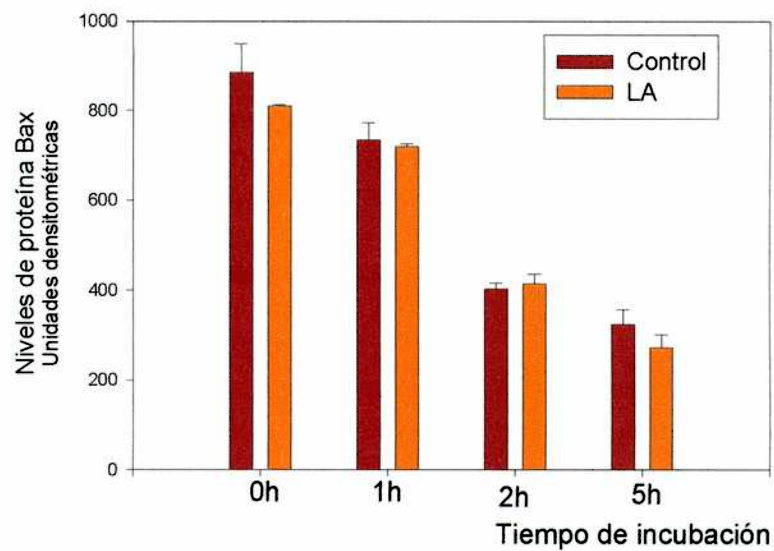
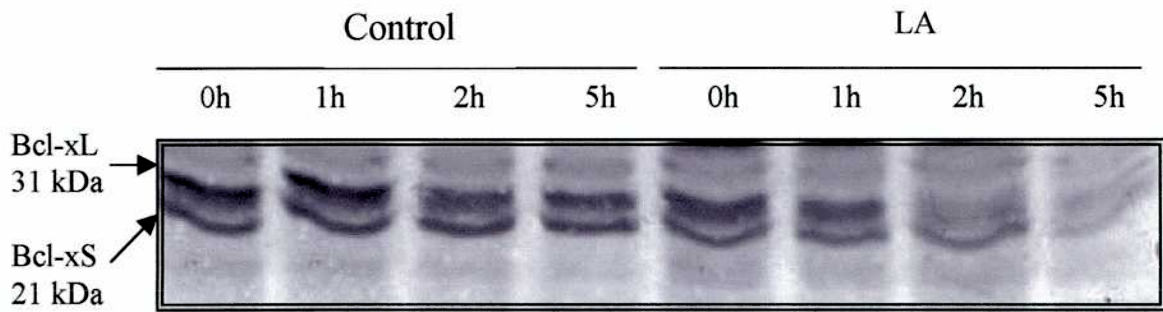


Figura 9. Efecto del Acetato de Leuprolide en el contenido de Bax en los folículos preovulatorios. La proteína Bax se visualizó por uso de un anticuerpo anti Bax Panel A: Inmunoblot de la proteína Bax. Panel B: Análisis densitométrico del inmunoblot. La densidad óptica se expresa como unidades arbitrarias \pm SEM ($n=3.$). Para más detalles ver Figura 8.

A.



B.

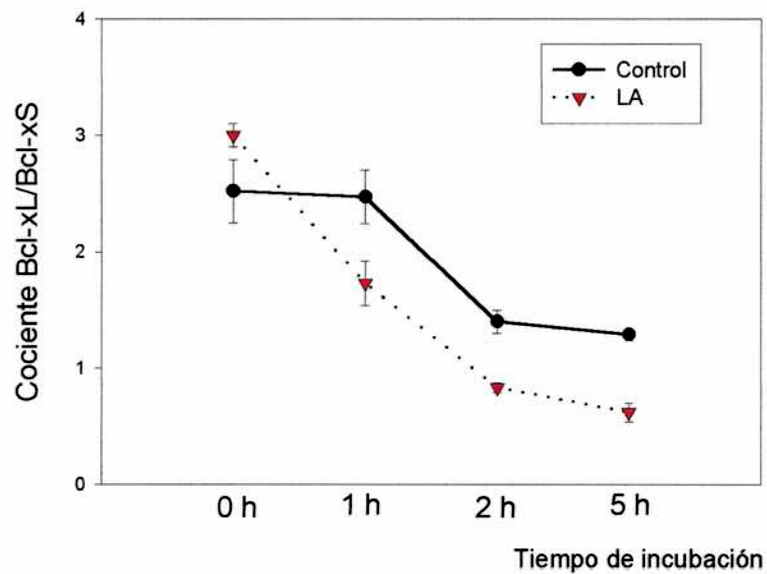


Figura 10. Efecto del Acetato de Leuprolide en el contenido de Bcl-x en los folículos preovulatorios. La proteína Bcl-x se visualizó por uso de un anticuerpo anti Bcl-x que reconoce la isoforma larga: Bcl-xL y la corta: Bcl-xS. Panel A: Inmunoblot de la proteína Bcl-x. Panel B: Análisis densitométrico del inmunoblot. La densidad óptica se expresa como unidades arbitrarias \pm SEM (n=3). Para más detalles ver Figura 8.

2. Efecto in vivo de LA sobre la esteroidogénesis ovárica

2.1. Niveles de estradiol y progesterona en suero y en folículo

Los niveles de progesterona y estradiol se determinaron en ratas prepúberes inyectadas con PMSG o PMSG y LA.

En la *Figura 11* se puede observar que los niveles de progesterona sérica no varían significativamente en ambos grupos experimentales (Control: $13,08 \pm 2,04$ ng/ml, LA: $13,48 \pm 1,09$). En cambio, los niveles de estradiol sérico se encuentran significativamente disminuidos en el grupo tratado con LA (C: $531,3 \pm 52,2$; LA: $141,3 \pm 27,3$ pg/ml; $p < 0,05$) (*Figura 12*). Estos datos se correlacionan con los resultados observados en la morfología de cortes histológicos de ovario donde se muestra un menor desarrollo folicular luego del tratamiento con el análogo de GnRH. Es decir, se observa un menor número de folículos antrales y un mayor número de folículos preantrales y atrésicos en LA. Esto explicaría los bajos niveles séricos de estradiol observados.

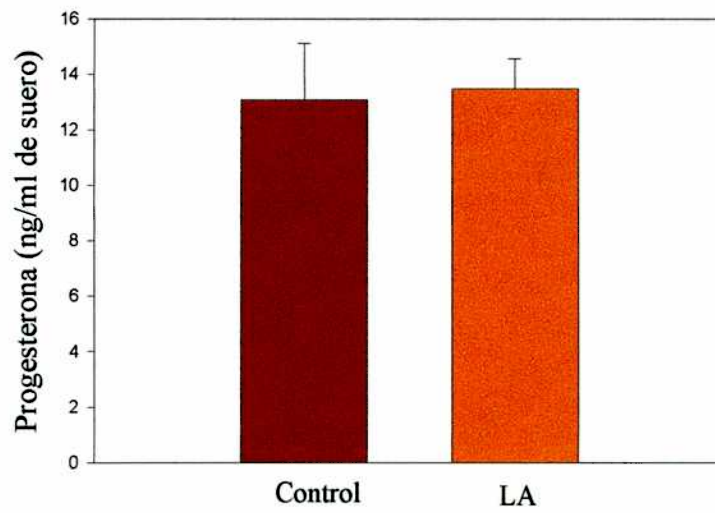


Figura 11. Niveles séricos de progesterona. Se realizó una extracción del esteroide del suero obtenido de ratas inyectadas con PMSG o PMSG y LA durante 48 hs (n=6). Luego se dosó la progesterona por radioinmunoensayo (RIA).

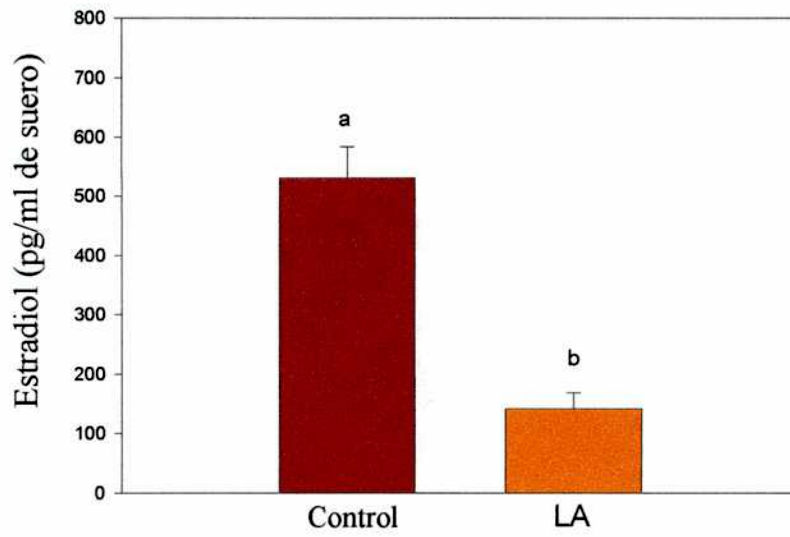


Figura 12. Niveles séricos de estradiol. Se realizó una extracción del esteroide del suero obtenido de ratas inyectadas con PMSG o PMSG y LA durante 48 hs ($n=6$). Luego se dosó el estradiol por RIA. Diferentes supraíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos (a vs b , $p<0,05$).

Considerando que los valores hormonales circulantes no siempre correlacionan con la producción endógena debido a cambios en la metabolización y posterior depuración de la hormona, se decidió medir los niveles de progesterona en tejido y en folículo ovárico. Al medir el contenido tisular de progesterona, se observaron valores significativamente mayores en ovario en el grupo LA en ovario (C: $49,18 \pm 5,35$; LA: $173,7 \pm 28,7$ ng/gr de ovario; $p < 0,05$) y en folículo ovárico (C: $65,56 \pm 2,16$; LA: $303,9 \pm 53,36$ pg/folículo; $p < 0,05$) (*Figura 13*).

Los resultados obtenidos por radioinmunoensayo demuestran que si bien el grupo tratado con el análogo posee una actividad esteroidogénica aumentada en tejido ovárico, esto se revierte ya que la progesterona sérica es igual en ambos grupos y los niveles circulantes de estradiol son menores en aquellos animales tratados con LA. Esto sugeriría un bloqueo o transformación a otro metabolito en algún paso de la síntesis de esteroides.

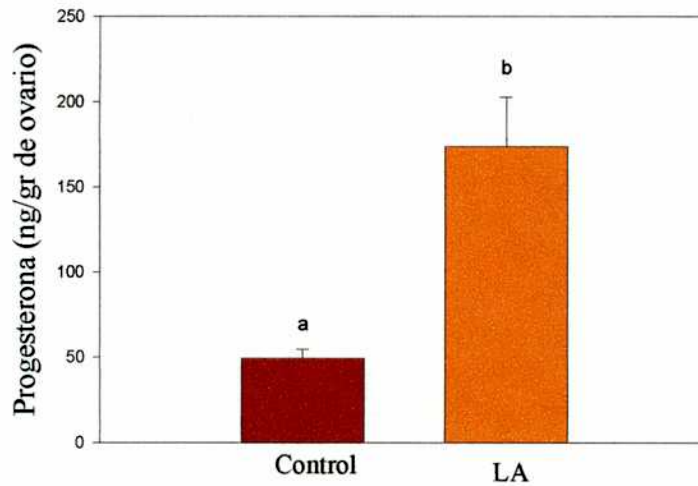


Figura 13. Niveles de progesterona en tejido ovárico. Se realizó una extracción del esteroide del tejido ovárico de ratas inyectadas con PMSG o PMSG y LA durante 48 hs ($n=16$). Luego se dosó la progesterona tisular por RIA. Diferentes supraíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos (a vs b , $p<0,05$).

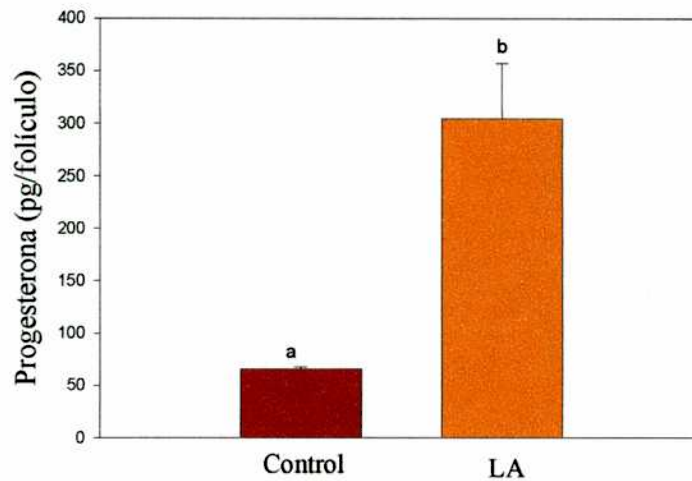


Figura 14. Niveles de progesterona en foliculo. Se realizó una extracción del esteroide de los foliculos obtenidos por microdissección de ovarios de ratas inyectadas con PMSG o PMSG y LA durante 48 hs ($n=16$). Luego se dosó la progesterona folicular por RIA. Diferentes supraíndices indican diferencias significativas entre los tratamientos (a vs b , $p<0,05$).

2.2. Niveles de la proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis (StAR) y de la enzima P450scc

La regulación hormonal de la síntesis de esteroides en forma aguda ó en forma crónica, es mediada por AMPc (Karaboyas et al, 1965; Haynes et al, 1959). 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.

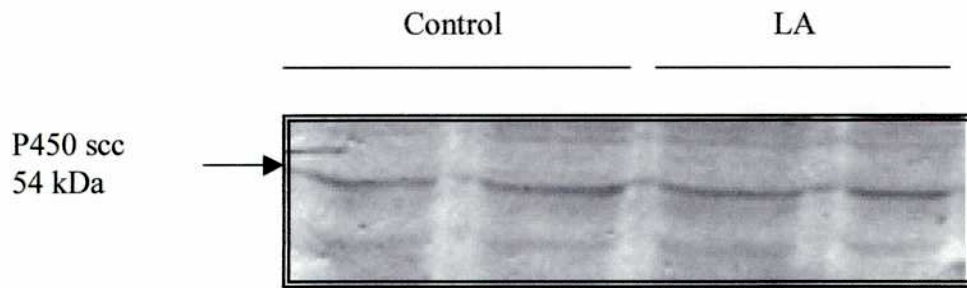
Actualmente se sabe que la regulación de la esteroidogénesis en presencia del complejo P450scc es determinada por la proteína denominada *Proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis (StAR)*. Esta proteína se sintetiza como un precursor de 37 kDa que es rápidamente transportado a la mitocondria, y su incorporación está asociada con su procesamiento a una forma de 30 kDa.

Teniendo en cuenta que la expresión de la enzima P450scc aumenta significativamente bajo la acción de ciertos estímulos como PMSG (Zlotkin y col., 1986) y que la proteína StAR se expresa de forma variable de acuerdo al momento y estímulos bajo los cuales se encuentra el desarrollo folicular (Ronen-Fuhrmann y col., 1998), se evaluó el efecto del análogo de GnRH sobre la expresión de ambas enzimas reguladoras de la esteroidogénesis ovárica. Por otro lado, como ya hemos explicado anteriormente, ambas enzimas participan de dos pasos reguladores de la síntesis de esteroides. Además, los resultados obtenidos por RIA demostraron que la esteroidogénesis se encuentra afectada por la administración de este análogo. Estas evidencias sugerirían la participación de las proteínas mencionadas en el modelo estudiado.

2.2.1. Efecto crónico

En la *Figura 14* se muestra el contenido proteico de la enzima P450 scc en folículos preovulatorios provenientes de ratas tratadas con PMSG o PMSG y LA durante 48 hs. Los niveles del citocromo P450scc no muestran diferencias significativas entre ambos grupos experimentales.

A.



B.

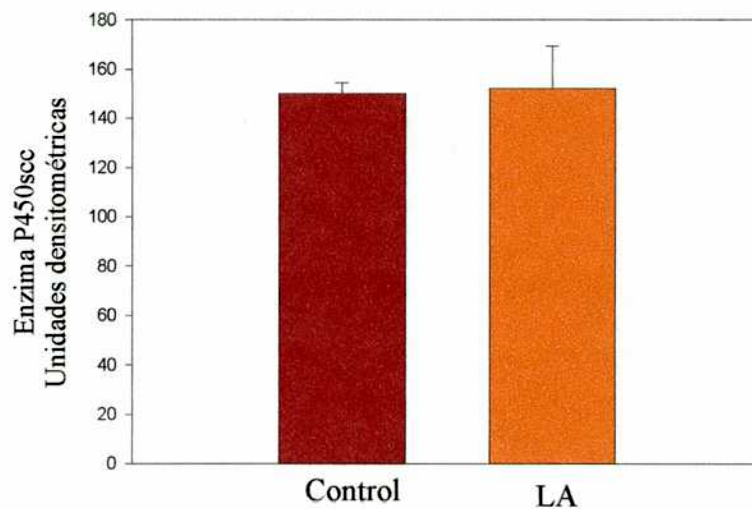
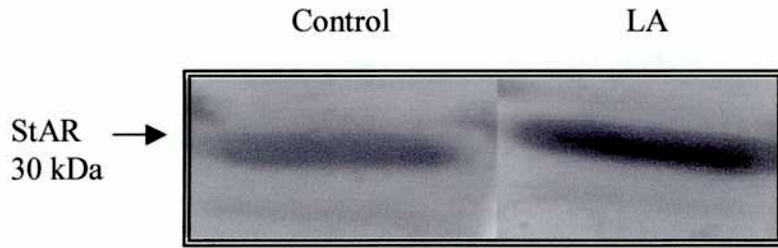


Figura 14. Efecto del Acetato de Leuprolide en el contenido de P450 scc en los folículos preovulatorios. Los folículos preovulatorios se aislaron por microdissección ovárica de ratas tratadas con PMSG o PMSG y LA.. Luego de la homogenización, las proteínas se extrajeron, se corrieron en un gel de poliacrilamida 15 % en SDS y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La enzima P450 scc se visualizó por uso de un anticuerpo anti P450 scc. Panel A : Inmunoblot de la enzima P450 scc. Panel B: Análisis densitométrico del inmunoblot. La densidad óptica se expresa como unidades arbitrarias \pm SEM (n=3.)

A.



B.

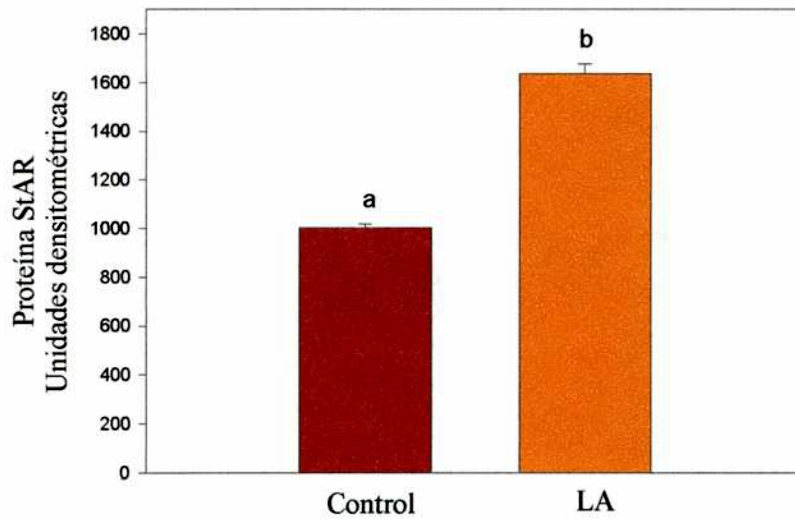


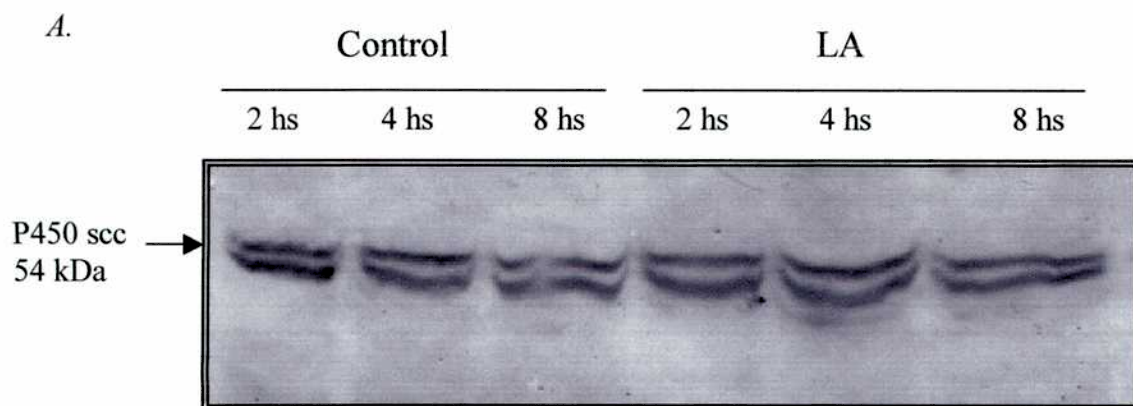
Figura 15. Efecto del Acetato de Leuprolide en el contenido de StAR en los folículos preovulatorios. La proteína StAR se visualizó utilizando un anticuerpo anti StAR. Panel A : Inmunoblot de StAR.. Panel B: Análisis densitométrico del inmunoblot. La densidad óptica se expresa como unidades arbitrarias \pm SEM (n=3.). Para más detalles ver Figura 14.

Debido a las evidencias citadas anteriormente acerca de la expresión diferencial de la proteína StAR en el desarrollo folicular y su importancia en la esteroidogénesis como reguladora de otro paso clave en este proceso, se consideró relevante investigar el efecto del análogo de GnRH sobre la proteína mencionada. Los resultados obtenidos muestran un aumento significativo del contenido de StAR en los folículos preovulatorios en aquellos animales tratados con LA durante 48hs (C: $1002,5 \pm 17,5$; LA: 1636 ± 41 , $p < 0,05$) (*Figura 15*). Esto explicaría los altos niveles de progesterona encontrados en tejido y folículo en ese mismo grupo.

2.2.2. Efecto agudo

Ronen-Fuhrmann y col. (1998) demostraron en ratas prepúberes superovuladas y tratadas con hCG (gonadotropina coriónica humana) que la expresión de la proteína StAR ocurría en forma bifásica. El primer pico aparecía luego de la administración de PMSG y duraba 24 hs. En cambio, el segundo pico se observó luego del tratamiento con hCG, el cual se inyectó 48 hs luego de PMSG.

Para evaluar el efecto agudo (a tiempos cortos) del análogo de GnRH sobre la expresión de la enzima P450 scc y la proteína StAR en el ovario, se administró una sola dosis de LA ($2 \mu\text{g}/\text{rata}$) a ratas superovuladas con PMSG. En la *Figura 16* se puede observar que los niveles proteicos de P450 scc no varían significativamente entre el grupo Control y el tratado con LA. En cambio, el contenido de StAR aumenta temporalmente en forma significativa en el grupo tratado con el análogo comparado al control (C2hs: 20 ± 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: $776 \pm 73,5$; $p < 0,05$) (*Figura 17*).



B.

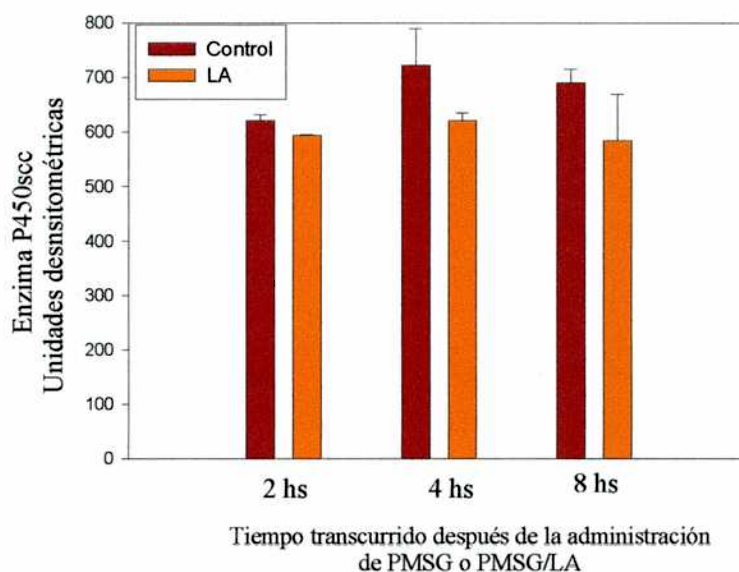


Figura 16. Efecto agudo del Acetato de Leuprolide en el contenido de P450 scc. A ratas prepúberes se les administró PMSG o PMSG/LA (una sola dosis de LA: 2µg/rata) y se sacrificaron a distintos tiempos (2, 4 y 8 hs). Los folículos preovulatorios se aislaron por microdissección ovárica y se homogenizaron. Las proteínas se extrajeron, se corrieron en un gel de poliacrilamida 15 % en SDS y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La enzima P450 scc se visualizó por uso de un anticuerpo anti P450 scc. Panel A : Inmunoblot de la enzima P450 scc. Panel B: Análisis densitométrico del inmunoblot. La densidad óptica se expresa como unidades arbitrarias ± SEM (n=3.)

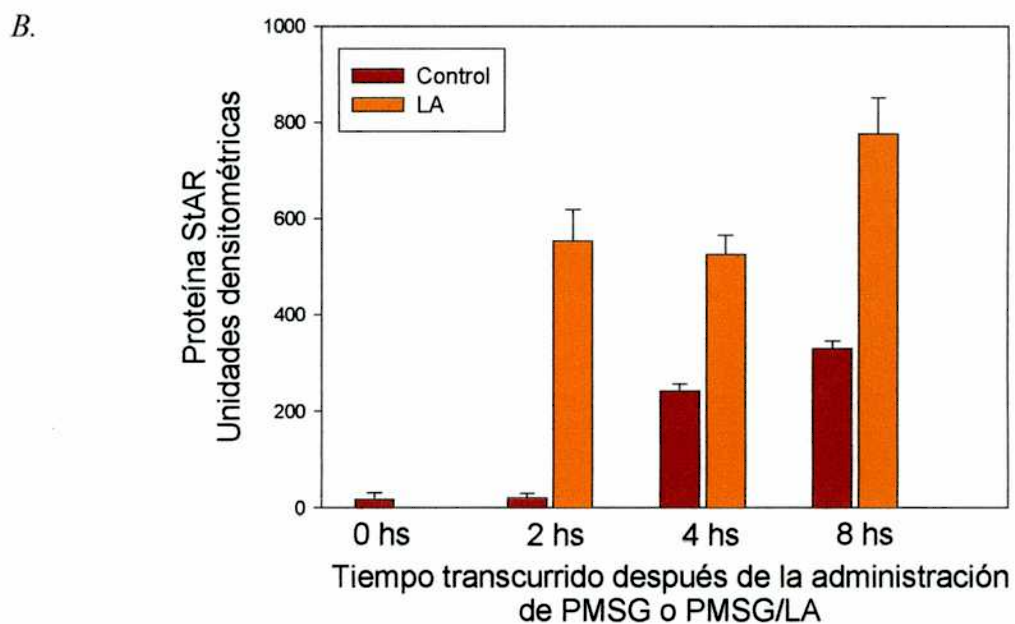
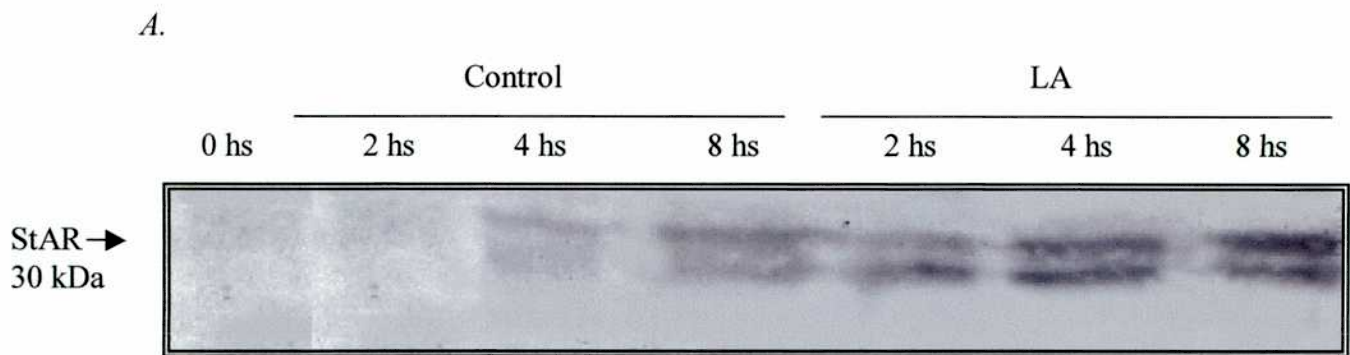


Figura 17. Efecto agudo del Acetato de Leuprolide en el contenido de StAR La proteína StAR se visualizó por uso de un anticuerpo anti StAR. Panel A : Inmunoblot de la proteína StAR. Panel B: Análisis densitométrico del inmunoblot. La densidad óptica se expresa como unidades arbitrarias \pm SEM ($n=3.$). Para más detalles ver Figura 15.

3. Efecto in vitro de LA sobre la apoptosis en folículos preovulatorios.

Interacción con factores de crecimiento

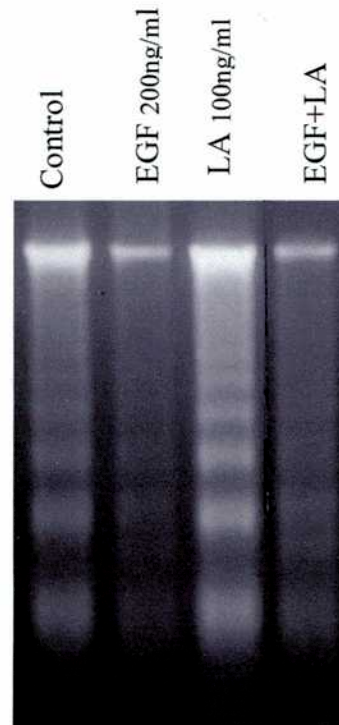
Se hicieron estudios *in vitro* para corroborar el efecto de LA sobre cultivos de folículos preovulatorios en ausencia o presencia de EGF y otros factores de crecimiento como FGF y IGF-1. En experimentos preliminares se probaron distintas dosis de LA y factores de crecimiento, los resultados se muestran para la concentración donde se observó máximo efecto.

Los folículos incubados con LA (100 ng/ml) durante 24 hs mostraron un aumento significativo en la apoptosis comparado a los folículos Controles (Línea 3, cultivo folicular de 24 hs con LA: 370 %, $p < 0,05$) (*Figura 18*). Cuando se realizó la coincubación de los folículos con LA y EGF (200 ng/ml), se observó que el efecto de LA era suprimido por el factor de crecimiento (Línea 4, 330 %, $p < 0,05$). Estos resultados confirman los datos obtenidos en los estudios *in vivo* con el análogo.

En la *Figura 19*, se puede observar que los factores de crecimiento IGF-1 y FGF a diferencia del EGF, no rescatan a los folículos preovulatorios de la apoptosis espontánea de ADN.

Por otro lado, estos factores de crecimiento son capaces de inhibir completamente el efecto estimulador de la apoptosis inducida por LA en folículos preovulatorios.

A.



B.

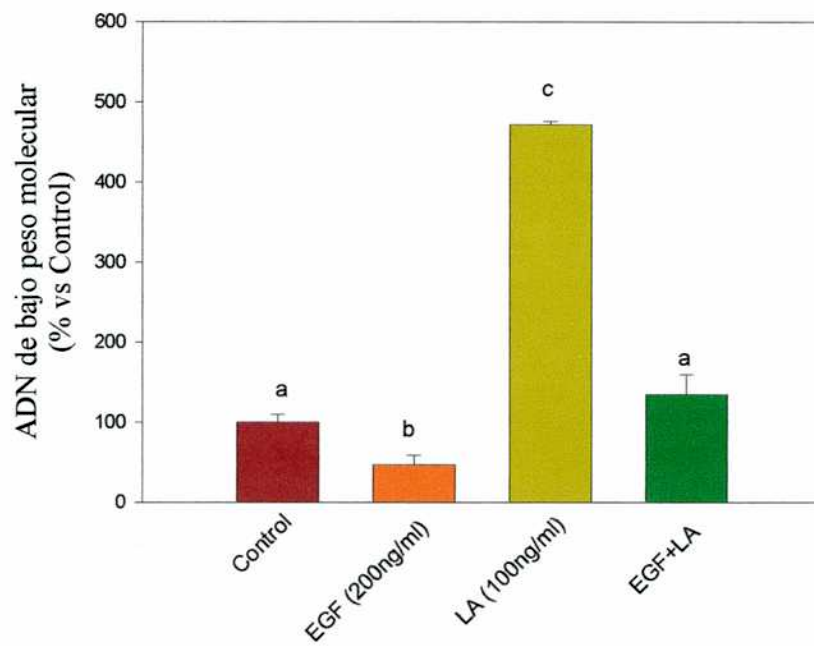
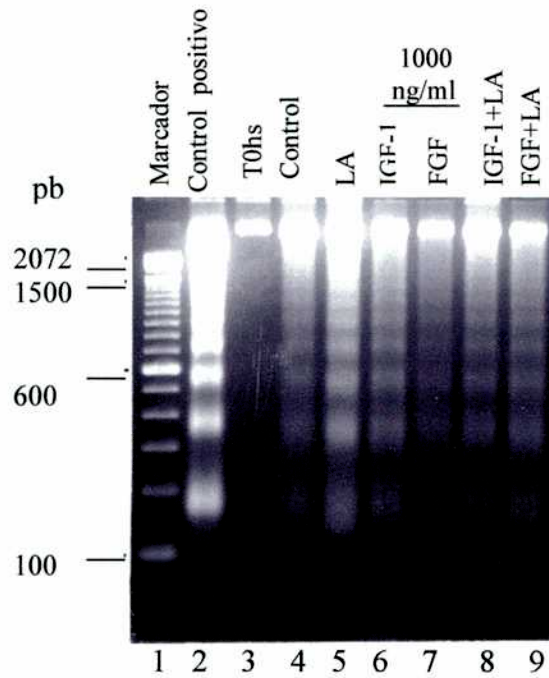


Figura 18. Efecto del tratamiento *in vitro* de LA y EGF en la fragmentación de ADN en folículos preovulatorios. Panel A: Gel de agarosa mostrando la fragmentación de ADN. Panel B: Análisis densitométrico del clivaje de ADN (<15 kb). Los valores obtenidos por densitometría se expresan como porcentajes referidos a los folículos colectados luego de 24 hs de incubación en ausencia de factor de crecimiento. Los datos representan el promedio \pm SEM de tres corridas de geles de experimentos independientes. Las barras con diferentes supraíndices son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Para otros detalles ver Figura 6.

A.



B.

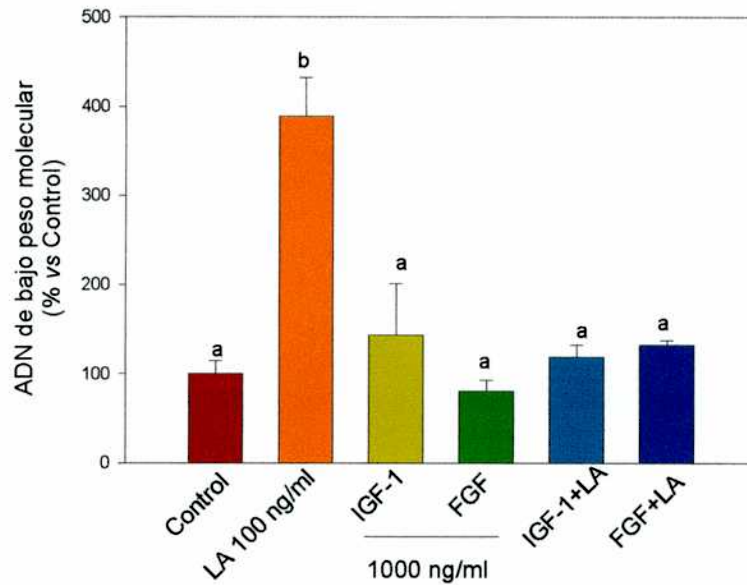


Figura 19. Efecto de los factores de crecimiento (IGF-1 y FGF) en folículos preovulatorios incubados con LA en la fragmentación de ADN. Panel A: Gel de agarosa mostrando la fragmentación de ADN. Panel B: Análisis densitométrico del clivaje de ADN (<15 kb). Los folículos preovulatorios obtenidos de ratas estimuladas con PMSG se aislaron y se cultivaron por 24 hs en medio libre de suero en presencia de LA (100 ng/ml) y/o FGF (1000 ng/ml) o IGF-1 (1000 ng/ml). Los datos representan el promedio \pm SEM de tres corridas de geles de experimentos independientes. Las barras con diferentes supraíndices son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Para otros detalles ver Figura 6.

4. Efecto in vitro de LA sobre la apoptosis en folículos antrales tempranos. Interacción con FSH, AMPc y factores de crecimiento.

Aunque la atresia ocurre en todos los estadios del desarrollo folicular, la mayoría de los folículos que mueren por apoptosis son folículos antrales tempranos, además está demostrado que son los más sensibles a sufrir apoptosis. (Hirshfield y col., 1978; Hirshfield y col., 1991; Chun y col., 1996).

Billig y col. (1994) mostraron que la administración *in vivo* de un agonista de GnRH aumenta la muerte celular apoptótica en tejido ovárico y en células de granulosa provenientes de ratas hipofisectomizadas y tratadas con estrógenos. Mientras Papadopoulos y col. (1999) demuestran que la administración de GnRH-a aumenta la degradación de ADN en cuerpo lúteo de ratas preñadas. Además, en nuestro laboratorio se demostró por medio de inmunohistoquímica que el tratamiento *in vivo* con GnRH-a en ratas tratadas con PMSG y hCG, produce un aumento en el número de células apoptóticas en folículos en crecimiento y en cuerpos lúteos (Andreu y col., 1998).

Para determinar los efectos *in vitro* de GnRH-a en la apoptosis de folículos antrales tempranos, se examinó el efecto de este agonista y su interacción con FSH, AMPc y factores de crecimiento (IGF-1, EGF y FGF) en ratas prepúberes tratadas con DES.

En la *Figura 20*, se muestra la fragmentación apoptótica espontánea del ADN proveniente de los folículos cultivados en medio libre de suero en ausencia de hormonas durante 24 hs (Línea 2: Control). En cambio, como en los resultados vistos anteriormente para folículos preovulatorios, la fragmentación del ADN fue mínima en folículos sin incubar (Línea 1: T0hs). La presencia de FSH (20-200 ng/ml) en el medio de incubación suprimió significativamente la apoptosis espontánea en un 80-85% ($p < 0,05$).

En la *Figura 21*, se puede observar que el análisis cuantitativo del clivaje del ADN de los folículos no muestra cambios significativos en la fragmentación del ADN después del tratamiento *in vitro* con LA (1-100 ng/ml) comparado al Control. En cambio, la coincubación con LA (100ng/ml) interfiere parcialmente con el efecto de FSH (200 ng/ml) en la supresión de la apoptosis (Línea 4: FSH+LA, 40%) (*Figura 22*). Además, cuando se probaron concentraciones más bajas de LA el efecto fue menos pronunciado (datos no mostrados).

También, la supresión de la apoptosis se obtuvo por tratamiento con un análogo del segundo mensajero para FSH, dibutilil AMPc (1mM, 80% de inhibición de la apoptosis, $p<0,05$). Pero en presencia de LA, el efecto supresor del dAMPc fue menor (55% de inhibición de la apoptosis, $p<0,05$) (*Figura 23*).

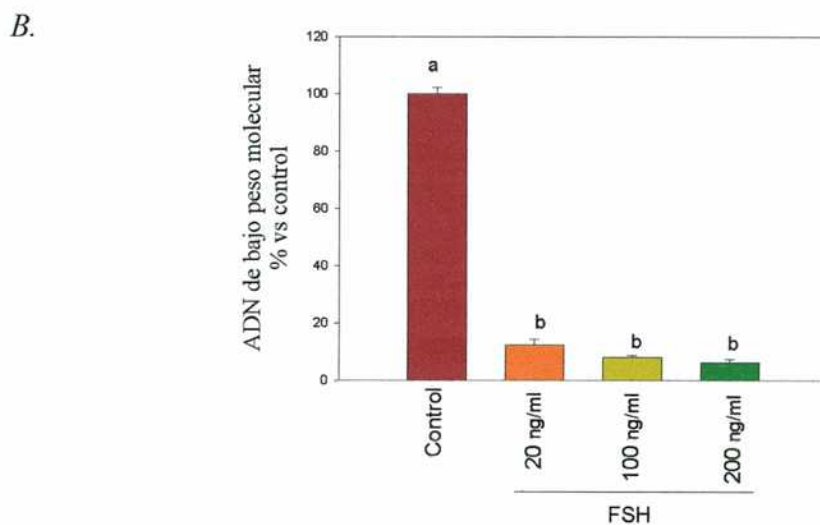
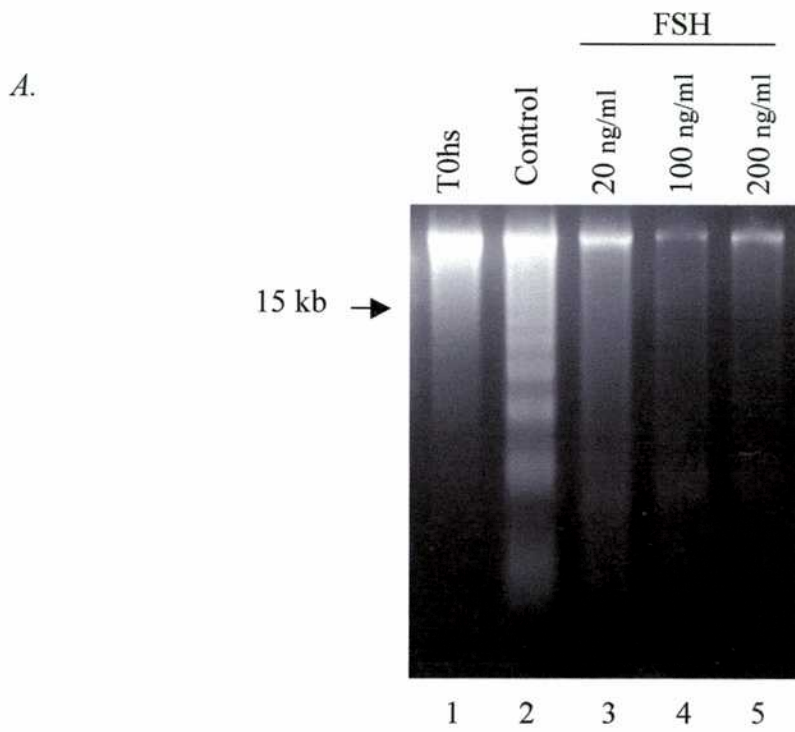


Figura 20. Efecto supresor de FSH en la fragmentación de ADN en folículos antrales tempranos. Panel A: Gel de agarosa mostrando la fragmentación de ADN. Panel B: Análisis densitométrico del clivaje de ADN (<15 kb). Los animales se inyectaron subcutáneamente cada 24 hs durante 3 días con DES (1 mg/rata). Los folículos antrales tempranos se aislaron y se cultivaron por 24 hs en medio libre de suero en presencia o ausencia de FSH (20-200 ng/ml). 4µg de ADN folicular extraído de cada cultivo se analizó por tinción con bromuro de etidio. El ADN de bajo peso molecular (<15 kb) se analizó para determinar la fragmentación apoptótica. Los valores obtenidos por densitometría se expresan como porcentajes referidos a los folículos colectados luego de 24 hs de incubación en ausencia de FSH. Los datos representan el promedio ± SEM de tres corridas de geles de experimentos independientes. Las barras con diferentes supraíndices son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

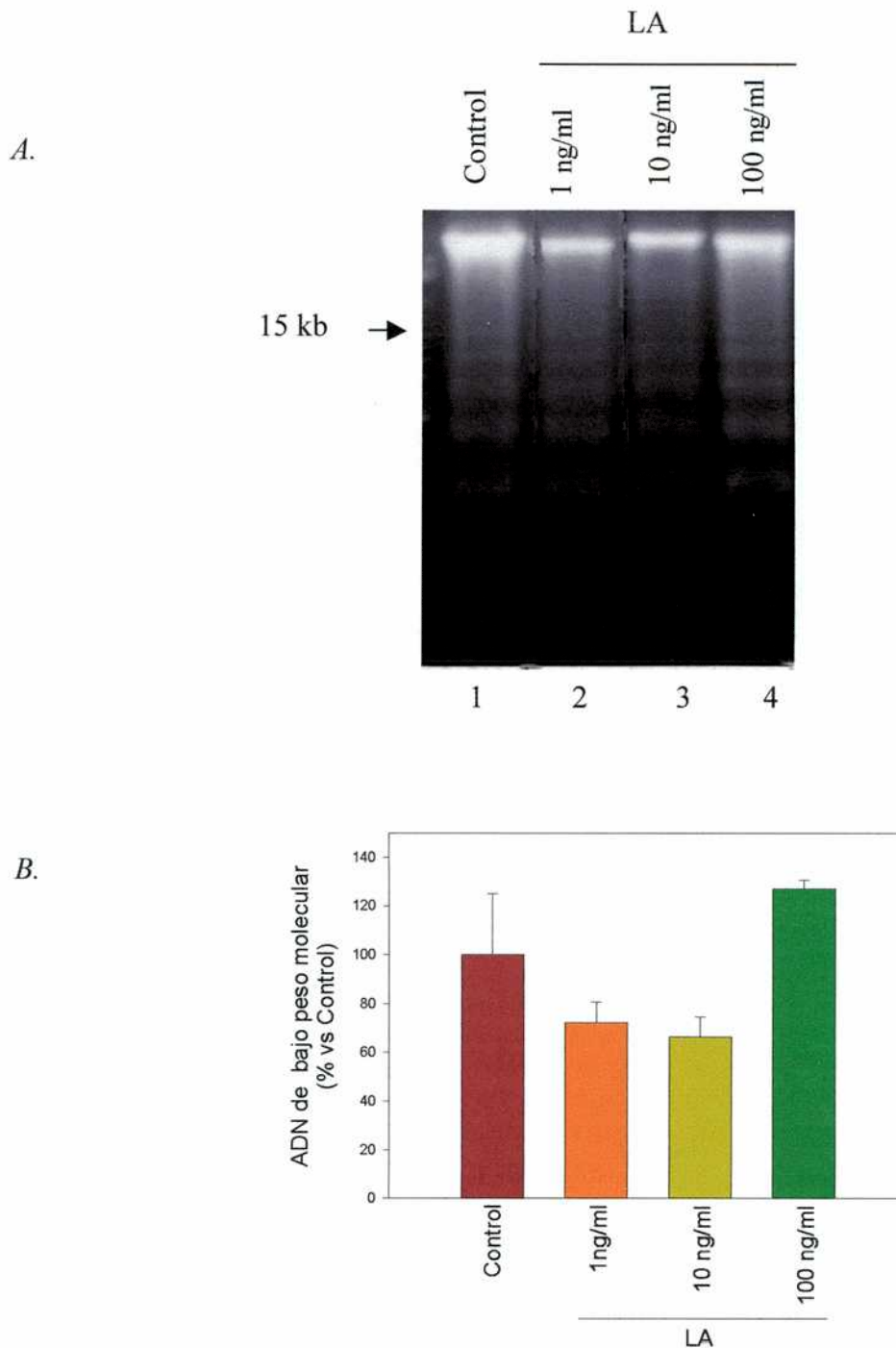
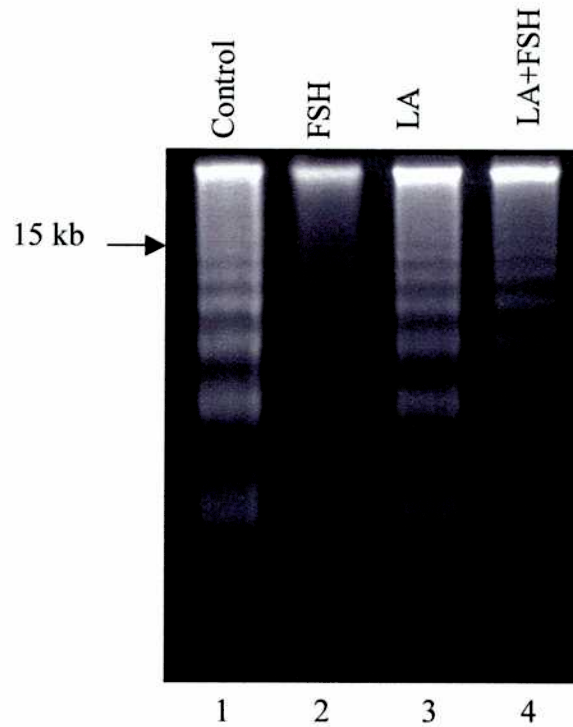


Figura 21. Efecto de LA en la fragmentación de ADN en folículos antrales tempranos. Panel A: Gel de agarosa mostrando la fragmentación de ADN. Panel B: Análisis densitométrico del clivaje de ADN (<15 kb). Los folículos antrales tempranos se aislaron y se cultivaron por 24 hs en medio libre de suero en presencia o ausencia de LA (1-100 ng/ml). 4 μ g de ADN folicular extraídos de cada cultivo se analizaron por tinción con bromuro de etidio. El ADN de bajo peso molecular (<15 kb) se analizó para determinar la fragmentación apoptótica. Los valores obtenidos por densitometría se expresan como porcentajes referidos a los folículos colectados luego de 24 hs de incubación en ausencia de LA. Los datos representan el promedio \pm SEM de tres corridas de geles de experimentos independientes. Las barras con diferentes supraíndices son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

A.



B.

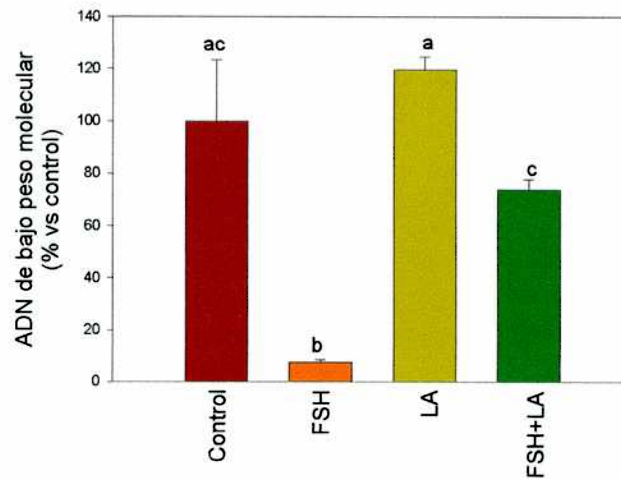
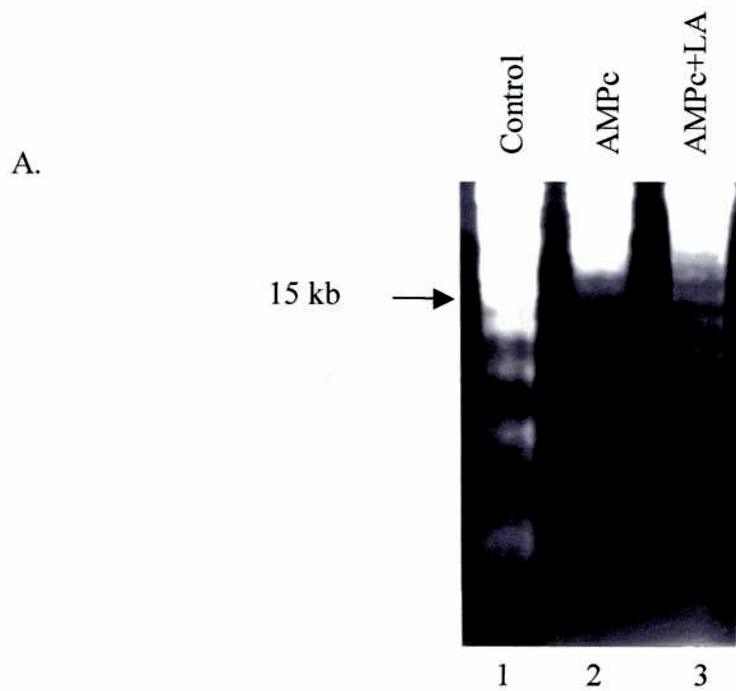


Figura 22. Efecto *in vitro* de LA en la inhibición de la apoptosis espontánea por FSH. Panel A: Gel de agarosa mostrando la fragmentación de ADN. Panel B: Análisis densitométrico del clivaje de ADN (<15 kb). Los folículos antrales tempranos se aislaron y se cultivaron por 24 hs en medio libre de suero en presencia o ausencia de LA (1-100 ng/ml). 4 µg de ADN folicular extraídos de cada cultivo se analizaron por tinción con bromuro de etidio. Los valores obtenidos por densitometría se expresaron como porcentajes referidos a los folículos colectados luego de 24 hs de incubación en ausencia de LA. Los datos representan el promedio ± SEM de tres corridas de geles de experimentos independientes. Las barras con diferentes supraíndices son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Para más detalles ver Figura 20.



B.

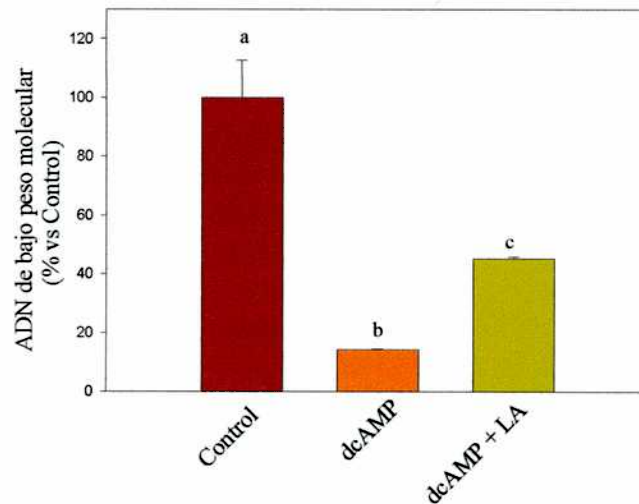


Figura 23. Efecto *in vitro* de LA en la inhibición de la apoptosis espontánea por AMPc. Panel A: Gel de agarosa mostrando la fragmentación de ADN. Panel B: Análisis densitométrico del clivaje de ADN (<15 kb). Los folículos antrales tempranos se aislaron y se cultivaron por 24 hs en medio libre de suero en presencia o ausencia de AMPc (1 mM) y/o LA (100ng/ml). 4µg de ADN folicular extraído de cada cultivo se analizaron por tinción con bromuro de etidio. El ADN de bajo peso molecular (<15 kb) se analizó para determinar la fragmentación apoptótica. Los valores obtenidos por densitometría se expresan como porcentajes referidos a los folículos colectados luego de 24 hs de incubación en ausencia de LA y AMPc. Los datos representan el promedio ± SEM de tres corridas de gels de experimentos independientes. Las barras con diferentes supraíndices son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Para más detalles ver Figura 20.

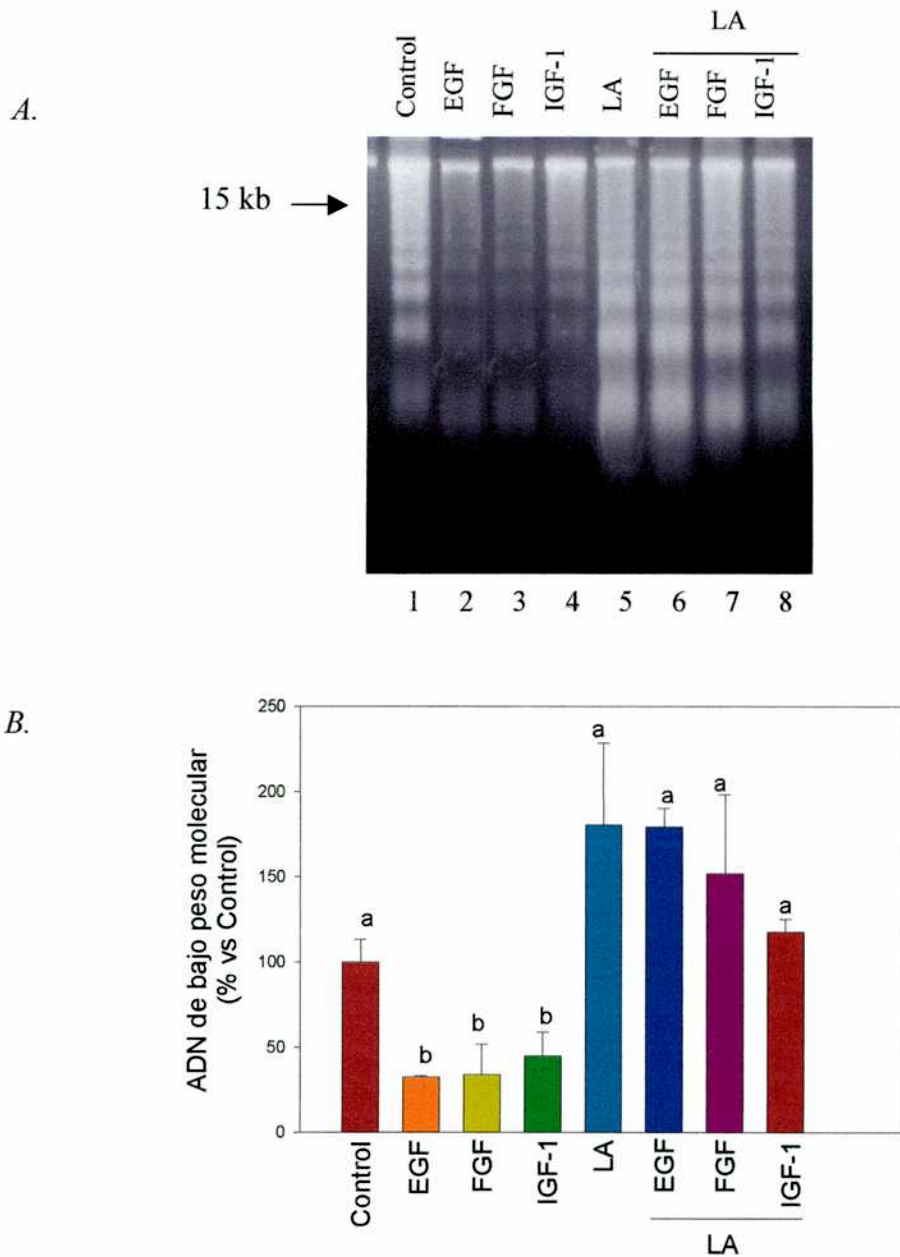


Figura 24. Efecto supresor de LA en el rescate de los factores de crecimiento de la apoptosis en folículos antrales tempranos. Panel A: Gel de agarosa mostrando la fragmentación de ADN. Panel B: Análisis densitométrico del clivaje de ADN (<15 kb). Los folículos antrales tempranos se aislaron y se cultivaron por 24 hs en medio libre de suero con factores de crecimiento (EGF: 1 μ g/ml, IGF-1: 1 μ g/ml, FGF: 1 μ g/ml) en presencia o ausencia de LA (100ng/ml). 4 μ g de ADN folicular extraídos de cada cultivo se analizaron por tinción con bromuro de etidio. El ADN de bajo peso molecular (<15 kb) se analizó para determinar la fragmentación apoptótica. Los valores obtenidos por densitometría se expresan como porcentajes referidos a los folículos colectados luego de 24 hs de incubación en medio libre de suero. Los datos representan el promedio \pm SEM de tres corridas de gels de experimentos independientes. Las barras con diferentes supraíndices son significativamente diferentes ($p < 0,05$). Para más detalles ver Figura 20.

También, se evaluó el efecto de los factores de crecimiento en la fragmentación de ADN en presencia o ausencia de LA (*Figura 24*). Los folículos se cultivaron durante 24 hs con distintas dosis de EGF, FGF y IGF-1 y mostraron la máxima inhibición de la apoptosis a una concentración de 1µg/ml (68, 66 y 55%, respectivamente, $p < 0,05$). Sin embargo, la presencia de LA (100ng/ml) en el medio de cultivo previno este efecto.

Estos resultados son los primeros en demostrar que, en folículos antrales tempranos, el tratamiento *in vitro* con LA interfiere en la prevención de la apoptosis mediada por FSH y factores de crecimiento.

5. Efecto in vitro de LA sobre la producción de esteroides en folículos antrales tempranos

Además, se estudió el efecto *in vitro* de LA (100 ng/ml) sobre la esteroidogénesis en folículos antrales tempranos aislados por microdissección. Se incubaron 8 folículos/eppendorf en 0.5 ml de medio de cultivo durante 24 hs. Para la medición de estradiol se agregó como sustrato androstenediona. Con la técnica utilizada no se observaron niveles detectables de estradiol, por lo cual se aumentó el número de folículos por ensayo y el tiempo de incubación; pero a pesar de las modificaciones no se obtuvieron resultados medibles. Por otro lado, el LA no modificó la producción de progesterona ($C=42,5 \pm 1,8$, $LA=46,3 \pm 0,81$ ng/ml). Actualmente, se están realizando ensayos para medir estos esteroides en tejido ovárico.

DISCUSSION

Originalmente se describió a la hormona liberadora de gonadotropinas, GnRH, como un péptido hipotalámico que actuaba en los gonadotropos, sin embargo en los últimos años se ha demostrado que esta hormona tiene efectos directos en el ovario, placenta, mama y testículo (Fraser y col., 1986; Guerrero y col., 1993; Erickson y col., 1994). La GnRH y sus agonistas inhiben algunos de los efectos de FSH asociados a la maduración folicular, incluyendo estimulación de la actividad de la aromataza, inducción del receptor de LH y biosíntesis de progesterona (Jones and Hsueh, 1981; Knecht y col, 1982; Hsueh y col., 1984; Srisvastava y col, 1994; Ortmann and Diedrich, 1999). Como las gonadotropinas promueven el desarrollo folicular y GnRH antagoniza muchas de las acciones de las gonadotropinas, se ha sugerido que la GnRH actuaría como un factor atretogénico de los folículos ováricos.

Los agonistas de GnRH se utilizan frecuentemente en tratamientos de infertilidad humana y en enfermedades como pubertad precoz, endometriosis y miomatosis. Estos agonistas reducen la secreción endógena de las gonadotropinas por un mecanismo de “down-regulation”. En ciclos de hiperestimulación ovárica en pacientes que se someten a fertilización asistida, se administran estos análogos junto con las gonadotropinas para inhibir el pico endógeno de LH y mejorar el reclutamiento folicular. Sin embargo, se requieren altas dosis de gonadotropinas (hMG, gonadotropina menopáusica humana o FSH humana recombinante) cuando se administra el agonista, comparado a la estimulación realizada sólo con gonadotropinas (Horvath y col., 1988; Lewinthal y col., 1988; Akman y col., 2000; Ye y col., 2001). Esta disminución en la sensibilidad a gonadotropinas es probable que se deba a un efecto directo del agonista sobre el desarrollo folicular. Trabajos clásicos realizados por Catt y colaboradores (1979) demuestran que la GnRH y sus agonistas inhiben el aumento de peso de ovario y útero observado luego de la administración de hCG a ratas hipofisectomizadas, e inhibe la esteroidogénesis estimulada por FSH en células de granulosa en cultivo. Posteriormente se describió una inhibición de receptores de LH en cuerpo lúteo de rata luego del tratamiento con GnRH (Ranta y col., 1982). En nuestro laboratorio se demostró (Guerrero y col., 1993) que el agregado de GnRH-a a cultivos de células de granulosa humana inhibe el aumento de receptores de LH observados luego de 48 hs de cultivo y produce una disminución de la actividad de

aromatasa. Además, en este trabajo, en estudios comparativos realizados en ratas se describieron resultados similares a los descritos en células humanas.

Estos antecedentes nos llevaron a postular que la baja respuesta a las gonadotrofinas observada en pacientes sometidas a hiperestimulación ovárica, se debería a un efecto inhibitorio del agonista sobre algunas funciones del ovario y que dicho efecto estaría en parte mediado por apoptosis.

Para probar ésto se realizaron los experimentos descritos en esta Tesis de cuyos resultados se obtuvieron las siguientes conclusiones:

Los estudios de morfología ovárica permitieron realizar un recuento de folículos en distintos estadios de maduración en ovarios provenientes del grupo Control y del grupo tratado *in vivo* con el agonista de GnRH: acetato de leuprolide, LA. Luego del análisis histológico se observó un efecto inhibitorio de LA sobre el desarrollo folicular inducido por PMSG. Después de 48 hs. de tratamiento con LA, hubo un mayor número de folículos preantrales y atrésicos comparado al Control. En cambio, el número de folículos antrales fue menor. Estos resultados sugerirían que LA estaría interfiriendo en el reclutamiento folicular, causando una disminución del número de folículos reclutados por las gonadotrofinas o bien llevando a la atresia a un mayor número de los mismos.

Además, trabajos realizados en nuestro laboratorio (Andreu y col., 1998), demostraron en ratas tratadas con PMSG que a tiempos más largos de tratamiento con el análogo (7 días), y con estimulación adicional con hCG, el número de cuerpos lúteos disminuía significativamente en el grupo LA comparado al grupo Control. Estos resultados indicarían que como consecuencia del tratamiento con LA, existiría un menor número de folículos rescatados debido a un aumento en la atresia folicular (como se describe en esta Tesis luego de 48 hs de tratamiento con PMSG+LA), y por consiguiente, luego de desencadenar la ovulación y luteinización con el estímulo de hCG, disminuye el número de cuerpos lúteos presentes en el ovario.

El análisis inmunohistoquímico de la fragmentación de ADN en el núcleo reveló que el tratamiento con LA causa un aumento en el porcentaje de células apoptóticas tanto en folículos preantrales como en antrales. En todos los folículos analizados, la apoptosis estuvo confinada a las células de granulosa. Esta característica de las células

de granulosa de rata parece ser especie específica, debido a que se han encontrado núcleos picnóticos en células tecales de folículos atrésicos en oveja pero no en rata o hamster (Hubbard and Greenwald, 1985). Estos resultados sugerirían que el efecto de LA en el reclutamiento o atresia folicular estaría mediado por la apoptosis. Es decir, en nuestro modelo experimental, donde se administran altas dosis de PMSG, existiría un acción directa del agonista sobre el ovario, interfiriendo en el desarrollo folicular estimulado por las gonadotrofinas. Sin embargo, no se puede descartar un efecto indirecto del análogo a nivel de la hipófisis, modificando la secreción endógena de gonadotrofinas.

El cultivo de folículos en medio libre de suero es un buen modelo para estudiar los factores hormonales y los mecanismos de segundos mensajeros que regulan la apoptosis y la atresia folicular. Es decir, este modelo permite determinar los factores involucrados en el rescate de la atresia y posee la ventaja de conservar la integridad del folículo.

Los estudios realizados en geles de agarosa demostraron ausencia de fragmentación apoptótica de ADN en folículos preovulatorios sin incubar en contraste con los folículos incubados durante 24 hs. Las causas de la apoptosis espontánea que ocurre durante el cultivo folicular se podría deber a los altos niveles de endonucleasas y cationes como el calcio y el magnesio. Zelennick y col. (1989) demostraron que altas concentraciones de estos factores activarían a las endonucleasas y éstas degradarían al ADN. Por otro lado, la ausencia de suero, con sus factores tróficos, acelerarían este proceso.

El tratamiento *in vivo* con el agonista de GnRH provocó un aumento en la apoptosis espontánea en los folículos preovulatorios. Estos resultados demuestran que el tratamiento con LA sensibiliza a las células de granulosa a la apoptosis. Además, es posible que la acción del agonista de GnRH sobre las endonucleasas dependientes de Ca^{2+}/Mg^{2+} sea mediada por un mecanismo dependiente de Ca^{2+} , debido a que se ha demostrado que GnRH aumenta los niveles de Ca^{2+} intracelular y el “turnover” de fosfatidilinositol (Wang y col., 1992; Naor y Llavín, 1982). El mecanismo de acción de este péptido incluye, como en las células pituitarias, la activación de receptores de GnRH en células ováricas y la asociación con la proteína G, activación de fosfolipasa

C, liberación de diacilglicerol (DAG) e inositol fosfato (IP₃) y posterior activación de la PKC (Stojkovic y col., 1994; Leung y col., 1992). Sin embargo, existen otros mecanismos alternativos para la acción de GnRH en el ovario (Chamson-Reig y col., 1999). Se ha demostrado que causa acumulación de ácido araquidónico en células ováricas a través de la estimulación de PLC o fosfolipasa A₂ (PLA₂) (Minegishi and Leung, 1985). Además, se ha sugerido que el ácido araquidónico inducido por PLA₂ aumenta los niveles de progesterona en células de granulosa de rata (Wang and Leung, 1988). También, se ha observado que GnRH activa a la fosfolipasa D (PLD) aumentando al ácido fosfatídico. (Liscovitch y col., 1989).

Tilly y col. (1992) mostraron que en cultivo de folículos preovulatorios en medio libre de suero, la apoptosis espontánea es inhibida por EGF/TGF α y que este efecto es bloqueado completamente por un inhibidor de la actividad de tirosina kinasa. En esta Tesis, se demuestra que el tratamiento *in vitro* de los folículos con EGF suprime el clivaje de ADN apoptótico tanto en los folículos Control como los tratados con LA, lo cual confiere al EGF, como ya hemos mencionado, un importante rol protector de la apoptosis ovárica. Sin embargo, el efecto supresor de EGF no es total, sugiriendo la participación de otros factores responsables de la sobrevivencia folicular. Además, el mecanismo por el cual EGF es capaz de revertir el proceso irreversible de la apoptosis queda aún por ser dilucidado. Una posible explicación podría ser que los folículos provenientes de ratas tratadas con el agonista estarían en un estadio temprano de la atresia (como se demostró mediante la medición de fragmentación de ADN por la técnica de TUNEL y por geles de agarosa en folículos saludables). Esta condición estaría favorecida en un medio libre de suero, pero la presencia de EGF tendría un efecto protector de este proceso. Por lo tanto, estos resultados son novedales debido a que es el primer estudio en demostrar que el efecto *in vivo* de GnRH-a produce un aumento de la apoptosis en los folículos preovulatorios provenientes de ratas tratadas con PMSG y que este efecto es revertido parcialmente *in vitro* por EGF.

Los miembros de la familia de genes de bcl-2 son reguladores claves de la apoptosis. Estos pueden sostener la sobrevivencia celular (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w) o promover la muerte celular (Bax, Bcl-xS, Bak, Bad). Estas proteínas interactúan entre ellas formando homo- y heterodímeros; y su abundancia relativa en un tipo de célula determina su destino celular, muerte o sobrevivencia. Tilly y col. (1995) demostraron que

la inhibición de la apoptosis en células de granulosa y de la atresia folicular dada por las gonadotropinas se correlacionaba con la habilidad de estas hormonas para reducir la expresión de Bax, provocando un cambio en el balance de esta proteína con los niveles constitutivos de Bcl-2 y Bcl-xL. Además, Papadopoulos y col. (1999), correlacionaron la apoptosis producida por un agonista de GnRH en cuerpo lúteo de ratas preñadas con cambios en la expresión de algunos miembros de la familia de Bcl-2.

En nuestro modelo experimental, para correlacionar el efecto estimulador de la apoptosis dado por LA en ovario de rata con la estabilidad de las proteínas pro- o antiapoptóticas, se estudiaron los niveles de las proteínas Bax, Bcl-x y Bcl-2 en folículos preovulatorios.

Se pudo observar que los niveles de Bcl-2 se mantienen constantes en folículos preovulatorios sin incubar provenientes del grupo Control y LA. En cambio, cuando los folículos de ambos grupos se incubaron 1, 2 y 5 hs, no se observó la presencia de la proteína. Los niveles de la proteína Bax en los extractos proteicos provenientes del grupo Control y LA varían similarmente a lo largo de los tiempos estudiados. Trabajos previos mostraron una correlación positiva entre los niveles aumentados de RNAm de Bax y la apoptosis en células de granulosa de rata (Tilly y col, 1995). A pesar de que en esta Tesis no se detectaron diferencias significativas respecto a los niveles de la proteína Bax en el grupo Control respecto al grupo LA, no se puede descartar un posible rol de esta proteína en la apoptosis de las células de granulosa.

Con respecto a las isoformas de Bcl-x, se pudo observar que la relación entre Bcl-xL y Bcl-xS disminuye significativamente en los folículos provenientes de ratas tratadas con LA, sugiriendo que la estabilidad de la isoforma Bcl-xL (antiapoptótica) es menor comparada al grupo Control. Estos resultados sugerirían que el efecto apoptótico de LA se correlaciona con un desbalance en el cociente de ciertas proteínas antiapoptóticas/proapoptóticas como se observa entre las isoformas de Bcl-x. Por lo tanto, el análogo de GnRH disminuiría la estabilidad de la isoforma antiapoptótica (Bcl-xL), favoreciendo la cascada de eventos que conducen a la atresia folicular dada por apoptosis.

Estos cambios observados en Bcl-x, es decir, la disminución del cociente entre Bcl-xL/Bcl-xS después del tratamiento con GnRH-a, son completamente nuevos.

Estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio han demostrado la inmunolocalización de la proteína Bax y Bcl-2 en folículos preovulatorios de ratas superovuladas. Se observó que Bax se localiza principalmente en el citoplasma de las células de granulosa peri-antrales más que en las células de granulosa próximas a la lámina basal; en cambio, en células de la teca la señal para Bax es leve. Por otro lado, Bcl-2 se localiza en forma dispersa en células de granulosa y más fuertemente en células de la teca.

Como se ha descrito, los cambios a nivel mitocondrial son importantes en la apoptosis ovárica y se podría hablar de un modelo que consiste en tres pasos. El primer paso involucraría eventos “premitocondriales” donde ocurren mecanismos de transducción de señales que activan a proteínas de la familia de Bcl-2. El segundo paso sería una fase “mitocondrial” que provoca un desequilibrio homeostático en la mitocondria resultante de la liberación de proteínas que activan a caspasas. Por último, existiría una fase “postmitocondrial” durante la cual las proteínas liberadas activan a Apaf-1 y a caspasa-9. Este complejo denominado *apoptosoma* dispara una cascada de activaciones de otras caspasas (caspasa-3, caspasa-6) que llevan a la activación de las endonucleasas que clivan al ADN. Flaws y col. (1995), demostraron que los niveles de ARNm de las proteasas tipo-ICE (IRPs) se encuentran disminuidos en ovario de rata inmadura luego del tratamiento *in vivo* con gonadotrofinas. Actualmente, en el laboratorio se están llevando a cabo estudios para dilucidar el efecto de caspasa-3 en ratas Control y tratadas con el agonista de GnRH.

Los estudios sobre esteroidogénesis revelaron que los niveles de progesterona sérica no varían significativamente entre ratas prepúberes inyectadas con PMSG o con PMSG y LA. Sin embargo, existen altos niveles de progesterona, tanto en ovario entero como en folículos ováricos aislados del grupo tratado con el agonista de GnRH.

En cambio, los niveles de estradiol sérico se encuentran significativamente disminuidos en el grupo tratado con LA. La disminución de estrógenos se correlacionan con los resultados obtenidos por histología ovárica donde se muestra un menor desarrollo folicular luego del tratamiento con el agonista. Es decir, se observa un menor número de folículos antrales (los mayores productores de estrógenos) y un mayor número de folículos preantrales y atresicos en el grupo tratado con LA. Esto

explicaría los bajos niveles séricos de estradiol observados. Además, los resultados altos de progesterona endógena, indican que si bien el grupo tratado con el análogo posee en algún punto una actividad esteroideogénica aumentada, esto se modifica en algún paso posterior, debido a que la progesterona sérica no se ve alterada y los niveles circulantes de estradiol son menores en aquellos animales tratados con LA. Esto sugeriría un bloqueo o transformación a otro metabolito en algún paso de la síntesis de esteroides. Nuestros resultados están de acuerdo con las observaciones reportadas por Takekida y col. (2000), que demuestran que el agonista de GnRH provoca menores niveles de estradiol secretados y un aumento de la apoptosis en cultivos de células de granulosa porcina.

La regulación hormonal de la síntesis de esteroides en forma aguda ó en forma crónica, es mediada por AMPc. El efecto agudo consiste en 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 esteroideogénicas.

La regulación de la esteroideogénesis en presencia del complejo P450scc está determinada por la proteína StAR (*Proteína reguladora de la esteroideogénesis aguda*). Además, se sabe que la expresión de la enzima P450scc aumenta significativamente bajo la acción de ciertos estímulos como PMSG (Zlotkin y col., 1986) y la proteína StAR se expresa de forma variable de acuerdo al momento y estímulos bajo los cuales se encuentra el desarrollo folicular (Ronen-Fuhrmann y col., 1998). Los resultados de esta Tesis muestran que los niveles de la enzima P450 scc no cambian significativamente en folículos preovulatorios provenientes de ratas superovuladas tratadas con LA durante 48 hs. Debido a las evidencias acerca de la expresión diferencial de la proteína StAR en el desarrollo folicular (Ronen-Fuhrmann y col., 1998) y su importancia en la esteroideogénesis como reguladora de un paso clave en este proceso, se estudió el efecto del análogo de GnRH sobre la proteína mencionada. Los resultados mostraron un aumento del contenido de StAR en los folículos preovulatorios en aquellos animales tratados con LA durante 48hs. Estos datos se correlacionan con los ya mencionados altos niveles de progesterona tisular encontrados en este grupo.

Ronen-Fuhrmann y col. (1998) demostraron en ratas prepúberes superovuladas y tratadas con hCG (gonadotrofina coriónica humana) que la expresión de la proteína StAR ocurría en forma bifásica. El primer pico aparece luego de la administración de PMSG y duraba 24 hs y la expresión de la proteína ocurría predominantemente en tejido intersticial no folicular.

En cambio, el segundo pico se observó luego del tratamiento con hCG a ratas estimuladas con PMSG durante 48 hs y la expresión de la proteína se generaba en células de granulosa y de teca en folículos dominantes. Estos mismos autores demostraron que los niveles de P450 scc difieren de los niveles observados en la proteína StAR. Luego de la primera hora de la administración de PMSG, existe un nivel basal de la proteína P450 scc; seguido de un aumento de 2,5 veces luego de 48 hs y un aumento final luego de la inyección de hCG.

Para evaluar el efecto agudo del análogo de GnRH sobre la expresión de la enzima P450 scc y la proteína StAR en el ovario, se administró una sola dosis de LA (2 µg/rata) a ratas superovuladas con PMSG. Se pudo observar que los niveles proteicos de P450 scc no varían significativamente entre el grupo Control y el tratado con LA. En cambio, el contenido de StAR aumenta temporalmente en el grupo tratado con el agonista comparado al Control. Lo que corrobora que los altos niveles de progesterona endógena observados se correlaciona con un aumento en los niveles de proteína StAR. Estos resultados se relacionan con trabajos realizados previamente (Hillensjo y col., 1982) donde se muestra que el efecto agudo de agonistas de GnRH causa aumento de la progesterona tisular y de la prostanglandina E.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta tesis, en el contenido de P450scc y StAR (P450 scc: los niveles de proteína no varían en el grupo tratado con GnRH-a; StAR: los niveles de proteína aumentan en el grupo tratado con el agonista) en los folículos antrales, se puede observar que el efecto de los agonistas de GnRH es distinto cuando se lo compara a estudios realizados en cuerpo lúteo. Trabajos realizados previamente (Sridaran y col., 1999; Srivastava y col., 1994) demuestran que el tratamiento *in vivo* con GnRH-a actúa sobre el cuerpo lúteo, disminuyendo la síntesis y liberación de progesterona y por consiguiente, interrumpe la preñez en la rata. Además, muestran que GnRH-a disminuye los niveles de StAR, P450 scc y 3beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa, lo que conduce a una esteroidogénesis reducida a nivel luteal.

También, en nuestro laboratorio se describió (Andreu y col. 1998) una disminución en el contenido de la enzima P450 scc mitocondrial en cuerpo lúteo de ratas superovuladas tratadas con GnRH-a. Smith y col. (1991) demuestran en ratas preñadas tratadas con GnRH-a niveles disminuidos de progesterona y P450 scc luteal. Por lo tanto, los agonistas de GnRH generarían distintas respuestas (disminución de P450scc y StAR en células luteales, y sin cambios en la P450scc pero con aumento de la StAR en células foliculares) dependiendo del estadio de diferenciación alcanzado. Es decir, las células luteales adquirirían características nuevas cuando se diferencian a partir de las células foliculares (granulosa o teca), permitiendo que se manifiesten respuestas diversas frente al mismo estímulo.

Se realizaron estudios para investigar el efecto *in vitro* de LA sobre cultivos de folículos preovulatorios en ausencia o presencia de EGF y otros factores de crecimiento como FGF y IGF-1. El EGF previene la apoptosis espontánea que sufren los folículos incubados en medio libre de suero, lo que confirma estudios previos (Tilly y col., 1992). Los folículos incubados con el agonista durante 24 hs mostraron un aumento significativo en la apoptosis comparado con el Control. Cuando se realizó la coincubación de los folículos con LA y EGF, se observó que el efecto de LA era suprimido parcialmente por el factor de crecimiento. Esto confiere a este factor de crecimiento, como se describió anteriormente en esta Tesis, una importante función en el desarrollo folicular. Los factores de crecimiento, IGF-1 y FGF, no rescatan a los folículos preovulatorios Control (incubados en ausencia de LA) de sufrir apoptosis espontánea. Tilly y col. (1992) demuestran el efecto supresor de FGF en la apoptosis espontánea en medio libre de suero. Estos ensayos se realizaron por marcación de ADN con dideoxinucleótidos de ATP unidos a P³². Es probable que nuestro modelo de aislamiento y detección de ADN no sea lo suficientemente sensible para detectar el efecto supresor de FGF sobre la apoptosis espontánea. Por otro lado, los resultados reportados acerca de la acción de IGF-1 en la inhibición de la apoptosis son contradictorios, en uno se describe una inhibición de la apoptosis espontánea (Tilly y col., 1992), mientras que en el otro se reporta la falta de efecto (Chun y col., 1994), con lo cual éste último estaría de acuerdo con nuestros resultados. Sin embargo, nuestros datos muestran que estos factores de crecimiento fueron capaces de inhibir completamente el efecto estimulador de la apoptosis inducida por el agregado *in*

in vitro de LA. El hecho que en folículos Control no vemos este efecto, sugeriría que el agregado *in vitro* de LA aumenta la apoptosis por un mecanismo distinto, en el que intervienen otros factores sensibles a la acción de FGF e IGF-I.

Aunque la atresia ocurre en todos los estadios del desarrollo folicular, se ha demostrado que los folículos antrales tempranos son más sensibles a la muerte celular programada (Hirshfield y col., 1978; Hirshfield y col., 1991; Chun y col., 1996).

Para determinar los efectos *in vitro* de GnRH-a en la apoptosis de folículos antrales tempranos, se evaluó el efecto del agonista y su interacción con FSH, AMPc y factores de crecimiento (IGF-1, EGF y FGF) en ratas prepúberes tratadas con DES.

Trabajos previos (Karnitis y col., 1994; Selvaraj y col., 1994) demostraron que FSH es el factor primario responsable del mantenimiento de la sobrevivencia de las células de granulosa en folículos maduros. En monas deficientes de LH, ya sea por tratamiento con antagonista de GnRH o con anticuerpos para LH, se ha observado que FSH es capaz de mantener el crecimiento folicular. Otra evidencia convincente de un efecto directo inhibitorio de la apoptosis por FSH es el trabajo realizado por Tilly y col. (1992 y 1995) donde una simple dosis de PMSG en roedores prepúberes es capaz de suprimir la apoptosis en células de granulosa y la atresia en folículos antrales.

En esta Tesis, los resultados mostraron apoptosis espontánea en los folículos cultivados en un medio libre de suero en ausencia de hormonas durante 24 hs. Por otro lado, no se observó clivaje de ADN en folículos antrales tempranos frescos (sin incubar), al igual que lo observado en folículos preovulatorios. La presencia de FSH en el medio de incubación suprimió la apoptosis espontánea, aunque no existen diferencias en la fragmentación apoptótica de ADN entre el tratamiento *in vitro* de LA respecto al Control. Sin embargo, FSH sólo suprime parcialmente la apoptosis inducida por el agonista. Estos resultados sugerirían la interacción de más de un factor actuando en el rescate de los folículos antrales tempranos inducido por FSH, donde LA tendría efecto negativo sobre alguno de ellos, conduciendo a que la FSH sólo en forma parcial inhiba la apoptosis.

Un análogo del segundo mensajero para FSH, dibutilil AMPc, inhibió parcialmente la fragmentación de ADN inducida por LA. Por otro lado, el tratamiento de los folículos con EGF, FGF e IGF-1 suprimieron la fragmentación espontánea de ADN, corroborando estudios anteriores (Chun y col., 1996). Pero en presencia del agonista,

los factores de crecimiento no son capaces de rescatar a los folículos de la apoptosis. Teniendo en cuenta las diferencias entre FSH y los factores de crecimiento respecto a la inhibición de la apoptosis estimulada por LA, se sugiere la existencia de un mecanismo complejo de transducción de señales para FSH en la prevención de la apoptosis, en el cual la gonadotropina utilizaría un mecanismo de supervivencia celular que incluye otras señales diferentes a las usadas por los factores de crecimiento. Por otro lado, el análogo de GnRH interferiría en el camino de señalización de FSH, AMPc y factores de crecimiento por un mecanismo aun no aclarado.

Como se mencionó, el agregado de FSH al medio de cultivo suprimió la apoptosis espontánea en folículos antrales tempranos (DES). En el caso de folículos preovulatorios, la gonadotropina *in vitro* no actuaría debido a la internalización de los receptores de FSH inducida por el tratamiento *in vivo* con PMSG.

A pesar de que varios estudios han demostrado que algunos efectos inhibitorios ováricos provocados por el tratamiento *in vivo* de GnRH-a serían mediados por apoptosis (Billig y col., 1994; Papadopoulos y col., 1999), estos resultados demuestran por primera vez, que en folículos antrales tempranos, el tratamiento de LA *in vitro* interfiere con el mecanismo de prevención de la apoptosis dado por FSH y por los factores de crecimiento estudiados.

Considerando que FSH y los factores de crecimiento utilizan diferentes sistemas de segundos mensajeros (activación de la proteína quinasa A o actividad intrínseca de tirosina quinasa), se ha propuesto la presencia de distintas cascadas hormonales que regulan el desarrollo folicular (Hsueh y McGee, 2000). Además, nuestros resultados, que describen la inhibición mediada por GnRH-a en la prevención de la apoptosis dada por FSH y los factores de crecimiento, sugeriría que el efecto de GnRH sería distal a la cascada de eventos que conducen a la apoptosis.

En conclusión, GnRH-a sería un modulador intraovárico que interfiere en el desarrollo folicular, aumentando el número de folículos atrésicos y alterando la esteroidogénesis ovárica. GnRH-a induciría apoptosis en células de granulosa, alterando los mecanismos de rescate folicular producidos por las gonadotropinas y por ciertos factores de crecimiento, provocando un desbalance entre los miembros de

Bcl-2 que desembocaría en la activación de la cascada de eventos que lleva a la apoptosis folicular.

CONCLUSIONES GENERALES

Tratamiento con el agonista de GnRH (LA) a ratas superovuladas

* El agonista de GnRH (LA) produce un efecto *directo* inhibitorio sobre el desarrollo folicular, causando una disminución del número de folículos reclutados por las gonadotrofinas o bien llevando a la atresia a un mayor número de los mismos.

* Tanto el efecto *in vivo* como *in vitro* de LA produce un aumento de la apoptosis en los folículos preovulatorios provenientes de ratas tratadas con PMSG y este efecto es revertido parcialmente *in vitro* por EGF.

* El IGF-1 y el FGF fueron capaces de inhibir completamente el efecto estimulador de la apoptosis inducida por el agregado *in vitro* de LA. El hecho que en folículos Control no se observe este efecto, sugeriría que el agregado *in vitro* de LA aumenta la apoptosis por un mecanismo distinto, en el que intervienen otros factores sensibles a la acción de FGF e IGF-I.

* El efecto apoptótico de LA se correlaciona con un desbalance en el cociente de ciertas proteínas antiapoptóticas/proapoptóticas como se observa entre las isoformas de Bcl-x. LA disminuye la estabilidad de la isoforma antiapoptótica (Bcl-xL), favoreciendo la cascada de eventos que conducen a la atresia folicular dada por apoptosis.

* LA aumenta los niveles de progesterona tisular y disminuye los niveles de estradiol sérico.

* LA no modifica los niveles de la enzima P450 scc pero aumenta el contenido de la StAR en folículos preovulatorios.

Tratamiento con el agonista de GnRH en folículos antrales tempranos provenientes de ratas administradas con DES

* FSH sólo suprime parcialmente la apoptosis inducida por el agonista. Estos resultados sugerirían la interacción de más de un factor actuando en el rescate de los folículos antrales tempranos inducido por FSH, donde LA tendría efecto negativo sobre alguno de ellos, conduciendo a que la FSH sólo en forma parcial inhiba la apoptosis.

* En presencia del agonista, los factores de crecimiento (EGF, FGF e IGF-1) no son capaces de rescatar a los folículos de la apoptosis. Teniendo en cuenta las diferencias entre FSH y los factores de crecimiento respecto a la inhibición de la apoptosis estimulada por LA, se sugiere la existencia de un mecanismo complejo de transducción de señales para FSH en la prevención de la apoptosis, en el cual la gonadotropina utilizaría un mecanismo de sobrevivencia celular que incluye otras señales diferentes a las usadas por los factores de crecimiento.

BIBLIOGRAFÍA

Adashi EY, Resnick CE, Svoboda ME, van Wyk JJ, Hascall VC, Yanagishita M. Independent and synergistic actions of somatomedin-C in the stimulation of proteoglycan biosynthesis by cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 118:456-8, 1986.

Adashi EY, Resnick CE, Hernandez ER, Hurwitz A, Rosenfeld RG. Follicle-stimulating hormone inhibits the constitutive release of insulin-like growth factor binding proteins by cultured rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 126: 1305-1307, 1990.

Akman MA, Erden HF, Tosun SB, Bayazit N, Aksoy E, Bahceci M. Addition of GnRH antagonist in cycles of poor responders undergoing IVF. *Hum Reprod.* 15:2145-7, 2000.

Aloi JA, Dalkin AC, Schwartz NB. Ovarian inhibin subunit gene expression: Regulation by gonadotropins and estradiol. *Endocrinology* 136:1227, 1995.

Anderson E, Little B. The ontogeny of the rat granulosa cell. pag. 203-225. En: Toft DO, Ryan RJ. (eds). *Proceedings of the Fifth Ovarian Workshop. Ovarian Workshops*, Champaign, IL, 1985.

Andreu C, Buscaglia C, Parborell F, Stein P, Tesone M. Regulation of ovarian follicle differentiation in gonadotropin-stimulated rats. *Endocrine* Vol 6, 2:1-7, 1997.

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. *Molecular Reproduction and Development* 51:287-294, 1998.

Araki S, Shimada Y, Kaji K, Hayashi H. Apoptosis of vascular endothelial cells by fibroblast growth factor deprivation. *Biochem Biophys Res Commun* 168:1194-1200, 1990.

Azzolin GC, Saiduddin S. Effect of androgens on the ovarian morphology of the hypophysectomized rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 172: 70-73, 1983.

Baffy G, Miyashita T, Williamson JR y Reed JC. Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production. *J Biol Chem* 268: 6511-6519, 1993.

Baker SJ, Spears N. The role of intra-ovarian interactions in the regulation of follicle dominance. *Hum Reprod Update* 5(2):153-65, 1999.

Banka CL, Erickson GF. Gonadotropin-releasing hormone induces classical meiotic maturation in subpopulations of atretic preantral follicles. *Endocrinology* 117(4):1500-7, 1985.

Barres BA, Hart IK, Cole HS, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, Raff MC. Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* 70:31-46, 1992.

Bauminger S, Liberman ME, Linder HR. Steroid-independent effect of gonadotropins on prostaglandin synthesis in rat Graafian follicles in vitro. *Prostaglandins* 9:753-64, 1975.

Beers WH, Strickland S, Reich E. Ovarian plasminogen activator: Relationship to ovulation and hormonal regulation. *Cell* 6: 387-394, 1975.

Behrman HR, Grinwich DL, Hichens M, MacDonald GJ. Effect of hypophysectomy, prolactin, and prostaglandin F2 alpha on gonadotropin binding in vivo and in vitro in the corpus luteum. *Endocrinology* 103:349-57, 1978.

Besman MJ, Yanagibashi K, Lee TD. Identification of DES (glycyl)-endozepine as an effector of corticotropin-dependent adrenal steroidogenesis: Stimulation of cholesterol

delivery is mediated by the peripheral benzodiazepine receptor. Proc natl Acad Sci USA 86:4897, 1989.

Billig H, Furuta I, Hsueh AJ. Gonadotropin releasing hormone (GnRH) directly induces apoptotic cell death in the rat ovary: biochemical and in situ detection of DNA fragmentation in granulosa cells. Endocrinology 134:245-252, 1994.

Billig H, Furuta I, Hsueh JW. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. Endocrinology 133:2204-2212, 1993.

Billig H, Thelander H, Rosberg S. Adenosine receptor-mediated effects by nonmetabolizable adenosine analogs in preovulatory rat granulosa cells: a putative local regulatory role of adenosine in the ovary. Endocrinology 122:52-61, 1988.

Birnbaumer L, Shalabi N, Rivier J, Vale W. Evidence for a physiological role of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) or GnRH-like material in the ovary. Endocrinology 116:1367-1270, 1985.

Bjersing L, Cajander S. Ovulation and the mechanism of follicle rupture IV: Ultrastructure of membrana granulosa of rabbit graafian follicles prior to induced ovulation. Cell Tissue Res 153: 1-300, 1974.

Block E. Quantitative morphological investigations of the follicular system in women. Acta Endocrinol (Copenh) 8:33-54, 1992.

Bloom, F. Tratado de Histología. Edit. Interamericana Mc Graw Hill. 1era edición, Capítulo 32, 859-907, 1986.

Braw RH, Tsafirri a. Effect of PMSG on follicular atresia in the rat ovary. J Reprod Fertil 59: 267-272, 1980.

Byskov AG, Hoyer PE. Embriology of the mammalian gonads and ducts. The Physiology of reproduction, Knobil E. y Neill J. Raven Press, Ltd. New York, 1988.

Caron MG, Goldstein S, Savard K, Marsh J. Protein kinase stimulation of a reconstituted cholesterol side chain cleavage enzyme system in the bovine corpus luteum. *J Biol Chem* 250: 5137-5143, 1975.

Carr BR. Disorders of the ovaries and female reproductive tract. 753-769. In: *Williams Textbook of Endocrinology*. Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR (eds.), 9th Edición, 1998.

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* 24: 105-113, 1981.

Celis ME. "Factores de crecimiento y oncogenes". *Fisiología Humana*. Tomo I, 1era edición, capítulo III, pág 47-69, 1998.

Chamson-Reig A, Pignataro O, Libertun C, Lux-Lantos V. Alterations in intracellular messengers mobilized by gonadotropin-releasing hormone in an experimental ovarian tumor. *Endocrinology* 140:3573-80, 1999.

Chanderbhan R, Noland BJ, Saclen TJ, Vahouny GV. Sterol carrier protein 2: delivery of cholesterol from adrenal lipid droplets to mitochondria for pregnenolone synthesis. *J Biol Chem* 257:8928, 1982.

Chang SC, Jones JD, Ellefson RD, Ryan RJ. The porcine ovarian follicle: I. Selected chemical analysis of follicular fluid at different developmental stages. *Biol Reprod*. 15(3):321-8, 1976.

Chegini N, Flanders KC. Presence of transforming growth factor beta and their selective cellular localization in human ovarian tissue of various reproductive stages. *Endocrinology* 130:1707, 1992.

Chun SY, Billig H, Tilly J, Furuta I, Tsafiri A, Hsueh AJW. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor-I. *Endocrinology* 135: 1845-1853, 1994.

Chun SY, Eisenhauer KM, Minami S.. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: Follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology* 137:1447, 1996.

Clarj BJ, Soo SC, caron KM. Hormonal and developmental regulation of yhe steroidogenic acute regulatory protein. *Mol Endocrinol* 9:1346, 1995.

Clark BJ, Soo SC, Caron KM, Ikeda Y, Parker KL, Stocco DM. Hormonal and developmental regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. *Mol Endocrinol.* 9(10):1346-55, 1995.

Clark MR. Stimulation of progesterone and prostaglandin E accumulation by luteinizing hormone-releasing (LHRH) and LHRH analogs in rat granulosa cells. *Endocrinology* 11:146, 1982.

Clayton RN, Harwood JP, Catt KJ. Gonadotropin-releasing hormone analogue binds to luteal cells and inhibits progesterone production. *Nature* 1;282(5734):90-2, 1979.

Clayton RN, Harwood JP, Catt KJ. Gonadotropin-releasing hormone analogue binds to luteal cells and inhibits progesterone production. *Nature* 282:90-92, 1979.

Colombo JA, Hilliard J, Sawyer CH. Serum estradiol and progesterone concentrations in ovariectomized estrogen- and progesterone-primed and PMS-hCG-treated rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 144(3):999-1001, 1973.

Corvin A, Bex FJ. Luteinizing hormone agonists induce ovulation in hypophysectomized proestrus rats:direct ovarian effect. *Life Sci* 29:185, 1981.

Councouvanis EC, Sherwood SW, Carswell-Crumpton C, Spack EG and JonesPP. Evidence that the mechanism of prenatal germ cell death in the mouse is apoptosis. *Experimental Cell Research* 209:238-247, 1993.

Daud AI, Bumpus FM, Husain A. Evidence for selective expression of angiotensin II receptors on atretic follicles in the rat ovary: an autoradiographic study. *Endocrinology* 122:2727-2734, 1988.

De Jong FH. Inhibin. *Physiol Rev.* 68(2):555-607, 1988.

Dhanasekaran N, Moudgal NR. Studies on follicle atresia: role of gonadotropins and gonadal steroids in regulating cathepsin-D activity of prevulatory follicles in the rat. *Endocrinology* 63:133-142, 1989.

Di Blasio AM, Vigano P, Cremonesi L. Expression of the genes encoding basic fibroblast growth factor and its receptor in human granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 96:7-11, 1993.

Dodson WC, Schomberg DW. The effect of transforming growth factor- β on follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 120:512, 1987.

Edwards RG. Follicular fluid. *J Reprod Fertil.* 37(1):189-219, 1974.

El-Roeiy A, Chen X, Roberts VJ. Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors (IGF-I and II), the IGF and insulin receptors, and IGF-binding proteins 1-6 and the localization of their gene products in normal and polycystic ovary syndrome ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 78:1488, 1994.

Enders AC. Cytology of the corpus luteum. *Biol Reprod.* 8(2):158-82, 1973.
Endocrinology 119(6):2809-20, 1986.

Erickson GF, Li D, Sadrkhanloo R, Liu XJ, Shimasaki S, Ling N. Extrapituitary actions of gonadotropin-releasing hormone: stimulation of insulin-like growth factor-binding protein-4 and atresia. *Endocrinology* 134(3):1365-72, 1994.

Erickson GF, Magoffin DA, Dyer CA, Hofeditz C. The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. *Endocr Rev* 6:371-399, 1985.

Erickson GF, Nakatani A, Ling N, Shimasaki S. Cyclic changes in insulin-like growth factor-binding protein-4 messenger ribonucleic acid in the rat ovary. *Endocrinology* 130: 625-636, 1992.

Espey LL. Ovarian proteolytic enzymes and ovulation. *Biol Reprod* 10: 216- 235, 1974.

Evans AC, Fortune JE. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology* 138:2963-2971, 1997.

Flaws JA, Kugu K, Trbovich AM, Tilly KI, DeSanti A, Hirshfield AN y Tilly JL. Interleukin-1 β -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* 136: 5042-5053, 1995.

Fortune JE, Armstrong DT. Androgen production by theca and granulosa isolated from proestrous rat follicles. *Endocrinology* 100(5):1341-7, 1977.

Fraser HM, Bouchard P. Control of the preovulatory luteinizing hormone surge by gonadotropin-releasing hormone antagonists. *TEM* 5:87-93, 1994.

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.*225:29-54, 1986.

Friedman AJ, Barbieri RL.. Acetato de Leuprolide: Aplicaciones en ginecología. *Patología habitual en obstetricia, ginecología y fertilidad* 11:9-12, 1988.

Geisthovel F, Moretti-Rojas I, Asch RH, Rojas FJ. Expression of insuline-like growth factor-II (IFG-II) messenger ribonucleic acid (mRNA), but not IGF-I mRNA, in human preovulatory granulosa cells. *Hum Reprod* 4:899, 1989.

Goldenberg RL, Vaitukaitis JL, Ross GT. Estrogen and follicle stimulation hormone interactions on follicle growth in rats. *Endocrinology* 90(6):1492-8, 1972.

Gore-Langton RE, Armstrong DT. Follicular steroidogenesis and its control. In: *The Physiology of Reproduction*. E Knobil, Neill (eds.), Raven Press. Ltd., New York, 1994.

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* 130:3098-3100, 1992.

Gougeon A, Testart J. Influence of human menopausal gonadotropin on the recruitment of human ovarian follicles. *Fertil Steril* 54:848-852, 1990.

Greenwald GS. Temporal and topographic changes in DNA synthesis after induced follicular atresia. *Biol Reprod* 41:175-181, 1989.

Guerrero EH, Stein P, Asch RH, Polak de Fried E, Tesone M. Effect of a gonadotropin-releasing hormone agonist on luteinizing hormone receptors and steroidogenesis in ovarian cells. *Fertil. Steril.* 59:803-809, 1993.

Hakuno N, Koji T, Yano T, Kobayashi O, Taketani Y, Nakane PK. Fas/APO-1/CD95 system as a mediator of granulosa cell apoptosis in ovarian follicle atresia. *Endocrinology* 137: 1938-1948, 1996.

Hashimoto I, Wiest WG.. Luteotrophic and luteolytic mechanisms in rat corpora lutea. *Endocrinology* 80:886-892, 1969.

Hassel JR, Pratt RM. Elevated levels of camp alters the effect of epidermal growth factor in vitro on programmed cell death in the secondary palatial epithelium. *Exp. Cell. Res.* 106:55-62, 1977.

Hazum E, Nimrod A. Photoaffinity labeling and fluorescence-distribution studies of gonadotropin-releasing hormone receptor in ovarian granulosa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:1747-1750, 1982.

Hengartner MO y Horvitz HR. Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* *Current Opinion in Genetics and Development* 4: 581-586, 1994.

Herde K, De Pestel G, Roels F. In situ end labelling of fragmented DNA in induced ovarian atresia. *Biochem Cell Biol* 72: 573-579, 1994.

Hillensjo T, Lemaire WJ. Gonadotropin releasing hormone agonists stimulate meiotic maturation of follicle-enclosed rat oocytes in vitro. *Nature* 287:145-146, 1980.

Hillier SG, Knazek RA, Ross GT. Androgenic stimulation of progesterone production by granulosa cells from preantral ovarian follicles: further in vitro studies using replicate cell cultures. *Endocrinology* 100(6):1539-49, 1977.

Hirshfield AN, Midgley JR. Morphometric an alysis of follicular development in the rat. *Biol Reprod* 19: 597-605, 1978.

Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 124: 43-101, 1991.

Hirshfield AN. Rescue of atretic follicles in vitro and in vivo. *Biol Reprod* 40:181-190, 1989.

Hsu SY, Hsueh AJ. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm. *Physiol Rev.* 80(2):593-614, 2000.

Hsueh AJ, Adashi EY, Jones PB y Welsh TH. Hormonal Regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocrine Reviews* 5:76-119, 1984.

Hsueh AJ, Billig H, Tsafiri A. Ovarian follicle atresia: A hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Reviews* 15, 6:707-724, 1994.

Hsueh AJ, McGee EA, Hayashi M, Hsu SY. Hormonal regulation of early follicle development in the rat ovary. *Mol Cell Endocrinol.* 25;163(1-2):95-100, 2000.

Hsueh AJ, Wang C, Erickson GF. Direct inhibitory effect of gonadotropin-releasing hormone upon follicle-stimulating hormone induction of luteinizing hormone receptor and aromatase activity in rat granulosa cells. *Endocrinology* 106:1697, 1980.

Hubbard CJ and Greenwald GS. Morphological changes in atretic Graafian follicles during atresia in the hamster. *Anat rec* 212:353-357, 1985.

Imai A, Iida K, Tamaya Y.. Tight coupling of gonadotropin-releasing hormone receptor to stimulated phosphoinositide turnover and antigonadotropic action in granulosa cells. *Gynecol. Obstet. Invest.* 33:36-41, 1992.

Iwashita M, Kudo Y, Yoshimura Y.. Physiological role of insulin-like-growth-factor-binding protein-4 in human folliculogenesis. *Horm Res Vol* 46, 1:31, 1996.

Johnson MC, Devoto L, Retamales I, Kohen P, Troncoso JL, Aguilera G. Localization of insulin-like growth factor (IGF-I) and IGF-I receptor expression in human corpora lutea: role on estradiol secretion. *Fertil Steril.* 65(3):489-94, 1996.

Jones EC. The aging ovary. PhD Thesis, University of Birmingham, Birmingham, united Kingdom, 1956.

Jones PB, Hsueh AJ. Regulation of ovarian 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase by gonadotropin releasing hormone and its antagonist in vitro and in vivo. *J Steroid Biochem* 14:1169, 1981.

Kallen CB, Billheimer JT, Summers SA, Stayrook SE, Lewis M, Strauss JF 3rd. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) is a sterol transfer protein. *J Biol Chem.* 273:26285-8, 1998.

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.* 146(1):157-65, 1995.

Karnitis Vj, Townson DH, Friedman CI, Danforth DR. Recombinant Human follicle-stimulating hormone stimulates multiple follicular growth but minimal estrogen production in gonadotropin-releasing hormone agonist-treated monkeys: examining the role of luteinizing hormone in follicular development and steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 91-97, 1994.

Khan MI, Rosberg S, Lahav M, Lamprecht SA, Selstam G, Herlitz H, Ahren K. Studies on the mechanism of action of the inhibitory effect of prostaglandin F₂ alpha on cyclic AMP accumulation in rat corpora lutea of various ages. *Biol Reprod.* 21:1175-83, 1979.

Kim JM, Yoon YD, Tsang BK. Involvement of the Fas/Fas ligand system in p53-mediated granulosa cell apoptosis during follicular development and atresia. *Endocrinology.* 140(5):2307-17, 1999.

Knecht M, Amsterdam a, Catt KJ. Inhibition of granulosa cell differentiation by gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 110:865, 1982.

Knecht M, Katz MS, Catt KJ. Gonadotropin-releasing hormone inhibits cyclic nucleotide accumulation in cultured rat granulosa cells. *J Biol Chem.* 10;256(1):34-6, 1981.

Knobil E. On the control of gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Recent Prog Horm Res.* 30(0):1-46, 1974.

Knudson CM, Tung KS, Tourtellotte WG, Brown GA, Korsmeyer SJ. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science.* 6;270(5233):96-9, 1995.

Kudlow JE, Kobrin MS, Purchio AF, Twardzik DR, hernandez ER, Asa SL, Adashi EY. Ovarian transforming growth factor-alpha gene expression: immunohistochemical localization to theca-interstitial cells. *Endocrinology* 121:1577-1579, 1987.

Lahav M, Lamprecht SA, Amsterdam A, Lindner HR. Suppression of 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase activity in cultured rat luteal cells by prolactin. *Mol Cell Endocrinol* 6: 293, 1977.

Lamprecht SA, Herlitz HV, Ahren KE. Induction by PGF_{2a} of 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase in first generation corpora lutea of the rat. *Mol Cell Endocrinol.* 3:273-82, 1975.

LeMaire WJ, Leidner R, Marsh JM. Pre and post ovulatory changes in the concentration of prostaglandins in rat graafian follicles. *Prostaglandins* 9(2):221-9, 1975.

Leung PC, Steele GL. Intracellular signalling in the gonads. *Endocr Rev* 13:476-498, 1992.

Leung PC. GnRH receptor and potential action in human ovary. *Gynaecol. Endocrinol.* 13:10, 1999.

Levine JE, Bauer-Dantoin AC, Besecke LM, Wolfe AM. Neuroendocrine regulation of the luteinizing hormone releasing hormone pulse generation in the rat. *Rec. prog. Horm. Res.* 47:97-153, 1991.

Levine JE, Ramirez VD. Luteinizing hormone-releasing hormone release during the rat estrous cycle and after ovariectomy, as estimated with push-pull cannulae. *Endocrinology* 111:1439-1448, 1982.

Lewinthal D, Taylor PJ, Pattinson HA, Coronblum B. Induction of ovulation with leuprolide acetate and human menopausal gonadotropin. *Fert Steril* 49:585-588, 1988.

Li S, Maruo T, Ladines-Llave CA. Expression of transforming growth factor-alpha in the human ovary during follicular growth, regression and atresia. *Endocr J* 41:693, 1994.

Libertun C. Cellular and molecular neurobiology. Special Issue: The Gonadotrophin Releasing Hormone Neuron. 1-176. Saavedra JM, Libertun C (eds.), Plenum Press, New York-London, 1995.

Lin D, Sugawara T, Strauss JF. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science* 267:1828-1831, 1995.

Lin JK, Chou CK. In vitro apoptosis in the human hepatoma cell line induced by transforming growth factor beta 1. *Cancer Res.* 52:385-388, 1992.

Liscovitch M, Amsterdam A. Gonadotropin-releasing hormone activates phospholipase D in ovarian granulosa cells. *J Biol Chem* 264:11762-11767, 1989.

Lobb DK, Kobrin MS, Kudlow JE, Dorrington JH. Transforming growth factor-alpha in the adult bovine ovary: identification in growing ovarian follicles. *Biol Reprod* 40:1087-1093, 1989.

Magoffin DA, Gancedo B, Erickson GF. Transforming growth factor- β promotes differentiation of ovarian thecal-interstitial cells but inhibits androgen production. *Endocrinology* 125:1951, 1989.

March C, Goebelsma, Nakamura R, Mishell, D. Role of estradiol and progesterone in eliciting the midcycle luteinizing hormone and follicle-stimulating hormones surges. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 49:507-513, 1979.

Martin SJ, and Green DR. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* 82: 349-352, 1995.

Maruo T, Ladines- Llave CA, Samoto T.. Expresión of epidermal growth factor and its receptor in the human ovary during follicular growth and regression. *Endocrinology* 132:924-931, 1993.

McDonnell TJ, Nuñez G, Platt FM, Hockenberry D, London L, McKearn JP y Korsmeyer SJ. Deregulated Bcl-2-immunoglobulin transgene expands a resting but responsive immunoglobulin M and D-expressing B-cell population. *Mol Cell Biol* 10: 1901-1907, 1990.

McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews* 21:200-214, 2000.

McNatty KP, Makris A, DeGrazia C, Osathanondh R, Ryan KJ. The production of progesterone, androgens, and estrogens by granulosa cells, thecal tissue, and stromal tissue from human ovaries in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 49(5):687-99, 1979.

McNatty KP. Regulation of follicle maturation in the human ovary: a role for 5 α -reduced androgens. In: Cumming IA, Funder JW, Mendelsohn Fao (eds) *Endocrinology*. Australian Academy of Sciences, Canberra, pp 1-51, 1980.

Meldrum DR, Tsao Z, Monroe SE, Braunstein GD, Sladek J, Lu JK, Vale W, Rivier J, Judd HL, Chang RJ. Stimulation of LH fragments with reduced bioactivity following GnRH agonist administration in women. *J Clin Endocrinol Metab.* 58(4):755-7, 1984.

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.* 80:430-434, 1995.

Minegishi T, Leung PC. Luteinizing hormone-releasing hormone stimulates arachidonic acid release in rat granulosa cells. *Endocrinology* 117:2001-2007, 1985.

Miyashita T, Harigai M, Hanada M, Reed JC. Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res* 54: 3131-3135, 1994.

Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80: 293-299, 1995.

Moon YS, Tsang BK, Simpson C, Armstrong DT. 17 beta-Estradiol biosynthesis in cultured granulosa and thecal cells of human ovarian follicles: stimulation by follicle-stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 47(2):263-7, 1978.

Morishige WK, Rothchild I. Temporal aspects of the regulation of corpus luteum function by luteinizing hormone, prolactin and placental luteotrophin during the first half of pregnancy in the rat. *Endocrinology* 95(1):260-74, 1974.

Nakatani A, Shimasaki S, Erickson GF, Ling N. Tissue-specific expression of four insulin-like growth factor-binding proteins (1, 2, 3 and 4) in the rat ovary. *Endocrinology* 129:1521-1529, 1991.

Naor Z, Yavin E. Gonadotropin-releasing hormone stimulates phospholipid labelling in cultured granulosa cells. *Endocrinology* 111:1615-1619, 1982.

Neufeld G, Ferrara N, Schweigerer, Mitchell R, Gospodarowicz D. Bovine granulosa cells produce basic fibroblast growth factor. *Endocrinology* 121: 597-603, 1987.

Neveu S, Hedon B, Bringer J, Chinchole JM, Arnal F, Humeau C, Cristol P, Viala JL.

Niswender GD, Juengel JL, McGuire WJ, Belfiore CJ, Wiltbank MC. Luteal function: the estrous cycle and early pregnancy. *Biol Reprod.* 50(2):239-47, 1994.

Nuñez G, Hockenberry TJ, McDonnell, Sorensen CM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 maintains B cell memory. *Nature* 353: 71-73, 1991.

Nuñez G, London D, Hockenberry D, Alexander M, McKearn JP y Korsmeyer SJ. Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. *J Immunol* 144: 3602-3610, 1990.

Nuñez GD, Hockenberry TJ, McDonnell, Sorensen CM y Korsmeyer SJ. Bcl-2 maintains B cell memory. *Nature* 353: 71-73, 1991.

O'Hara A, Mori T, Taii S, Ban C, Narimoto K. Functional differentiation in steroidogenesis of two types of luteal cells isolated from mature human corpora lutea of the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 65:1192-1200, 1987.

Oikawa M, Dargan C, Ny T, Hsueh AJ. Expression of gonadotropin-releasing hormone and prothymosin- α messenger ribonucleic acid in the ovary. *Endocrinology* 127:2350-2356, 1990.

Oliver JE, Aitman TJ, Powell JF, Wilson CA, Clayton RN. Insulin-like growth factor I (IGF-I) gene expression in the rat ovary is confined to the granulosa cells of development follicles. *Endocrinology* 124:2671-2679, 1989.

Oloffson JI, Conti CC, Leung C, Krisinger J, Leung PC. Tissue-specific regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene expression during the periovulatory period. *Endocr. J.* 2:471-476, 1994.

Oloffson JI, Conti CC, Leung PC. Homologous and heterologous regulation of gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression in preovulatory rat granulosa cells. *Endocrinology* 136:974-980, 1995.

Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 27;74(4):609-19, 1993.

Orlicky DJ, Fisher L, Dunscomb N, Miller GJ. Immunohistochemical localization of PGF receptor in the rat ovary. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 46:223-229, 1992.

Ortmann O, Diedrich K. Pituitary and extrapituitary actions of gonadotropin-releasing hormone and its analogues. *Human Reproduction* 14:194-206, 1999.

ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol Rev.* 60(1):51-89, 1980.

Ovarian stimulation by a combination of a gonadotropin-releasing hormone agonist and gonadotropins for in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 47(4):639-43, 1987.

Paavola LG. The corpus luteum of the guinea pig. IV. Fine structure of macrophages during pregnancy and postpartum luteolysis, and the phagocytosis of luteal cells. *Am J Anat.* 154:337-64, 1979.

Pan G, O'Rourke y Dixit VM. Caspase-9, Bcl-XL y Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem* 273: 5844-5845, 1998.

Papadopoulos V, Dharmarajan AM, Li H, Culty M, Lemay M, Sridaran R. Mitochondrial peripheral-type benzodiazepine receptor expresión. Correlation with gonatropin-releasing hormone (GnRH) agonista-induced apoptosis in the corpus luteum. *Biochem Pharmacol* 58:1389-1393, 1999.

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.* 60(2): 241-247, 2001.

Parmer TG, Roberts CT, LeRoith D, Adashi EY, Khan I, Solan N, Nelson S, Zilberstein M, Gibori G.. Expression, action and steroidal regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-1) receptor in the rat corpus luteum: their differential role in the two cell populations forming the corpus luteum. *Endocrinology* 129: 2924-2932, 1991.

Pedersen RC, Brownie AC. Steroidogenesis-activator polypeptide isolated from a rat Leydig cell tumor. *Science* 236:188. 1987.

Peng C, Fan NC, Ligier M, Vaananen J, Leung PC. Expression and regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor messenger ribonucleic acids in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 135(5):1740-1746, 1994.

Pesce M, De Felici M.. Apoptosis in mouse primordial germ cells: a study by transmission and scanning electron microscope. *Anatomy and Embryology* 189:435-440, 1994.

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.* 35(1):139-41, 1973.

Peters H, McNatty KP. Ovulation. The ovary. pág. 75-79. In: Peters H, McNatty KP. (eds.). Granada Publishing, London, 1980.

Quirk SM, Cowan RG, Joshi SG, Henrikson KP. Fas antigen-mediated apoptosis in human granulosa/luteal cells. *Biol Reprod* 52: 279-287, 1995.

Ranta T, Knecht M, Kody M, Catt KJ. GnRH receptors in cultured rat granulosa cells mediation of the inhibitory and stimulatory actions of GnRH. *Mol Cell Endocrinol* 27:233-240, 1982.

Redmer DA, Dai Y, Li J, Charnock-Jones DS, Smith SK, Reynolds LP, Moor RM. Characterization and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the ovine corpus luteum. *J Reprod Fertil.* 108(1):157-65, 1996.

Revelli A, Pacchioni D, Cassoni P, Bussolati G, Massobrio M. In situ hybridization study of messenger RNA for estrogen receptor and immunohistochemical detection of estrogen and progesterone receptors in the human ovary. *Gynecol Endocrinol.* 10(3):177-86, 1996.

Richards JS. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol Rev.* 60(1):51-89, 1980.

Rivier C, Rivier J, Vale W. Inhibin-mediated feedback control of follicle-stimulating hormone secretion in the female rat. *Science* 10;234(4773):205-8, 1986.

Ronen-Fuhrmann T, Timberg R, King S, Hales K, Hales D, Stocco D, Orly J. Spatio-temporal expression patterns of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology* 139: 303-315, 1998.

Rothchild I, Pepe GJ, Morishige WK. Factors affecting the dependency of LH in the regulation of corpus luteum progesterone secretion in the rat. *Endocrinology* 95(1):280-8, 1974.

Rothchild I. The regulation of the mammalian corpus luteum. *Recent Prog Horm Res.* 37:183-298, 1981.

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.* 56(1):186-93, 1997.

Sawada M, Carlson JC. Rapid plasma membrane changes in superoxide radical formation, fluidity and phospholipase A₂ activity in the corpus luteum of the rat during induction of luteolysis. *Endocrinology* 128:2992-2998, 1991.

Schomberg DW, May JV, Mondschein JS. Interactions between hormones and growth factors in the regulation of granulosa cell differentiation in vitro. *J Steroid Biochem* 19:291-295, 1983.

Schwall RH, Robbins K, Jardieu P, Chang L, Lai C, Terrell TG. Activin induces cell death in hepatocytes in vivo and in vitro. *Hepatology* 18:347-356, 1993.

Séguin C, Pelletier G, Dubé D, Labrie F. Distribution of luteinizing hormone-releasing hormone receptors in the rat ovary. *Regul. Pept.* 4:183-188, 1982.

Selvaraj N, Mougald NR. In vivo and in vitro studies on the differential role of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in regulating follicular function in the bonnet monkey using specific gonadotropin antibodies. *Biol Reprod* 51:246-253, 1994.

Shikone T, Yamoto M, Kokawa K. Apoptosis of human corpora lutea during cyclic luteal regression and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 2376-2380, 1996.

Silvia WJ, Fitz TA, Mayan MH, Niswender GD. Cellular and molecular mechanisms involved in luteolysis and maternal recognition of pregnancy in the ewe. *Anim. Reprod. Sci.* 7:57-74, 1984.

Smith C, Richards J, Yasin K, Sangster J, Sridaran R. Changes in rat luteal ultrastructure and P450 scc content after in vivo treatment with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol Reprod* 44:382-391, 1991.

Smith GH, Kidwell WR, Schneider WC. Cytoplasmic DNA in rat corpora lutein cells. Effect of prolactin on [3H]thymidine incorporation. *Exp Cell Res.* 96(2):321-34, 1975.

Song M, Shao H, Mujeeb A, James TL, Miller WL. Molten-globule structure and membrane binding of the N-terminal protease-resistant domain (63-193) of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *Biochem J.* 15;356(Pt 1):151-8, 2001.

Sridaran R, Lee MA, Haynes L, Srivastava RK, Ghose M, Sridaran G, Smith CJ. GnRH action on luteal steroidogenesis during pregnancy. *Steroids* 64(9):618-23, 1999.

Sridaran R, Philip GH, Li H, Culty Z, Liu Z, Stocco DM, Papadopoulos V. GnRH agonista treatment decreases progesterone sintesis, luteal peripheral benzodiazepine receptor mRNA, ligand binding and steroidogenic acute regulatory protein expression during pregnancy. *J Mol Endocrinol* 22:45-54, 1999.

Srinivasula SM, Ahmad T, Fernandes-Alnemri T y Alnemri ES. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell Biol* 1: 949-957, 1998.

Srivastava RK, Luu-The V, Marrone BL, Harris-Hooker S, Sridaran R. Inhibition of steroidogenesis by luteal cells of early pregnancy in the rat in response to in vitro administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 49: 73-82, 1994.

Starup J, Visfeldt J. Ovarian morphology and pituitary gonadotropins in serum during and after long-term treatment with oral contraceptives. *Acta Obstet gynecol Scand* 53:161, 1974.

Starup J, Visfeldt J. Ovarian morphology in early and late human pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 53:211, 1974.

Steller H.. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267:1445-1448, 1995.

Stojilkovic SS, Chang JP, Ngo D, Tasaka K, Izumi SI, Catt KJ. Mechanism of action of GnRH: the participation of calcium mobilization and activation of protein kinase C in gonadotropin secretion. *Steroid. Biochem.* 33:693-703, 1989.

Stojilkovic SS, Reinhart J, Catt KJ. Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways. *Endoc Rev* 15:462-499, 1994.

Strauss JF, Schuler LA, Rosenblum MF, Tanaka T. Cholesterol metabolism by ovarian tissue. *Ad. Lipid. Res.* 18:99-157, 1981.

Suda T, Takahashi T, Gostein P, Nagata S. Molecular cloning and expresión of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75: 1169-1178, 1993.

Sugawara T, Lin D, Holt JA, Martin KO, Javitt NB, Miller WL, Strauss JF. Structure of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene: StAR stimulates mitochondrial cholesterol 27-hydroxylase activity. *Biochemistry* 3;34:12506-12, 1995.

Tagatz G, Fialkow PJ, Smith D, Spadoni L. Hypogonadotropic hypogonadism associated with anosmia in the female. *N Engl J Med* 283:1326, 1970.

Tapanainen J, Leinonen PJ, Tapanainen P.. Regulation of human granulosa-luteal progesterone production and proliferation by gonadotropin and growth factors. *Fertility Sterility* 48:576-580, 1987.

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* 7:643-650, 1993.

Tilly JL and Tilly KI. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology* 136:242-252, 1995a.

Tilly JL, Billig H, Kowalski KI, Hsueh AJ. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Mol Endocrinol.* 6(11):1942-50, 1992.

Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, Hsueh AJ. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology* 129:2799-2801, 1991.

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-xL messenger RNA levels. *Endocrinology* 136: 232-241, 1995b.

Tilly JL. Apoptosis and ovarian function. *Reviews of Reproduction* 1:162-172, 1996.

Tilly JL. Cell death and species propagation: Molecular and genetic aspects of apoptosis in the vertebrate female gonad. En: Lockshin RA, Zakeri Z y Tilly JL (eds.). *When cells die*, Wiley-Liss, Inc., p. 431-452, 1998.

Tilly JL. Ovarian follicular atresia: a model to study the mechanisms of physiological cell death. *Endocrine Journal* 1:67-72, 1993.

Tsafriri A, Adashi EY.. Local nonsteroidal regulators of ovarian function. *The Physiology of Reproduction*. Knobil E y Neill J. Raven Press, Ltd. New York; 817-843, 1994.

Tsujimoto Y, Croce CM. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(14):5214-8, 1986.

Uilenbroek JT, Woutersen PJ, Van der Schoot P. Atresia of preovulatory follicles: gonadotropin binding and steroidogenic activity. *Biol Reprod* 21:75-87, 1980.

Wang C, Hsueh AJ, Erickson GF. Induction of functional prolactin receptors by follicle-stimulating hormone in rat granulosa cells in vivo and in vitro. *J Biol Chem*. 25;254(22):11330-6, 1979.

Wang J, Leung PC. Role of arachidonic acid in luteinizing hormone-releasing hormone action: stimulation of progesterone production in rat granulosa cells. *Endocrinology* 122:906-911, 1988.

Wang J, Steele GL, Baimbridge KG, Rodway MR, Leung PC. Intracellular calcium and the signaling mechanism of luteinizing hormone-releasing hormone in rat granulosa cells. *Am J Obstet Gynecol* 167:541-447, 1992.

Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Itoh N, Yonehara S, Copeland NG, Jenkins NA y Nagata S. The cDNA structure, expression and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol* 148:1274-1279, 1992.

Wathes DC, Swann RW, Birkett SD, Porter DG, Pickering BT. Characterization of oxytocin, vasopressin, and neurophysin from the bovine corpus luteum. *Endocrinology* 113(2):693-8, 1983.

Whitelaw PF, Eidne KA, Sellar R, Smyth CD, Hillier SE. Gonadotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in the rat ovary. *Endocrinology* 136:172-178, 1995.

Wiesen JF, Midgley AR. Expression of connexin 43 gap junction messenger ribonucleic acid protein during follicular atresia. *Biol Reprod* 50:336-348, 1994.

Wilkinson RF, Anderson E, Alberg J. Cytological observations of dissociated rat corpus luteum. *J Ultrastruct Res*. 57:168-84, 1976.

Williams GT, Smith CA, Spooncer E, Dexter TM, Taylor DR. Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature* 343:76-79, 1990.

Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284:555-556, 1980.

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. *Hormone Research* 48:35-41, 1997.

Ye H, Huang G, Pei L. A prospective, randomized controlled study comparing the effects of gonadotropin-releasing hormone agonist long and short protocols for in vitro fertilization. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 36:222-5, 2001.

Yeh J y Adashi E. El ciclo ovárico. 164-202. In: *Endocrinología de la Reproducción*. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 2001.

Yeh J, Lee GY y Anderson E. Presence of transforming growth factor-alpha messenger ribonucleic acid (mRNA) and absence of epidermal growth factor mRNA in rat ovarian granulosa cells, and the effects of these factors on steroidogenesis in vitro. *Biol Reprod* 48:1071-1081, 1993.

Yeh J, Yeh YC. Transforming growth factor-alpha and human cancer. *Biomed Pharmacother* 43:651, 1989.

Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature*. 26;369(6478):321-3, 1994.

Ying SY, Guillemin R. (DTrp-Pro-Net) Luteinising hormone-releasing factor inhibits follicular development in hypophysectomised rats. *Nature* 280:593.595, 1979.

Young JR, Jaffe RB.. Strength-duration characteristics of estrogen effects on gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in women. Effects of varying concentrations of estradiol. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 42:432-442, 1976.

Zeleznik AJ, Ihrig L, Bassett SG. Developmental expression of a Ca^{++}/Mg^{++} dependent endonuclease activity in rat granulosa and luteal cells. *Endocrinology* 125:2218-2220, 1989.

Zeleznik AJ, Midgley AR Jr, Reichert LE Jr. Granulosa cell maturation in the rat: increased binding of human chorionic gonadotropin following treatment with follicle-stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 95(3):818-25, 1974.

Zeleznik AJ. Premature elevation of systemic estradiol reduces serum levels of follicle-stimulating hormone and lengthens the follicular phase of the menstrual cycle in rhesus monkeys. *Endocrinology* 109(2):352-5, 1981.

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* 119(6):2809-20, 1986.