



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**Expresión y actividad de las caspasas
iniciadoras (-2, -8 y -9) y la principal caspasa
efectora (-3) en la regresión del cuerpo lúteo del
mono rhesus y la rata**

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

Marina Cinthia Peluffo

Directora de tesis: Dra. Marta Tesone
Consejera de Estudios: Dra. Marta Tesone

Lugar de trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental
(IBYME-CONICET)

Buenos Aires, Octubre 2007

*“Every person takes the limits of their own field of vision for the limits of the
world”*

Arthur Schopenhauer

A mi mamá y papá

El capítulo I fue realizado en el Oregon National Primate Research Center-Oregon Health and Science University (ONPRC-OHSU. EE.UU.), en el laboratorio del Dr. Richard L. Stouffer en el marco de una beca Fogarty (NIH).

Y quería agradecerle especialmente:

Al Dr. Richard L. Stouffer (Dick), por darme la posibilidad de perfeccionarme durante más de un año en su laboratorio, por su constante apoyo y ayuda, por consentirme en todo lo necesario para llevar a cabo mi tesis y desarrollo profesional, por demostrarme que se puede ser un científico muy reconocido sin olvidarse de ser una excelente persona y tener vida personal.

Agradecimientos

A Sushi (Dra. Marta Tesone), por creer en mi y darme la oportunidad de desarrollar mi tesis en su laboratorio, por alentarme siempre y apoyarme, por impulsarme a ir a Oregon y por todas las vivencias compartidas desde entonces, y por darme una especie de hermanita postiza (Luchi).

A Kelly (Dra. K.A. Young), por dedicar mucho de su tiempo en enseñarme y ayudarme, por haberme guiado de una manera excepcional, por transmitirme sus energías y vocación por la ciencia, por su ayuda en el idioma y preparación de charlas, por ser un ejemplo de investigadora y persona.

A Jon (Dr. J. Hennebold) y Mary (Dra. M. Zelinki-Wooten), por todo su tiempo empleado en ayudarme, por las interesantes charlas y debates científicos, por trasmitirme sus inquietudes y pensamientos científicos.

A mis compañeras del lab: Ale Vitale, Fer, Gri, Dalhia, Ale RC, Lili y Diana, por las horas de terapia y los tiempos compartidos en el laboratorio, por las charlas científicas generales y relacionadas con nuestros proyectos, por su ayuda y enseñanza en distintos protocolos y técnicas.

A las chicas del lab hermano 216: Mariel, Gaby, R. Inés, Carla y Analía, por los momentos compartidos, sus asesoramientos y ayuda.

A toda la gente de los laboratorios de Dick, Jon y Mary: Ted, Jay, Fuhua, Jeff, Ying, Jessica, Wilma, Melinda, Maralee, Diana; por su ayuda, tiempo y préstamo/regalo de reactivos y/o equipos. En especial a mis amigas Melinda y Wilma, por hacer de mis días en el “primate center” entretenidos, por su apoyo constante y charlas compartidas, por asegurarse siempre de que no me faltara nada.

A Carlos Stocco, por su buena predisposición, sugerencias, consejos y ayuda.

A Pato Miranda y Leo Bussman, por responder a mis infinitas preguntas y ayudarme.

A todo el primer piso del IBYME (en especial al lab 217 y 214) y a la gente del bioterio (en especial a Victor y Paola), por su buena predisposición, ayuda en distintos protocolos, préstamo de equipos y reactivos.

A José y a todo su equipo, por sus saludos de buenos días y sus sonrisas diarias de manera de hacer grata la entrada al instituto todos los días, por su buena predisposición.

A Pablo Do Campo, por su ayuda y tiempo dedicado en el microscopio para la toma de las fotos digitales.

Al IBYME y al CONICET, por hacer posible la realización de mi tesis.

A Nut, por ser mi diseñadora gráfica personal, gurú del photoshop y amiga incondicional.

A Magui, por ayudarme y asesorarme con el inglés y ser una amiga incondicional.

A las distintas personas que pasaron por Oregon y formaron parte de la denominada “Cominidad Latina” (término que a la mayoría nos disgustaba...), por el apoyo indispensable necesario para aliviar la distancia, por su ayuda en mis innumerables mudanzas, por todos los lindos momentos y hikings compartidos. En especial quiero agradecer el cariño y la ayuda personal y profesional de Ale, Adriane, los Claudios, Lucas, Rey y Robert; y a mi querida familia postiza: los Enriori (Ceci, Pablo y Nico). Sin ellos no hubiese podido.

A mi mamá y mi papá, por darme la vida, mi educación y mis valores, por su amor y apoyo incondicionales, por ser un ejemplo de fortaleza, perseverancia y esfuerzo.

A Pablo, por cambiarme la vida de una manera hermosa, por su amor y apoyo permanentes, por transmitirme su paz y enseñarme a ser feliz.

A mis seis hermanos: Lio, Ale, Ixi, Eli, Nahu y Flopy, por estar siempre a mi lado, por todos los lindos recuerdos que tenemos juntos, por su cariño, apoyo y ayuda constantes, por aprender de ellos muchísimas cosas.

A mis cinco soles (sobrinitos): Nacho, Fiori, Luchi, Nahu y Naza, por ser la alegría de mi vida y transmitirme todo su cariño, alegría y vitalidad, por no dejar de sorprenderme.

A mis cuñados: Rami, Caro y Gaby, por ser la familia elegida por mis hermanos y brindarme todo su cariño y apoyo aceptándome. A Marce, Gonza y Caro bis, por su buena predisposición y cariño.

A Mari (abuela postiza de la vida), mis primos, mis tíos, mi madrina Susi y mi ahijadito Santi; por acompañarme en los distintos momentos de mi vida.

A mis amigos: Eri, Clau, Lilu, Luchi, Vale, Nuri, Vir, Ari, Agus, Juan, Gaspar y Pato; por todos los lindos momentos compartidos, por su cariño y apoyo, por las horas en el msn, por darme sus distintas visiones.

A la gente y amigos del barrio: Adri, Lau, Agus, Ruben, Edith y Helen; por ayudarme y acompañarme en momentos difíciles.

A la familia de Pablo (Mary, Franco, Ane, Ceci, Hernán, Juanchi, Pedrito, Oscar y Esterina), por aceptarme y brindarme su cariño.

Resumen

El cuerpo lúteo (CL) es una glándula endocrina transciente que surge, luego de la ovulación, de la luteinización de las células de granulosa y tecaes del folículo ovárico. Las células luteales son responsables de producir progesterona para permitir el comienzo y el mantenimiento del embarazo. En caso de no producirse la fecundación, el CL se degenera en un proceso denominado luteólisis, decayendo los niveles de progesterona. La formación y la regresión del CL requieren de una extensa reestructuración del tejido, cuyos mecanismos moleculares aún permanecen en gran parte desconocidos. La apoptosis o muerte celular programada ha sido relacionada con la regresión o luteólisis del CL en distintas especies. Sin embargo existen controversias acerca de la participación de este proceso en el CL. Los miembros de la familia de las caspasas son cisteín-proteasas que se encuentran involucradas tanto en los eventos tempranos como en los tardíos de la apoptosis, jugando un papel central en dicho proceso. La expresión de algunas caspasas ha sido descrita en la luteólisis, con resultados contradictorios de acuerdo a los distintos modelos estudiados. La hipótesis de esta tesis fue que cambios en la expresión y/o actividad de las caspasas están involucrados en la regresión o luteólisis del CL. Por lo antes expuesto, el objetivo de esta tesis fue evaluar los cambios de expresión y/o actividad de diferentes caspasas durante la formación y regresión del CL utilizando distintos modelos. Obteniéndose los siguientes resultados y conclusiones:

Varios miembros de la familia de las caspasas (-2, -8, -9 y -3) se encuentran expresados y activos en el CL durante la fase lútea del ciclo menstrual natural del mono rhesus. Asimismo, se observó un aumento transciente en la actividad de las tres caspasas iniciadoras y la principal caspasa efectora en MLCL (donde los niveles de progesterona aún son elevados). La regulación de las caspasas en el CL de primates sería a nivel de la traducción o de la activación enzimática y no a nivel de la transcripción. En cuanto a los resultados obtenidos del modelo de remoción y reemplazo hormonal, éstos sugieren que las gonadotrofinas y esteroides locales, estarían regulando principalmente la activación de la cascada de las caspasas a nivel de las iniciadoras (-2, -8 y -9).

Durante la formación y regresión del CL en el ciclo estral y la preñez en la rata, se observó una expresión y/o actividad dinámica en las caspasas iniciadoras (-2, -8 y -9) y la principal efectora (-3). La actividad de las caspasas-2, -3 y -9 aumentó en

el CL del ciclo anterior en E durante la luteólisis funcional, seguido de un aumento en el número de células apoptóticas y disminución en el peso en el CL del ciclo anterior en DII. Asimismo, se observó un aumento transiente en la actividad de las tres caspasas iniciadoras y la principal caspasa efectora en el CL de preñez en los días 19 y/o 21 de gestación. Este aumento fue previo o coincidente con la disminución en los niveles luteales de progesterona. Por otro lado, se observó un aumento significativo en el número de células apoptóticas e incremento en la actividad de la 20 α -HSD luego del parto. Por lo tanto, un camino apoptótico independiente de las caspasas podría estar involucrado en la regresión estructural del CL de la preñez luego del parto en la rata. El tratamiento in vivo con PGF-2 α a ratas en el día 14 de preñez, disminuyó los niveles luteales de progesterona a las 24 horas post inyección y esta disminución podría ser la responsable del aumento significativo en la actividad de las cuatro caspasas evaluadas a las 36 horas post tratamiento. Mientras que, no fue capaz de producir cambios notorios en el porcentaje de células apoptóticas en el CL de la preñez a los distintos tiempos post inyección evaluados.

En conclusión, la activación temprana de las caspasas en el ciclo menstrual del mono rhesus, y en el ciclo estral y la preñez de la rata, sugieren que estas proteasas están involucradas en la etapa temprana de la regresión del CL. Mientras que, la administración exógena con PGF-2 α no necesariamente mimetiza la luteólisis fisiológica, ya que la caída en los niveles de progesterona precede la activación de las caspasas. Además, de acuerdo a los resultados obtenidos en los distintos modelos estudiados, el control en la expresión de las caspasas puede diferir respecto al de su actividad. Dado que la actividad de las tres caspasas iniciadoras evaluadas aumentan significativamente en el CL del ciclo menstrual del mono, de la preñez de rata y post administración de PGF-2 α ; ambos caminos apoptóticos (camino mitocondrial y camino de receptores de muerte) se encontrarían involucrados.

Palabras Claves

- Ovario
- Cuerpo Lúteo
- Luteólisis
- Caspasas
- Apoptosis
- Ciclo Estral y Menstrual
- Preñez
- PGF-2 α

Abstract

The corpus luteum (CL) is a transient endocrine gland that it is formed after ovulation by the luteinization of the granulosa and theca cells of the follicle. Luteal cells are responsible for secreting progesterone, which permits the initiation and maintenance of pregnancy. If pregnancy does not occur, the CL regresses by a process called luteolysis and progesterone levels decline. The formation and regression of the CL involves extensive tissue remodeling, and most of the molecular mechanism are unknown. Apoptosis, or programmed cell death, is associated with luteolysis or regression of the CL in many species. However, there is some controversy about the involvement of apoptosis during luteolysis. Members of the caspase family are cysteine proteases involved in either the early or the final apoptotic events, playing a key role in this process. Information regarding the expression of different caspases during the regression of the CL has been described, with contradictory results depending on the models studied. The hypothesis of this thesis was that changes in expression and/or activity of the caspases are involved in the regression of the CL. Therefore, the aim of this thesis was to evaluate changes in expression and/or activity of different caspases during formation and regression of the CL with different models. The following results and conclusions were obtained.

Several members of the caspase (-2, -3, -8, and -9) family are expressed and active in the rhesus monkey CL throughout the luteal phase of the natural menstrual cycle. Also, a transient rise in initiator and effector caspase activity at mid-late luteal phase was observed (when the progesterone levels are still high). Regulation of the caspases in the primate CL was not at the transcriptional level, but rather at the level of translation and/or enzyme activation. Regarding hormone ablation/replacement treatment, the results suggest that gonadotropic hormones and local steroids act primarily to regulate initiator (-2, -8, and -9) caspase activity rather than the main effector caspase-3, in the primate CL.

Dynamic expression of the initiator caspases (-2, -8 and -9) and the main effector caspase-3 was observed during the formation and regression of the CL in the estrous cycle and pregnancy of the rat. The activity for caspase-2,-3 and -9 increased in the old CL at estrus during the functional regression, followed by an increase in the number of apoptotic cells and a decrease in the CL weight in the old CL at diestrus II. Moreover, a transient increase in initiator and effector caspase activity in the CL on

days 19 and 21 of pregnancy was observed. This increase was prior to or coincident with the decrease in luteal progesterone content. Also, the number of apoptotic cells and activity of 20 α -HSD increased after parturition. Therefore, a caspase-independent apoptotic mechanism may be involved in the structural regression of the rat CL after parturition. In vivo PGF2 α treatment on day 14 of pregnancy decreased luteal progesterone content by 24 hours post injection and this drop may stimulate the activation of the four caspases studied at 36 hours post PGF-2 α administration. However, PGF-2 α treatment failed to produce any significant change in the number of apoptotic cells in the CL of pregnancy at the selected times post injection.

In conclusion, the early activation of the caspases in CL during the menstrual cycle of the rhesus monkey, and the estrous cycle and pregnancy of the rat, suggests that these proteases are involved in the early stages of the luteal regression. In addition, exogenous administration of PGF-2 α to rats does not necessarily mimic physiological luteolysis since the drop of luteal progesterone content precedes caspase activation. Also, according the results from the different experimental models, the control of caspase protein may differ from the activity of these proteases. Since a significant increase of the three initiator caspases studied was found in the CL during the menstrual cycle of the rhesus monkey, in the CL of pregnancy and post PGF-2 α administration in the rat, both apoptotic pathways (the extrinsic death receptor and the intrinsic mitochondrial pathways) appear involved in luteolysis.

Keywords

- Ovary
- Corpus Luteum
- Luteolysis
- Caspases
- Apoptosis
- Estrous and Menstrual Cycle
- Pregnancy
- PGF-2 α

Abreviaturas

17 β -HSD	17 β -hidroxiesteroide deshidrogenada
20 α -HSD	20 α -hidroxiesteroide deshidrogenada
20 α -OH-P ₄	20 α -hidroxiprogesterona
3 β -HSD	3 β -hidroxiesteroide deshidrogenada
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNasa	Enzima que digiere especificamente ADN
ADNc	Acido desoxirribonucleico copia
AMPc	Adenosin monofosfato ciclico
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Acido ribonucleico
ARNasa	Enzima que digiere especificamente ARN
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
Bcl-2	B-cell leukemia/lymphoma 2
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BH	Bcl-2 Homology Domain
BMPs	Bone Morphogenetic Proteins
bp	Pares de base
C/EBP β	CATT/enhancer binding protein
CA ²⁺	Calcio
CARD	Caspase Recruit Domain
CG	Hormona corionica
CL	Cuerpo lúteo
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
COX	Ciclooxigenasa
CREB	cAMP Regulatory Element Binding Protein
DAB	Diaminobenzidina
DAG	Diacilglicerol
DD	Death Domain/Dominio de muerte
DED	Death Effector Domain/Dominio de muerte efector
DII	Diestro II
DISC	Death Inducing Signaling Complex/
dNTPs	Deoxynucleotide Triphosphates
DTT	Ditiotreitol
E	Estro
ECL	Early Corpus Luteum/Cuerpo lúteo temprano
ECM	Matriz extracelular

EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
Egr-1	Early growth response protein-1
EG-VEGF	Endocrine Gland derived VEGF
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
END/E	Células endoteliales
ER	Receptor de estrógenos
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
ET-1	Endotelina-1
FAD	Flavin adenin dinucleótido
FADD	Fas-associated Death Domain
FasL	Ligando de Fas
FP	Receptor de PGF-2 α
FSH	Hormona folículo estimulante
g	Gramo
GAPDH	Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
GDF	Growth Differentiation Factor
GH	Hormona de crecimiento
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas
H&E	Hematoxilina-eosina
hCG	Hormono coriónica humana
HCL	Acido clorhídrico
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HRP	Horseradish Peroxidase
ICAM-1	Intracellular Adhesion Molecule-1
IGF	Insulin-like Growth Factor-1
IHC	Inmunohistoquímica
INF	Interferon
IP3	Inositol trifosfato
IRF-1	Interferon Regulatory Factor 1
Jak	Janus quinasa
JNK	Jun quinasa
KDa	Kilo daltons
LCL	Late Corpus Luteum/Cuerpo lúteo tardío
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LH	Hormona luteinizante
LL	Células luteales grandes
LP (I y II)	Lactógeno placentario
LPD	Fase lútea deficiente o inadecuada
M	Molar
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase

MCL	Mid Corpus Luteum/Cuerpo lúteo medio
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
MESA	MOPS-EDTA-Acetato de Sodio
mg	Miligramos
min.	Minutos
Mg ²⁺	Magnesio
MLCL	Mid-Late Corpus Luteum/Cuerpo lúteo medio-tardío
M-MLV	Moloney-Murine Leukemia Virus
MMPs	Metaloproteinasas
NaCl	Cloruro de sodio
NAD ⁺	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADP	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
Phosphate		
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen
NCL	Natural Corpus Luteum/Cuerpo lúteo del ciclo natural (menstrual o estral)
NF κ B	Nuclear Factor-kappa B
ng	Nanogramos
NGF	Nerve Growth Factor
NK	Natural Killers
nm	Nanómetro
NO	Oxido nítrico
NOS	Oxido nítrico sintasa
OD	Densidad óptica
P4	Progesterona
P45017 α o P450c17 o CYP17	P45017 α -hidroxilasa/C17-20 liasa
P450arom o CYP19	P450 aromataasa
P450scc	Cholesterol Side Chain Cleavage enzyme
PARP	Poli ADP ribosa polimerasa
PBR	Receptor tipo benzodiazepina periférico
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Polimerase Chain Reaction/Reacción en cadena de la polimerasa
pg	Picogramos
PGF-2 α	Prostaglandina F-2 α
PGFs	Prostaglandinas F
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C

PLA2	Fosfolipasa A2
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotropin/ gonodotrofinas de suero de yegua preñada
PP	Post parto
PR	Receptor de progesterona
PRAP/17 β -HSD8	17 β -hidroxiesteroide deshidrogenada tipo7
PRL	Prolactina
RCL	Ciclo menstrual regulado
RFU	Unidades relativas de fluorescencia
RIA	Radioinmuno ensayo
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rTdT	Enzima Deoxinucleotidil Transferasa
		Terminal recombinante
RT-PCR	Transcriptasa reversa-Reacción en cadena de la polimerasa
SCP-2	Proteína transportadora de esteroides 2
SDS	Dodecil sulfato sódico
SEM	Error estándar de la media
SL	Célula luteal pequeña
SMasa	Esfingomielinasa
SR-BI	Receptor de HDL
StAR	Proteína reguladora de la esteroidogénesis
aguda		
Stat	Signal Transducers and Activators of Transcription
TBE	Tris-Borato-EDTA
TBS	Buffer Tris salino
TCR	Receptor de la célula T
TGF	Transforming Growth Factor
TIMPs	Inhibidores de las metaloproteinasas
TNF	Tumor Necrosis Factor/Factor de necrosis tumoral
TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral
TR o RT	Transcriptasa reversa
TRADD	TNF-R1-associated Death Domain
TRL	Trilostano
TSH	Tirotropina

TTNBS	Buffer Tris salino con detergente Tween
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Nick End Labeling
V	Voltios
VEGF	Vascular Endotelial Growth Factor
VLCL	Very-Late Corpus Luteum/Cuerpo lúteo muy-tardío
µg	Microgramos

Los resultados presentados en esta tesis contribuyeron en parte a la realización de los siguientes trabajos científicos publicados en revistas internacionales:

- **Dynamic expresion of caspase-2, -3, -8 and -9 proteins and enzyme activity, but not mRNA, in the monkey corpus luteum during the menstrual cycle.**

Peluffo M.C., Young K.A., Stouffer R.L. J Clin Endocrinol Metab. 90 (4): 2327-2335 (2005).

- **Expression of caspase-2, -3, -8 and -9 proteins and enzyme activity in the corpus luteum of the rat at different stages during the natural estrous cycle.**

Peluffo M.C., Bussmann L., Stouffer R.L. and Tesone M. Reproduction. 132 (3):465-475 (2006).

- **Activity and expression of different members of the caspase family in the rat corpus luteum (CL) during pregnancy and postpartum.**

Peluffo M.C., Stouffer R.L. and Tesone M. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. En prensa (agosto, 2007).

Indice

INTRODUCCIÓN	20
MORFOLOGÍA Y FUNCIÓN DEL OVARIO	21
FOLICULOGÉNESIS	23
REGULACIÓN DEL DESARROLLO FOLICULAR	28
<i>Eje hipotálamo-hipofisario-gonadal</i>	28
<i>Retroalimentación positiva y negativa</i>	28
<i>Reclutamiento inicial y cíclico</i>	29
<i>Selección del folículo dominante</i>	30
<i>Teoría dos células-dos gonadotrofinas</i>	31
OVULACIÓN	33
EL CUERPO LÚTEO (CL)	34
<i>Introducción</i>	34
<i>Formación del CL</i>	36
Escape del ciclo celular	36
Cambios de expresión	36
Regulación endócrina, parácrina y autocrina	38
Transducción de señales intracelulares en la luteinización	39
<i>Luteinización in vitro</i>	40
<i>Tipos Celulares</i>	41
<i>Vascularización</i>	43
<i>Función del CL: Esteroidogénesis</i>	46
Fuentes de colesterol y su transporte	46
Síntesis de progesterona	49
Síntesis de andrógenos y estradiol	49
Metabolismo de la progesterona	51
<i>Regulación endocrina del CL</i>	51
LH	51
PRL y proteínas PRL like	52
Estradiol	54
Andrógenos	55
Progesterona	55
<i>Luteólisis</i>	56
Introducción-Etiología	56
Apoptosis	57
Familia de Bcl-2	59
Caspasas	62
Receptores de muerte	67
Mediadores de la luteólisis-luteolisinas-factores luteolíticos	67
PGF-2 α	68
Citoquinas	71
TNF- α	71
FasL	73
INF- γ	75
Flujo sanguíneo y cambios en la vasculatura	76
Radicales libres	77
Camino de la esfingomielina	78
Endotelina-1	80
CLASIFICACIÓN DE CICLOS OVÁRICOS	80
<i>Ciclo menstrual en primates</i>	82
Humanos	82
Mono rhesus	84
<i>Ciclo estral en la rata</i>	87
PREÑEZ Y EL RECONOCIMIENTO MATERNO	89
<i>En primates</i>	89
<i>En roedores (En particular en la rata)</i>	89
DISFUNCIÓN LUTEAL	93
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	97
HIPÓTESIS	95
OBJETIVO GENERAL:	97

a) Estudio en el CL del mono rhesus (<i>Macaca mulatta</i>).....	97
Objetivos específicos:.....	97
b) Estudio en el CL de ratas (<i>Rattus norvegicus</i> , cepa Sprague Dawley).....	98
Objetivos específicos:.....	98
MATERIALES Y MÉTODOS.....	100
ANIMALES.....	99
TRATAMIENTOS.....	101
Monos (Ciclo menstrual regulado, RCL).....	101
Ratas PGF-2 α	102
AISLAMIENTO DE LOS CLS.....	102
Mono.....	102
Rata.....	103
EXTRACCIÓN DE ARN DE LOS CLS DE MONO RHESUS.....	103
GEL DE AGAROSA PARA ARN.....	104
RT-PCR DE LOS ARN DE MONO RHESUS.....	105
Transcripción reversa (RT).....	105
PCR.....	105
GELES DE AGAROSA Y SECUENCIACIÓN.....	106
PCR EN TIEMPO REAL (REAL TIME PCR) PARA LA CASPASA-2 DE LOS ARN DE MONO RHESUS.....	107
EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y TÉCNICA DE LOWRY.....	108
ACTIVIDAD DE CASPASAS.....	109
ELISA PARA LA CASPASA-3 CLIVADA (ACTIVA) DE MONO RHESUS.....	109
WESTERN BLOT DE P450SCC, CASPASA-3, B-ACTINA Y GAPDH DE LAS PROTEÍNAS DE RATA.....	110
ACTIVIDAD DE LA 20A-HSD.....	110
EXTRACCIÓN DE ESTEROIDES DE LOS CLS DE RATA.....	111
RADIOINMUNOENSAYO (RIA) DE PROGESTERONA.....	111
INMUNOHISTOQUÍMICA (IHC).....	112
Cortes de rata.....	112
Cortes de mono.....	113
HEMATOXILINA-EOSINA (H&E) DE LOS CORTES DEL NCL DE RATA.....	113
TUNEL.....	114
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS DATOS.....	114
RESULTADOS (CAPÍTULO I, PARTE A).....	117
CAPÍTULO I.....	116
(ESTUDIOS REALIZADOS EN MONOS RHESUS (<i>MACACA MULATTA</i>)).....	117
A- Expresión y actividad de las caspasas-2, -8, -9 y -3, y su correlación con los niveles de apoptosis en el CL del mono rhesus en el ciclo menstrual natural (NCL).....	118
Niveles de expresión del ARNm de las caspasas-2, -8, -9 y -3 en el CL del mono rhesus durante el ciclo menstrual mediante las técnicas de RT-PCR y PCR en tiempo real.....	118
Secuenciación.....	122
Cuantificación de la actividad de las caspasas-2, -8, -9 y -3 en los distintos estadios del CL en el ciclo menstrual del mono rhesus por un método enzimático.....	125
Cuantificación del fragmento clivado (p17) de las caspasas-3 por un ELISA en los distintos estadios del CL en el ciclo menstrual del mono rhesus.....	128
Expresión proteica y localización de las caspasas-2 y -3 en el CL del mono rhesus en el ciclo menstrual...	128
Estudio de la apoptosis en los distintos estadios del CL en el ciclo menstrual del mono rhesus mediante la técnica de TUNEL.....	131
RESULTADOS (CAPÍTULO I, PARTE B).....	136
B- Regulación de la actividad de las caspasas-2, -8, -9 y -3 en el CL utilizando un modelo de regulación hormonal de remoción y reemplazo (RCL) en el mono rhesus.....	135
Cuantificación de la actividad de las caspasas-2, -8, -9 y -3 en el CL del mono rhesus en los distintos tratamientos por un método enzimático.....	135
DISCUSIÓN (CAPÍTULO I).....	140
RESULTADOS (CAPÍTULO II, PARTE A).....	147
CAPÍTULO II.....	146
(ESTUDIOS REALIZADOS EN RATAS ADULTAS (<i>RATTUS NORVEGICUS</i> , CEPA SPRAGUE DAWLEY).....	146

<i>A- Expresión y actividad de las caspasas-2, -8, -9 y -3, y su correlación con los niveles de apoptosis en el CL de la rata en el ciclo estral natural (NCL)</i>	147
Indices estructurales y funcionales del CL (peso, niveles de P ₄ , P450scc, actividad de la 20 α -HSD) en los distintos estadios del CL en el ciclo estral de la rata.....	147
Cuantificación de la actividad de las caspasas-2, -8, -9 y -3 en los distintos estadios del CL en el ciclo estral de la rata por un método enzimático.....	151
Cuantificación de los niveles proteicos de la caspasa-3 y su clivaje en los distintos estadios del CL en el ciclo estral de la rata.....	154
Expresión proteica y localización de las caspasas-2, -8, -9 y -3 en los distintos estadios del CL en el ciclo estral de la rata.....	155
Evaluación y cuantificación de la apoptosis en los distintos estadios del CL en el ciclo estral de la rata mediante las técnicas de H&E y TUNEL.....	158
H&E.....	158
TUNEL.....	158
DISCUSIÓN (CAPÍTULO II, PARTE A)	163
RESULTADOS (CAPÍTULO II, PARTE B)	168
<i>B- Expresión y actividad de las caspasas-2, -8, -9 y -3, y su correlación con los niveles de apoptosis en el CL de la rata en la preñez y post-parto</i>	167
Indices estructurales y funcionales del CL (niveles de P ₄ , P450scc, actividad de la 20 α -HSD).....	168
Cuantificación de la actividad de las caspasas-2, -8, -9 y -3 en el CL de ratas preñadas a distintos tiempos de gestación (días 7, 17, 19 y 21) y distintos tiempos post-parto (días 1 y 4 PP) por un método enzimático.....	171
Cuantificación de los niveles proteicos de la caspasa-3 y su clivaje en el CL de ratas preñadas a distintos tiempos de gestación (días 7, 17, 19 y 21) y distintos tiempos post-parto (días 1 y 4 PP).....	174
Expresión proteica y localización de las caspasas-2, -8, -9 y -3 en el CL de ratas preñadas a distintos tiempos de gestación (días 7, 17, 19 y 21) y distintos tiempos post-parto (días 1 y 4 PP).....	176
Evaluación y cuantificación de la apoptosis en el CL de ratas preñadas a distintos tiempos de gestación (días 7, 17, 19 y 21) y distintos tiempos post-parto (días 1 y 4 PP) mediante la técnica de TUNEL.....	178
DISCUSIÓN (CAPÍTULO II, PARTE B)	182
RESULTADOS (CAPÍTULO II, PARTE C)	186
<i>C-Expresión y actividad de las caspasas-2, -8, -9 y -3, y su correlación con los niveles de apoptosis en el CL de la rata luego de la administración in vivo durante la preñez del factor luteolítico fisiológico en roedores (PGF-2α)</i>	185
Indices estructurales y funcionales del CL (niveles de P ₄ , P450scc, actividad de la 20 α -HSD).....	186
Cuantificación de la actividad de las caspasas-2, -8, -9 y -3 en el CL de ratas preñadas (Día 14) a distintos tiempos post-inyección (0, 8, 16, 24 y 36 horas) de PGF-2 α por un método enzimático.....	189
Cuantificación de los niveles proteicos de la caspasa-3 y su clivaje en el CL de ratas preñadas (Día 14) a distintos tiempos post-inyección (0, 8, 16, 24 y 36 horas) de PGF-2 α	192
Expresión proteica y localización de las caspasas-2, -8, -9 y -3 en el CL de ratas preñadas (Día 14) a distintos tiempos post-inyección (0, 8, 16, 24 y 36 horas) de PGF-2 α	194
Evaluación y cuantificación de la apoptosis en el CL de ratas preñadas (Día 14) a distintos tiempos post-inyección (0, 8, 16, 24 y 36 horas) de PGF-2 α mediante la técnica de TUNEL.....	196
DISCUSIÓN (CAPÍTULO II, PARTE C)	199
CONCLUSIONES	204
CONCLUSIÓN GENERAL.....	203
BIBLIOGRAFÍA	206

Introducción

Morfología y función del ovario

En los mamíferos, el ovario es el sitio de almacenamiento y desarrollo de los ovocitos formados durante la vida embrionaria/fetal ó alrededor del momento del nacimiento. La principal función de la gónada femenina es la maduración del ovocito para la fertilización y exitosa propagación de la especie (393). Para esto genera un ambiente propicio para la instalación del cigoto, ligado a cambios inducidos por la transformación del folículo ovulatorio en el cuerpo lúteo (712). Además, el ovario constituye el principal portador de las células secretoras de hormonas femeninas que desarrollan y mantienen los caracteres sexuales secundarios de la hembra, así como también las características adecuadas durante la preñez.

En la rata los ovarios están situados cerca de los riñones a lo largo del borde del músculo lateral psoas y se encuentran rodeados de grasa. Durante la adultez la superficie del ovario es nodular y se encuentra cubierta por una capa monoestratificada de células cúbicas ó poliédricas, llamada epitelio germinal (358). Esta cubierta epitelial está frecuentemente invaginada hacia el tejido conectivo subyacente, llamado túnica albugínea, formando pequeños pliegues, hoyos ó criptas. Por debajo se encuentran dos zonas: la llamada zona cortical y la zona medular, y el límite entre ambas no se encuentra bien definido. La primera comprende al estroma ovárico (formado por tejido conectivo laxo, fibroblastos y precursores de células tecales), y folículos en distintos estadios de maduración, atrésicos y cuerpos lúteos. La zona medular que se encuentra muy vascularizada e inervada, contiene células de tipo muscular y tejido conectivo laxo (55).

El ovario de mamíferos es, por lo tanto, un órgano heterogéneo en cuanto a la población celular presente en un momento dado, y también lo es en el tiempo, a lo largo de la vida del individuo (ver Figura 1).

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, como endócrinas y nutritivas, que crecen gradualmente en número y forman eventualmente un folículo esférico lleno de líquido. 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.

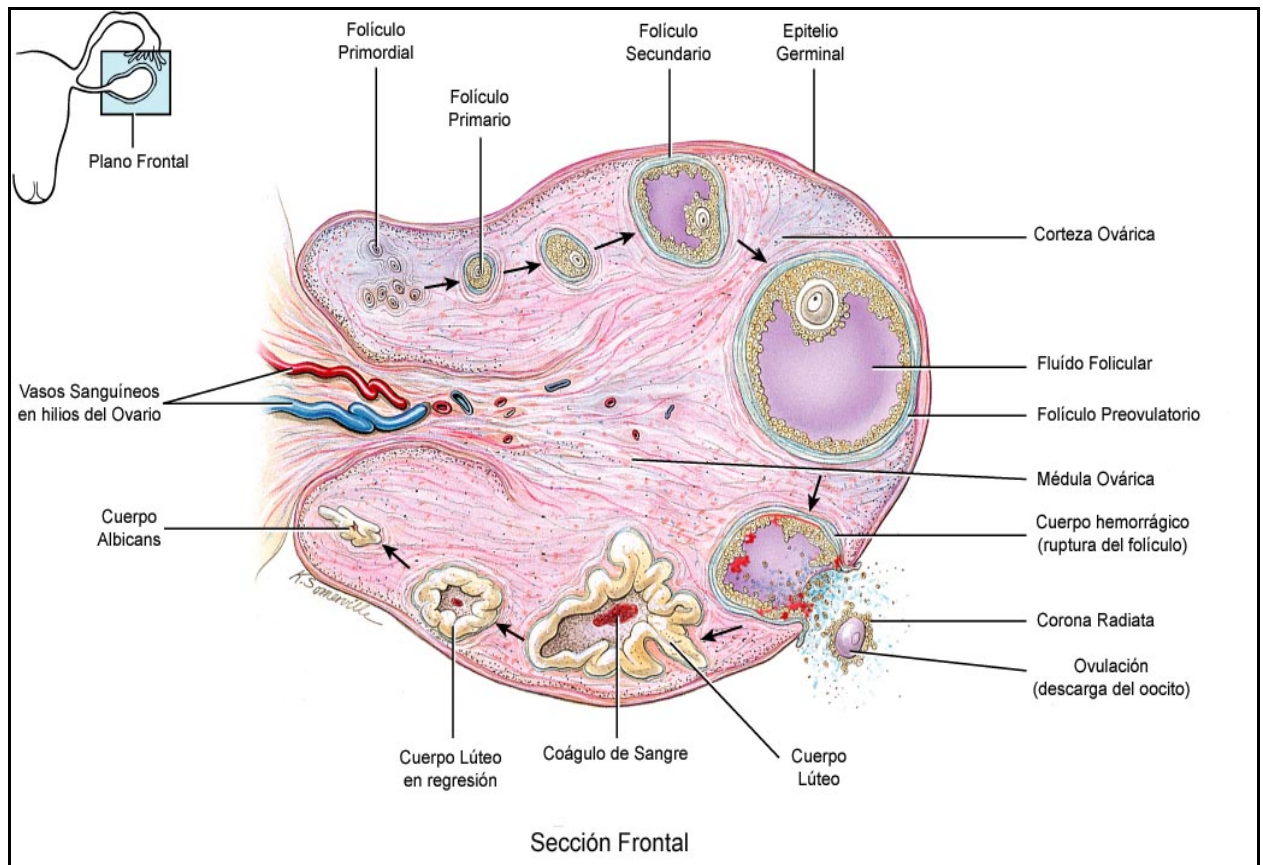


Figura 1. Esquema de un ovario de mamíferos extraído y modificado de Internet

Foliculogénesis

La foliculogénesis (Figura 2) puede ser definida como el crecimiento de los folículos a través de los distintos estadios del desarrollo, desde el momento en que emergen del reservorio folicular durante la ovogénesis, hasta su ovulación o su atresia. Este proceso es llevado a cabo en la corteza del ovario.

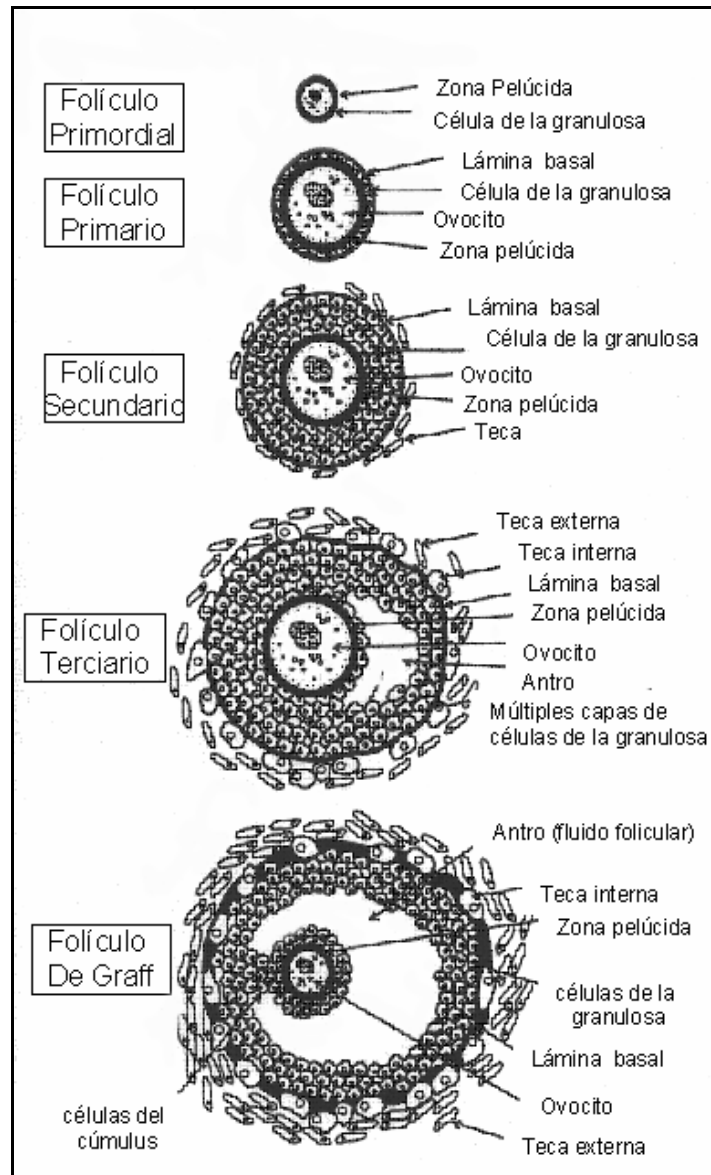


Figura 2. Estructura y clasificación del folículo ovárico durante su desarrollo y crecimiento. Esquema extraído y modificado de Williams (744).

La función del folículo ovárico es la de proveer el sistema de soporte necesario para que la célula germinal femenina, el ovocito, alcance su máximo potencial, es decir que adquiera la capacidad para unirse a una célula germinal masculina, el espermatozoide, para producir un embrión capaz de desarrollarse hasta llegar al nacimiento. 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 necesarios para el crecimiento del ovocito. 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 producidos en el microambiente del folículo, principalmente a través de productos que secretan al fluido folicular que rodea al ovocito. Además, las 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 ovoplasma.

Debido al continuo crecimiento y a la regresión de los folículos, la relación volumen/contenido del ovario, se encuentra en constante cambio(712). El número total de folículos ováricos es determinado en forma temprana en la vida del individuo, y la depleción de este pool, lleva a la senescencia de la vida reproductiva (394). No obstante, actualmente existen controversias acerca de este dogma. En los últimos años, la presencia de células germinales en el ovario de ratones adultos ha sido descrita y publicada por Tilly y colaboradores (304; 305). Sin embargo, otros autores han puesto en duda estos trabajos y las conclusiones derivadas de los mismos (167; 352; 731). Por lo tanto, el dogma de que la ovogénesis ocurre únicamente en la etapa natal en mamíferos se encuentra en amplio debate y se necesita el aporte de nuevas evidencias para tratar de esclarecer las controversias existentes.

El número de folículos formados durante la ovogénesis que posee el ovario como reserva folicular es distinto en cada especie. Al nacimiento, el ovario contiene 20.000, 160.000, y 1.000.000 folículos en ratas, ovejas y humanos, respectivamente.

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 (54), otros como folículos primordiales, primarios, secundarios, y terciarios tempranos y tardíos (42).

Folículos primordiales: En la mayoría de los mamíferos antes o luego del nacimiento, la ovogonia es transformada en ovocitos primarios caracterizados por una profase meiótica prolongada y rodeados por una capa única de células foliculares aplanadas, llamadas de la pregranulosa. En esta fase, las superficies del ovocito y de las células foliculares envoltoras son lisas y están en estrecho contacto.

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 constituyen la reserva de folículos en reposo, los cuales serán progresivamente eliminados durante la vida reproductiva, y se encuentran principalmente en la periferia de la corteza, inmediatamente por debajo de la túnica albugínea.

Folículos primarios: Los folículos primordiales continuamente abandonan el reservorio para convertirse en folículos primarios. Esta transición implica ciertas modificaciones citológicas en el ovocito, las células foliculares y el tejido conjuntivo adyacente. A medida que el ovocito aumenta de tamaño, la capa única de células aplanadas se convierte inicialmente en una capa de células cúbicas y cilíndricas, y luego mediante mitosis, da origen a las células granulosas que forman un epitelio estratificado. Entre el ovocito y las células granulosas circundantes, se originan espacios donde se deposita una sustancia que representa el inicio de la zona pelúcida, mucopolisacáridos secretados por las células de la granulosa, que más tarde originarán un halo translúcido que rodea al ovocito. La adquisición de la zona pelúcida es una característica del folículo preantral primario. A medida que los folículos aumentan de tamaño, van desplazándose gradualmente hacia el interior de la corteza. Los folículos primarios representan un reservorio de gametas durante el período fértil de la hembra.

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 (56). Estas células poseen uniones estrechas (“gap junction”) que permiten el acople metabólico con el epitelio, asegurando la nutrición de las capas más internas. 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 (57). La zona pelúcida madura posee glicoproteínas (las cuales tienen propiedades funcionales durante la fecundación), mucopolisacáridos, ácido siálico y ácido hialurónico. En humanos, las células de granulosa del folículo secundario tiene la capacidad de sintetizar los tres tipos de esteroides ováricos (progestágenos, andrógenos y estrógenos) en cantidades limitadas. 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, hormona folículo estimulante (416), de modo que la producción de estrógenos está limitada en parte por el número de receptores para la hormona.

En este estadio, las células de la granulosa conforman una población homogénea y adquieren receptores de alta afinidad para la FSH y hormonas esteroideas (12). La FSH se combina con los estrógenos para ejercer un efecto mitogénico sobre las células de granulosa (242). 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 (hormona luteinizante) baja.

Al final de esta fase denominada preantral, el ovocito detiene su crecimiento y se vuelve competente para reasumir la meiosis. Cuando el folículo alcanza un diámetro aproximado de 0.2 mm y posee de seis a doce capas de células (en humanos), aparecen unos espacios irregulares, llenos de un líquido claro entre las células de la granulosa. Este líquido aumenta en cantidad a medida que crece el folículo y los espacios irregulares que se forman entre las células de la granulosa confluyen para constituir una sola cavidad, denominada antro.

Folículo terciario: Con la aparición de la cavidad antral, el folículo se convierte en folículo terciario, y esta fase se denomina fase antral. 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 las células de granulosa de la teca interna.

El folículo antral está tapizado por un epitelio estratificado de células de la granulosa que presentan un engrosamiento localizado en uno de sus lados llamado células del cumulus, estas células mantienen una estrecha relación con el ovocito. La relación con estas células se vuelve más laxa debido a la gradual aparición del líquido que llena los espacios intercelulares. Al desprenderse el ovocito, una ó más capas de las células del cumulus, permanecen unidas a él, formando la corona radiata, envoltura celular laxa que persiste alrededor del ovocito aún después de la ovulación.

Folículos preovulatorios: Son aquellos que han alcanzado los estadios finales de crecimiento y maduración y han adquirido la habilidad para ovular ante los adecuados niveles de gonadotropina LH ó la administración de hCG (hormona coriónica humana). En los folículos preovulatorios o folículos 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. Estos folículos se caracterizan por una baja tasa mitótica de las células foliculares y una alta relación estrógenos/andrógenos y estrógenos/progesterona en el fluido folicular (contrario a lo que se observa en los folículos atrésicos asociado a pérdida de capacidad de aromatización por parte de las células de la granulosa). Además presentan receptores de LH en células de la granulosa (ausentes ó no funcionales en los folículos atrésicos), alta producción de inhibina y alto flujo sanguíneo comparado a los atrésicos (712).

Regulación del desarrollo folicular

Eje hipotálamo-hipofisario-gonadal

El hipotálamo juega un papel clave en la regulación hormonal de la función reproductiva femenina. Es sabido que el folículo destinado a ser ovulado inicia una secuencia coordinada de eventos que controlan el ciclo menstrual o estral el cual está regulado por el sistema hipotálamo-hipofisario. El hipotálamo está conectado con la hipófisis a través de un sistema porta vascular que sirve de conducto para transportar a las hormonas del cerebro a la hipófisis. El principal factor liberador del hipotálamo que regula la función reproductiva es el GnRH, hormona liberadora de gonadotrofinas. Esta hormona actúa sobre los gonadotropos (células productoras de gonadotrofinas) y estimula la secreción de LH y FSH. La GnRH induce la liberación de las gonadotrofinas por unión con alta afinidad a su receptor en la membrana plasmática de los gonadotropos, a través de la activación de la proteína quinasa C (PKC).

La FSH y la LH son secretadas en forma coordinada para regular el crecimiento folicular, la ovulación y la vida del cuerpo lúteo. Además la correcta secreción de la FSH y la LH requiere que la liberación de la GnRH sea pulsátil.

También es importante mencionar que la liberación de ambas hormonas (FSH y LH) se encuentra afectada en forma negativa y positiva por estrógenos y progestágenos. La estimulación o inhibición hormonal de estos esteroides depende de su concentración, duración y tiempo de exposición en la hipófisis. Además, otras proteínas gonadales modulan la liberación de FSH, entre ellas la activina, la inhibina y la folistatina.

Retroalimentación positiva y negativa

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 actúan sobre las gonadotrofinas liberadas de la hipófisis. La secreción de FSH está regulada negativamente por los estrógenos (321). 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 (774).

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, que inhibe la liberación de FSH de la hipófisis (524). Esta proteína pertenece a la familia de péptidos relacionados estructuralmente con el TGF- β (Transforming Growth Factor beta) y está formada por dos subunidades, α y β (β A y β B), unidas por puentes disulfuro (134). Mientras que otro miembro de esta familia formado por dos subunidades β , la activina, estimula la liberación de FSH (724). Al igual que las inhibinas, el efecto de las activinas sobre la liberación de FSH es independiente de GnRH y requiere una latencia prolongada (36). Las inhibinas y activinas se antagonizan funcionalmente entre ellas. La inhibina disminuye la producción espontánea de FSH y disminuye los efectos a bajas concentraciones de activina. Mientras que, las concentraciones elevadas de activinas superan el efecto inhibitorio de las inhibinas, lo que conduce a una estimulación neta de la secreción de FSH. Por otro lado, la folistatina es una proteína fijadora para la activina que restringe su biodisponibilidad (431) y por lo tanto inhibe y/o disminuye la liberación de FSH.

Reclutamiento inicial y cíclico

El término reclutamiento se ha usado para describir dos puntos claves durante el desarrollo folicular, el reclutamiento inicial y el reclutamiento cíclico.

El reclutamiento inicial se da en forma continua y comienza en cuanto se forman los folículos. Este reclutamiento corresponde al crecimiento de los folículos primordiales hasta el estadio antral temprano (291). 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 un grupo de folículos primordiales a iniciar su crecimiento mientras que otros permanecen en estado quiescente por meses o años. El crecimiento de folículo primordial a primario es independiente de gonadotropinas. Mientras que, el desarrollo de folículo primario a secundario es estimulado por bajos niveles de FSH.

Además, bajos niveles tónicos de FSH se encuentran involucrados en la diferenciación de secundario a terciario (antral).

En contraposición, el reclutamiento cíclico comienza con el inicio de la pubertad y es el resultado del aumento de FSH circulante que es secretada en forma pulsátil (290). Este aumento de FSH durante el ciclo reproductivo recluta a una cohorte de folículos antrales estimulando su crecimiento y rescatándolos de la atresia folicular (395). Este reclutamiento es dependiente de la secreción pulsátil de gonadotrofinas. Durante este período, ocurre la selección del folículo dominante.

Selección del folículo dominante

De la población de folículos que se rescata en cada onda folicular va a haber un número determinado en cada especie que se transforma en dominante y el resto de folículos llamados subordinados, serán conducidos a la atresia folicular.

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 evita que otros folículos sigan madurando (791). La disminución de FSH provoca un descenso de la actividad de la aromatasas dependiente de FSH y como consecuencia limita la disponibilidad de estrógenos en los folículos menos maduros. Esto lleva a la disminución de la proliferación de las células de granulosa y al aumento de andrógenos, provocando una atresia irreversible. El folículo dominante posee una sensibilidad única a la FSH y de esa manera aumenta la proliferación de células de granulosa, lo que le lleva a poseer una mayor cantidad de receptores para esta gonadotrofina. 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 tienen 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 en la rata también de prolactina (PRL) (735; 790). La síntesis de estrógenos provoca la estimulación del pico de LH e induce la expresión de receptores requeridos para la respuesta. Este mecanismo permite la selección de los folículos dominantes hasta llegar a la ovulación.

Teoría dos células-dos gonadotrofinas

La síntesis de hormonas esteroideas está compartimentalizada dentro del folículo. Si bien en humanos cada compartimento retiene la capacidad de producir andrógenos, estrógenos y progestágenos, la actividad de la aromatasa de las células de granulosa excede en gran medida a la observada en células tecales (280; 406), 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 tecales (405). La biosíntesis de estrógenos dada por ambos tipos de células dio origen a la hipótesis “dos células-dos gonadotrofinas” (184). La LH estimula la síntesis de andrógenos a partir del colesterol en las células tecales. 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 (417). Además, la progesterona liberada por las células de granulosa en respuesta a gonadotrofinas, puede difundir hacia las células tecales 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.

En la figura 3 se puede observar un esquema de la esteroidogénesis ovárica.

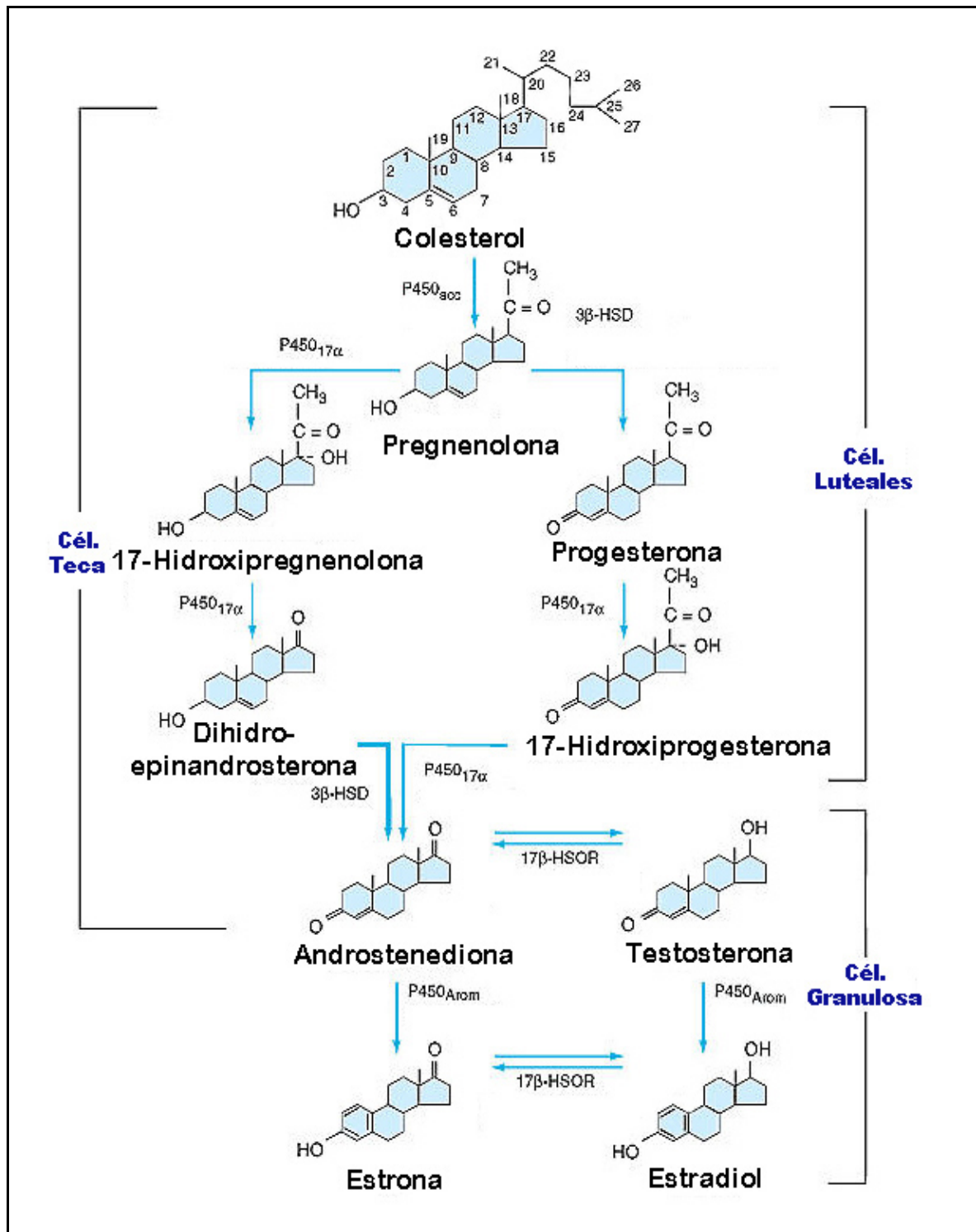


Figura 3. Esquema de la esteroidogénesis ovárica extraído y modificado de Internet

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, el 99,9 % de los folículos sufren cambios degenerativos y este proceso corresponde a un normal funcionamiento del ovario. Esto podría resultar una ventaja evolutiva seleccionando aquellos folículos que contengan ovocitos saludables para finalmente ser ovulados (288). En otras especies de mamíferos, la gran mayoría de los folículos (entre el 70-99%) también es eliminada antes de alcanzar la ovulación. 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). Basándose en la definición estricta, la atresia se refiere a los folículos antrales que sufren cambios degenerativos antes de llegar a la ruptura folicular durante la ovulación.

Los cambios que sufren las células de granulosa a medida que avanza la atresia poseen todas las características de la muerte celular programada o apoptosis.

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 (101). Otra importante función de la progesterona es aumentar la dilatabilidad de la pared del folículo (489). Las prostaglandinas de las series E y F son otros de los componentes importantes involucrados, ya que ayudan a la degradación final de la pared folicular, su concentración aumenta en el folículo preovulatorio y es máxima en el momento de la ovulación (345). Luego del pico preovulatorio se observa un incremento en el flujo sanguíneo y por otro lado, las células de la granulosa cercanas a la lámina basal, comienzan a soltarse debido a la desaparición de las uniones estrechas que las mantenían unidas. El único sitio donde estas uniones no se ven alteradas es en aquellas células que están formando parte de la corona radiata. Otro evento que ocurre

en la ruptura folicular es la digestión proteolítica de la pared folicular. Las colagenasas disuelven la membrana basal y el estroma folicular durante la ovulación.

El cuerpo lúteo (CL)

Introducción

El término *corpus luteum* (cuerpo amarillo) fue empleado por primera vez en 1689 por Marcello Malphigi (362). Sin embargo, fue descrito de manera precisa en 1672 por Regnier de Graaf, quién notó la presencia de cuerpos globulares en ovarios de conejo luego del coito. Los cuales persistían luego del parto y el número de estos cuerpos globulares era proporcional al número de crías (133). En 1898 Prenant sugirió que el CL era una glándula de secreción interna, la cual beneficiaba a los embriones y existía una relación con ellos (500). Dicha suposición fue confirmada removiendo los ovarios o los CL de conejas preñadas y obteniendo como resultado el aborto o la reabsorción de los embriones (185; 186; 359). En 1929, Corner y Allen prepararon un extracto en etanol de CL de cerdo y trataron a conejas preñadas ovariectomizadas, logrando mantener la preñez en dichos animales (126). Simultáneamente en 1934, cuatro grupos independientes aislaron y cristalizaron al factor luteal (24; 81; 265; 599). Dicho factor era una hormona esteroidea, la cual fue denominada progesterona (599).

El CL es una pequeña glándula endócrina transiente que se desarrolla a partir de las células foliculares remanentes del folículo que ha sido ovulado. Su principal función es la de secretar progesterona. Dicha hormona es necesaria en primer lugar para una correcta implantación. Luego de la implantación, su secreción continua es necesaria para el mantenimiento de un útero quiescente y de un ambiente intrauterino que conduzca al desarrollo ininterrumpido del embrión (182; 654).

En la figura 4 se pueden observar distintos cortes histológicos del ovario del mono rhesus en distintos días de la fase lútea.

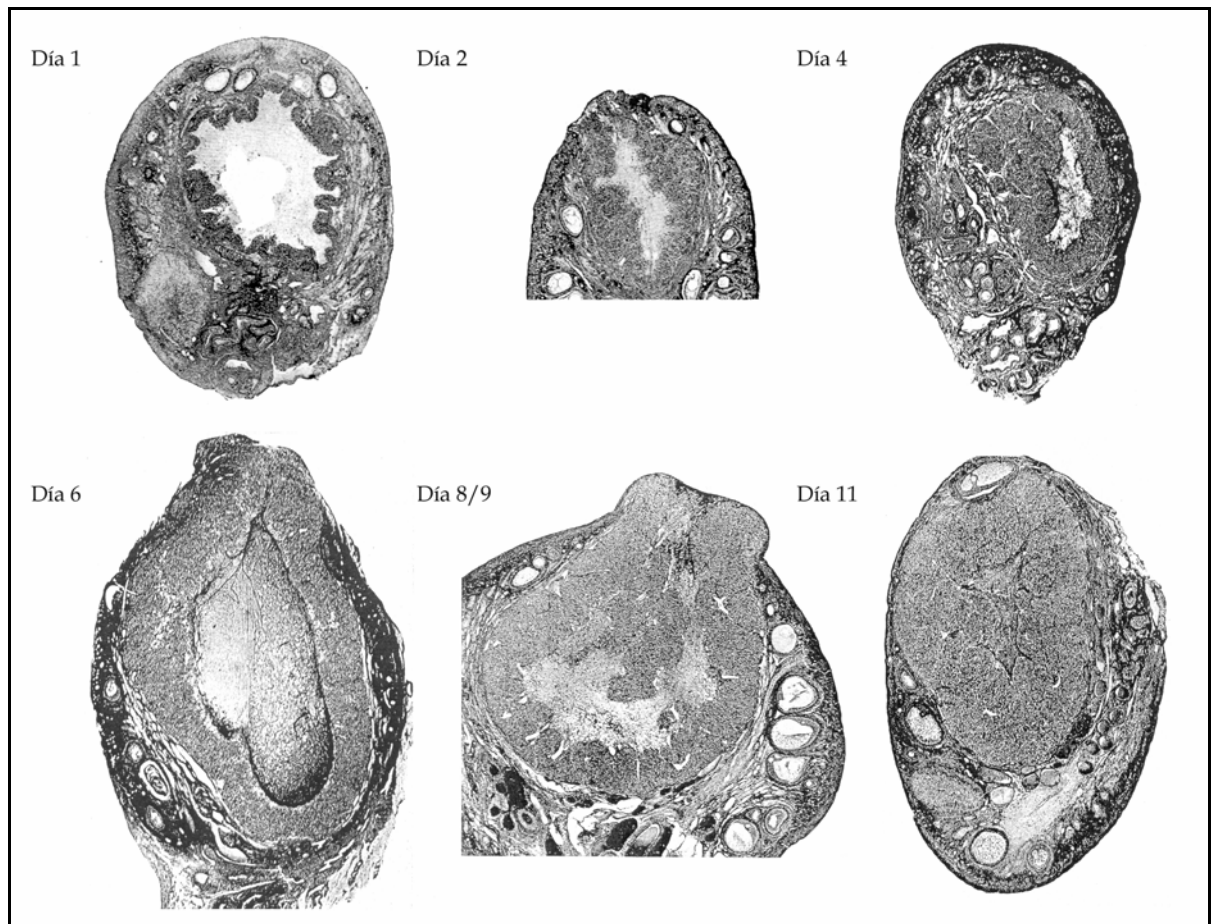


Figura 4. Fotos de cortes histológicos del CL del mono rhesus en distintos días post ovulación. Esquema realizado a partir de fotos extraídas del capítulo de Corner (125).

En mamíferos existen cuatro clases de CLs, de acuerdo a su duración y capacidad de producción de esteroides (625):

- 1- CL del ciclo
- 2- CL de la pseudopreñez
- 3- CL de la preñez
- 4- CL de la lactancia

Solamente el CL de la preñez se encuentra presente en todos los mamíferos. El CL del ciclo no se encuentra en los animales con ciclos de ovulación inducida por el coito, como ser los conejos. El CL de la pseudopreñez no se forma en los primates y el CL de la lactancia sólo se observa en las especies que ovulan luego del parto, como por ejemplo los roedores. Los únicos mamíferos que poseen los cuatro tipos de CLs son los roedores. Pero cabe aclarar, que los CLs del ciclo y de la pseudopreñez en

roedores son considerados experimentales, dado que en la naturaleza estos animales normalmente se encuentran en contacto con machos fértiles que van a dar lugar a la preñez en cada apareo.

Formación del CL

La *luteinización* es el proceso de reestructuración morfológica y bioquímica que ocurre en las células de las paredes del folículo ovulado para dar lugar a la formación del CL (424; 442; 637). Las células que van a sufrir este proceso deben en primer lugar, escapar del ciclo celular y dejar de dividirse. También deben cambiar su expresión génica para poder adaptarse y sobrevivir al nuevo ambiente hormonal. Esta reprogramación que sufren las células foliculares a células luteales es un proceso irreversible.

Escape del ciclo celular: La hormona LH es la responsable de inhibir el crecimiento de las células foliculares y producir el escape del ciclo celular a través de la pérdida progresiva de reguladores positivos del ciclo celular (ciclinas y Cdk2) y el aumento de inhibidores del ciclo (p21cip1, p27kip1), para convertirse en células productoras de progesterona (264; 318; 528; 529). El escape del ciclo celular durante la luteinización ocurre inicialmente en las células de granulosa y luego en forma gradual en las células de la teca.

Cambios de expresión: Un gran número de genes son rápidamente inducidos por el pico de LH de forma transitoria, por lo que se cree estarían involucrados en los procesos de ovulación y luteinización. Entre ellos se encuentran el PR (receptor de progesterona), COX-2 (ciclooxigenasa-2), el factor de transcripción C/EBP β (CATT/enhancer binding protein), Egr-1 (Early growth response protein-1) y el factor de transcripción Nur77 (174; 432; 474; 475; 612).

También son inducidos por la LH distintos miembros de la superfamilia de las metaloproteasas (MMPs) y sus respectivos inhibidores (TIMPs) (319); y factores involucrados en la angiogénesis como el VEGF (Vascular Endotelial Growth Factor) y las angiopoyetinas (343; 751; 752).

Otros cambios importantes producidos durante la luteinización son los cambios de respuesta frente a las señales externas. Estos cambios en la respuesta se deben a que la LH produce el silenciamiento o la estimulación en la expresión de ciertos receptores. La expresión del receptor de FSH es inhibida luego del pico de LH y permanece sin ser expresada en el CL (88). En cambio, la LH estimula la expresión

de su propio receptor y permanece elevada en el CL a lo largo de la fase lútea. Sin embargo, este receptor es primero activado por la LH y luego desensibilizado.

Otros receptores que son estimulados durante la luteinización son los receptores de progesterona (P) y en roedores también el de prolactina (PRL). No obstante, la duración del receptor de progesterona es muy variable y dependiente de la especie. En roedores, es inducido y expresado de manera muy corta durante el proceso de luteinización y luego desaparece (476; 701). Mientras que existen evidencias acerca de la expresión por un período más largo de PR en células luteales del CL en monos y humanos (164; 278; 296). Además, recientemente se ha descrito en roedores la presencia de PR en la membrana del CL, diferente de los nucleares (86). En cuanto al receptor de PRL, el aumento en su expresión se ha observado en roedores y estaría regulado por la LH. En ratas y ratones por ejemplo, se observó que sus niveles permanecen elevados hasta el final de la preñez (117; 555; 697).

En roedores, el ovario expresa ambas isoformas del gen del receptor de estrógenos ($ER\alpha$ y $ER\beta$) pero en el CL la forma predominante es la $ER\alpha$ (194). Se cree que la LH produce una regulación negativa de la isoforma $ER\beta$, interfiriendo en la estabilidad de su ARNm (84; 704). Contrariamente, el CL de primates contiene muy bajos niveles del $ER\alpha$ y una mayor cantidad del $ER\beta$ (112; 152; 481; 570; 655).

En la figura 5 se puede observar el patrón de expresión de diferentes genes en las células de granulosa y teca desde el pico de LH hasta la formación del CL maduro (424).

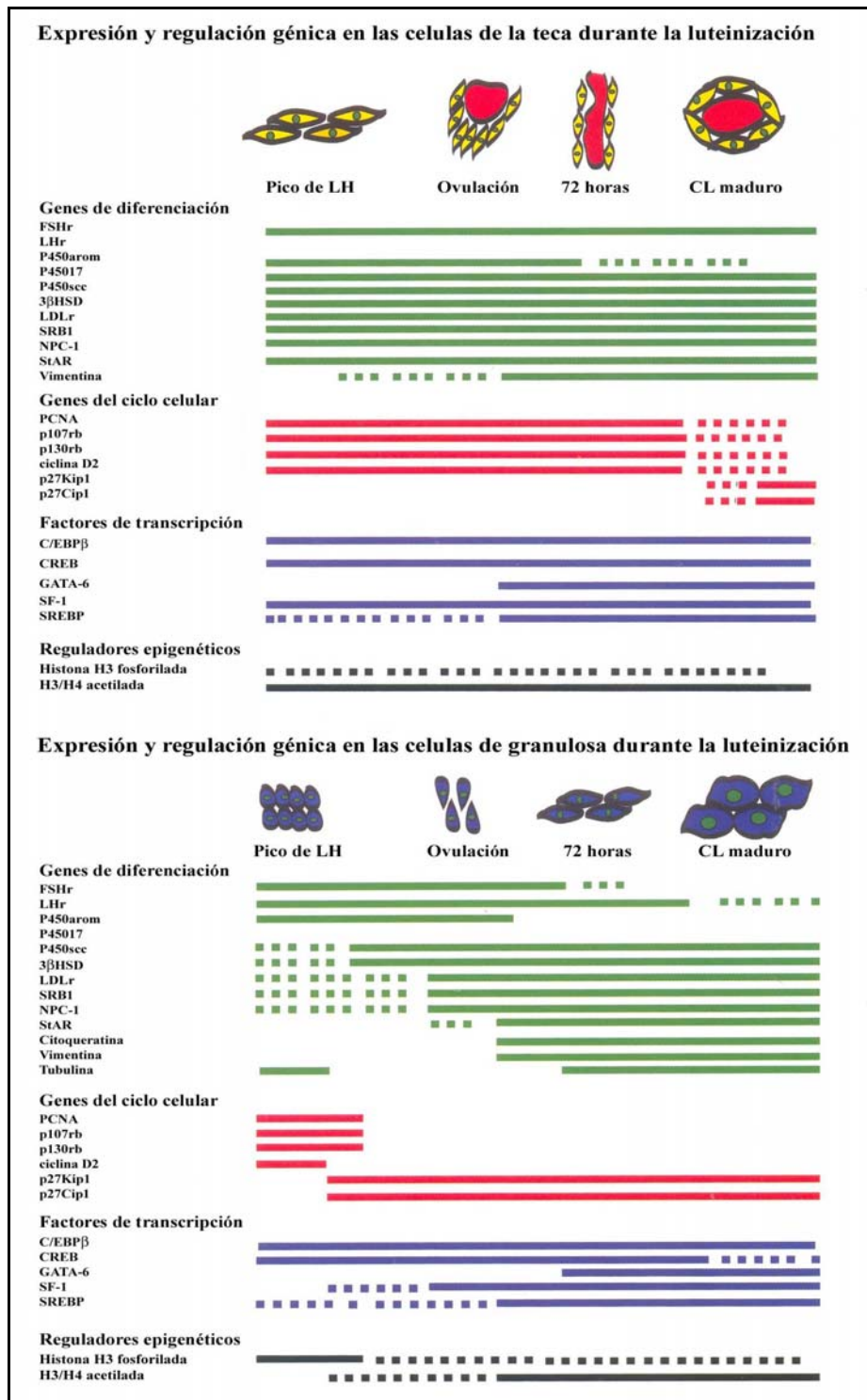


Figura 5. Patrón de expresión de diferentes genes en las células de granulosa y teca desde el pico de LH hasta la formación del CL maduro. Estos datos se basan en observaciones realizadas en roedores, primates y artiodáctilos. Esquema extraído y modificado de Murphy (424).

Regulación endócrina, parácrina y autocrina: Se ha demostrado que la remoción del ovocito induce la luteinización (168), sugiriendo un efecto inhibitorio

del ovocito sobre las células de granulosa del folículo. De esta manera, el ovocito evita que se produzca la diferenciación de las células de granulosa a células luteales antes de la ovulación. Se han demostrado dos efectos directos producidos por el ovocito sobre las células de granulosa. En primer lugar, el ovocito mantiene el fenotipo de las células foliculares aumentando la síntesis de estrógenos e inhibiendo la síntesis de progesterona (725). Y además inhibe la expresión de los receptores de LH en las células de granulosa (172; 173). Los factores del ovocito que inhiben la luteinización aún no se conocen con certeza pero existen diversas moléculas candidatas; entre ellas la BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) (414) y la endotelina (295; 692).

Otros estímulos, además de la remoción del ovocito, pueden inducir la luteinización. Es más, la remoción y/o ausencia del ovocito no es un requisito de la luteinización. De hecho, en algunas especies ocurre de manera espontánea (145) o en ciertas patologías en primates (131; 789), sin evitar la luteinización. Sin duda, el factor más importante que inicia la luteinización y estimula la secreción de progesterona es la LH de origen hipofisario (27; 286). Como se explicó anteriormente, esta hormona es la responsable de inducir el escape del ciclo celular y además de producir los cambios de expresión génica en las células foliculares.

Se cree que la progesterona actuaría en forma parácrina o autócrina induciendo la luteinización o manteniendo el CL. Se ha demostrado que en ratones knock-out para los receptores de progesterona no se produce la ovulación (122). Sin embargo, se obtuvieron cambios morfológicos y funcionales equivalentes a los del proceso de luteinización en ratones knock-out para los receptores de progesterona estimulados con gonadotrofinas (530). En roedores, como se explicó anteriormente el receptor de progesterona es inducido y expresado de manera muy corta durante el proceso de luteinización y luego desaparece. Quizás, los efectos de la progesterona en la luteinización y mantenimiento del CL sean indirectos, a través de la estimulación de una célula efectora intermediaria que secreta un factor parácrino que actúa sobre las células de granulosa o luteales (424).

Transducción de señales intracelulares en la luteinización: La diferenciación a células luteales también implica numerosos cambios en los caminos de transducción de señales.

La vía gonadotrofina-AMPC-PKA ha sido relacionada con la formación y el mantenimiento temprano del CL. Una vez que la subunidad catalítica de la PKA

(cAMP-dependent protein kinase A) se activa es traslocada al núcleo donde fosforila a un gran número de factores de transcripción. Se ha demostrado que el factor de transcripción CREB (cAMP Regulatory Element Binding Protein) se fosforila en respuesta a gonadotrofinas (423; 768). Este factor es fosforilado de manera temprana durante la luteinización de células de granulosa de ratas. No obstante, estas células una vez que son diferenciadas a luteales se vuelven refractarias a la estimulación con AMPc (245). Sin embargo, CREB permanece fosforilado y los niveles de fosforilación son mayores a los encontrados en las células de granulosa. Esto sugiere la participación de otras quinasas además de la PKA. La superfamilia de la MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) ha sido relacionada con la fosforilación de CREB. Además, se han identificado y relacionado distintos miembros de esta familia de quinasas (p38/MAPK, ERK 1/2, JNK, MKK6, MAPKAPK3) en el CL de diferentes especies (109; 136; 361; 502; 580; 644; 677; 765).

La LH no sólo estimula al camino de la PKA sino también activa a la PLC (fosfolipasa C) y por consiguiente produce el aumento de las concentraciones intracelulares de calcio (183; 258; 344). No obstante, la respuesta a la LH sería independiente de la PKC (calcium-dependent protein kinase C) (558).

La expresión de algunos receptores y factores de transcripción ha sido relacionada con el proceso de luteinización (25; 284; 518; 581). Entre ellos, algunos miembros de la familia de receptores Fzd (Frizzled) y sus ligandos (Wnts), los factores de transcripción Foxo4, Fra2 y JunD.

Otro camino de transducción de señales activado luego de la ovulación es el camino comprendido por las proteínas Jak (Janus Kinase) y Stat (Signal Transducers and Activators of Transcription). Pero este camino es activado principalmente por la hormona prolactina.

Luteinización in vitro

Se ha demostrado que *in vitro* las células de granulosa y de teca sufren el proceso de luteinización de manera espontánea y la secreción de progesterona pasa a ser su producto principal de secreción en el medio de cultivo (407; 424). Ambos tipos celulares luteinizados *in vitro* poseen morfología alterada y un aumento del volumen celular de 2 a 3 veces. Este proceso *in vitro* es asociado a la acumulación en las

células de granulosa y tecaes, de gotas lipídicas indicando un aumento en el almacenamiento de colesterol necesario para la esteroidogénesis.

Tipos Celulares

El CL esta compuesto por una población heterogénea de células. Entre ellas, se encuentran las células luteales esteroidogénicas, fibroblastos, células inmunes, células endoteliales y periocitos. Estas últimas células son periendoteliales o murales que rodean a las células endoteliales que estabilizan las paredes vasculares y participan en la regulación del flujo sanguíneo en la microcirculación, (443; 636). La interacción entre los distintos tipos celulares que conforman al CL es muy importante para una correcta función esteroidogénica y mantenimiento del mismo.

Las células luteales esteroidogénicas (grandes y pequeñas; o granulosa y teca-luteínicas) difieren en sus características morfológicas y fisiológicas. En primates, las células de granulosa dan origen a las células granulosa-luteínicas y las células de la teca a las células teca-luteínicas (445). Las células granulosa-luteínicas sufren una gran hipertrofia y son la principal fuente de estrógenos. Mientras que, las células teca-luteínicas no sufren hipertrofia y son la principal fuente de andrógenos. En rumiantes y roedores, las células luteales grandes y pequeñas difieren en su capacidad para producir y secretar progesterona, siendo mucho mayor la capacidad en las células luteales grandes. Además, estos tipos celulares difieren en su respuesta frente al estímulo de distintas hormonas y/o segundo mensajeros (436). Se considera que, en mamíferos no primates las células de granulosa dan origen a las células luteales grandes y las células de la teca a las luteales pequeñas. Sin embargo, existen controversias y falta de evidencias certeras acerca del origen de las células luteales (grandes y pequeñas) en roedores (434; 435). Por ejemplo, la proteína PRAP (PRL-R Associated Protein) es un excelente marcador de las células luteales grandes (148; 400). No obstante, en folículos las células de la teca son las que expresan esta proteína, en lugar de las células de granulosa. Por otro lado, ambos tipos de células luteales son capaces de producir andrógenos y estrógenos.

El gran aumento de tamaño del CL se debe principalmente a la hipertrofia de las células foliculares que dan origen a las células luteales grandes o granulosa-luteínicas (primates), sin embargo su número permanece constante (escape del ciclo celular). En cambio, se produce un aumento en el número de células luteales pequeñas (180) o teca-luteínicas (primates), fibroblastos y células endoteliales.

El grado de migración y entrecruzamiento de las células derivadas del folículo durante la formación del CL varía de acuerdo a las especies. En primates, esta migración y entrecruzamiento es menos exhaustiva que en otras especies y las células de granulosa permanecen separadas de las de la teca, dando origen a las células granulosa-luteínicas y teca-luteínicas, respectivamente (445). Parte de la membrana basal permanece en el CL en estas especies. En la figura 6 se puede observar un corte histológico de un CL de mono rhesus 11-12 días post ovulación donde se puede apreciar que las células teca-luteínicas no se mezclan con las granulosa-luteínicas. En cambio, en la mayoría de los mamíferos no primates el tejido folicular es intensivamente reorganizado durante la formación del CL y se produce la migración de las células derivadas de la teca, células endoteliales y fibroblastos hacia el interior, observándose una proximidad muy cercana entre los distintos tipos celulares. En la figura 7 se puede observar un corte histológico de un CL de oveja donde se muestra el entrecruzamiento de las células luteales grandes y pequeñas además de la presencia de capilares.

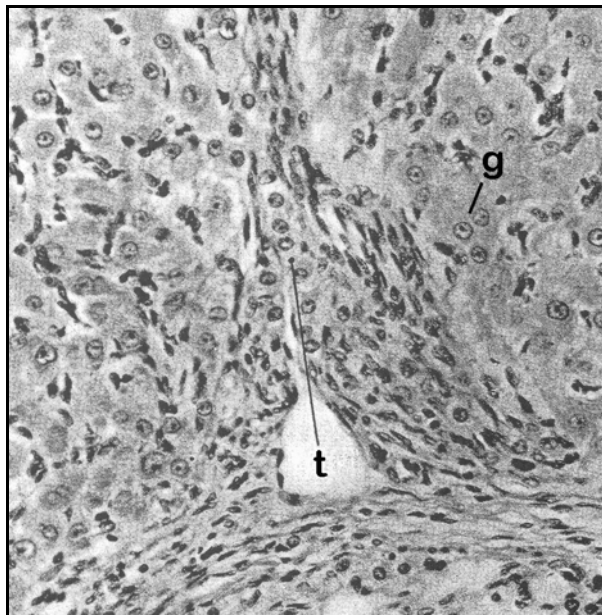


Figura 6. Foto de un corte histológico de un CL de mono rhesus 11-12 días post ovulación donde se puede apreciar a las células de la teca-luteínicas (t) como invaden a las células granulosa-luteínicas (g) pero sin mezclarse. Foto extraída y modificada de Corner y colaboradores (125).

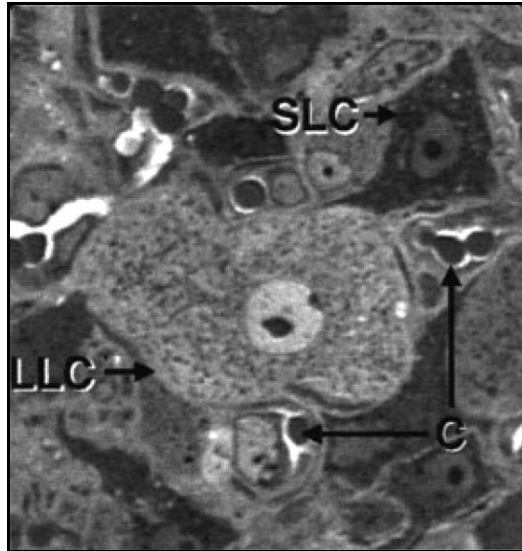


Figura 7. Foto de un corte histológico de CL ovino donde se pueden observar capilares (C), células luteales grandes (LLC) y pequeñas (SLC), extraída del review de Niswender y colaboradores (441).

Para que se produzcan la reestructuración del tejido y la migración celular se deben producir cambios a nivel de la matriz extracelular (ECM). La estructura de esta matriz, compuesta por colágenos asociados a proteoglicanos y glicoproteínas, está regulada mediante la interacción entre proteasas extracelulares específicas y sus respectivos inhibidores. Los componentes de la ECM pueden ser clivados por serin-proteasas y metaloproteinasas de la matriz (MMPs). En rata, se ha observado la importancia de las MMP-2 y -9 en la formación del CL (40; 129; 351). En cambio en primates, se observó que MMP-1 se encontraba altamente expresada en la fase lútea temprana; mientras que MMP-2 y -9 se encontraban altamente expresadas en la fase lútea tardía (775).

Vascularización

El ovario, en especial el CL, es uno de los pocos sitios en el adulto donde el crecimiento, la maduración y la degeneración de los vasos sanguíneos ocurren de manera fisiológica. El desarrollo del sistema vascular en un tejido se produce a través de dos mecanismos: vasculogénesis y angiogénesis. La vasculogénesis consiste en la formación *de novo* de vasos sanguíneos por diferenciación y ensamblaje de precursores mesodérmicos indiferenciados. Estos precursores se unen, se alinean formando cordones que desarrollan una cavidad interna y dan lugar a capilares primitivos. Mientras que, la angiogénesis es el proceso por el cual se desarrollan

nuevos vasos sanguíneos a partir de una vasculatura preexistente, donde vasos ya establecidos producen ramificaciones (“sprouting”) e invaden tejidos en respuesta a estímulos normales o patológicos. Durante la luteinización, la angiogénesis es el mecanismo por el cual se desarrolla el sistema vascular en el CL en formación.

Los cambios en la vasculatura durante el desarrollo del CL son muy marcados (268). En el folículo preovulatorio, la capa de células de granulosa presente es avascular, y sólo se encuentran vascularizadas las células de la teca. Luego de la ovulación, la red vascular presente en las células de la teca se expande hacia la capa avascular de células de la granulosa, formando una densa red vascular en el CL en desarrollo. El desarrollo de la nueva vasculatura requiere la degradación de la matriz extracelular, la proliferación de las células endoteliales, la expansión de los capilares y el desarrollo del lumen capilar (maduración). El proceso de angiogénesis es esencial en la formación y funcionamiento del CL(188; 517). Cabe destacar que su regulación molecular es compleja y los factores angiogénicos descubiertos y propuestos en el CL han ido incrementando (181; 342; 484; 708). Entre ellos se encuentran VEGF, bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), EG-VEGF (Endocrine Gland derived VEGF) y angiopoyetinas. Se ha demostrado que la LH/hCG estimula la expresión de VEGF, EG-VEGF, angiopoyetinas y sus receptores durante la luteinización (187). La vascularización luteal se puede dividir en distintas etapas (ver figura 8): degradación de la ECM, migración y proliferación de las células endoteliales, y producción de ramificaciones (“sprouting”) y estabilización de los vasos sanguíneos. Las diferentes etapas se encuentran reguladas por los distintos factores angiogénicos y son estimuladas por la LH.

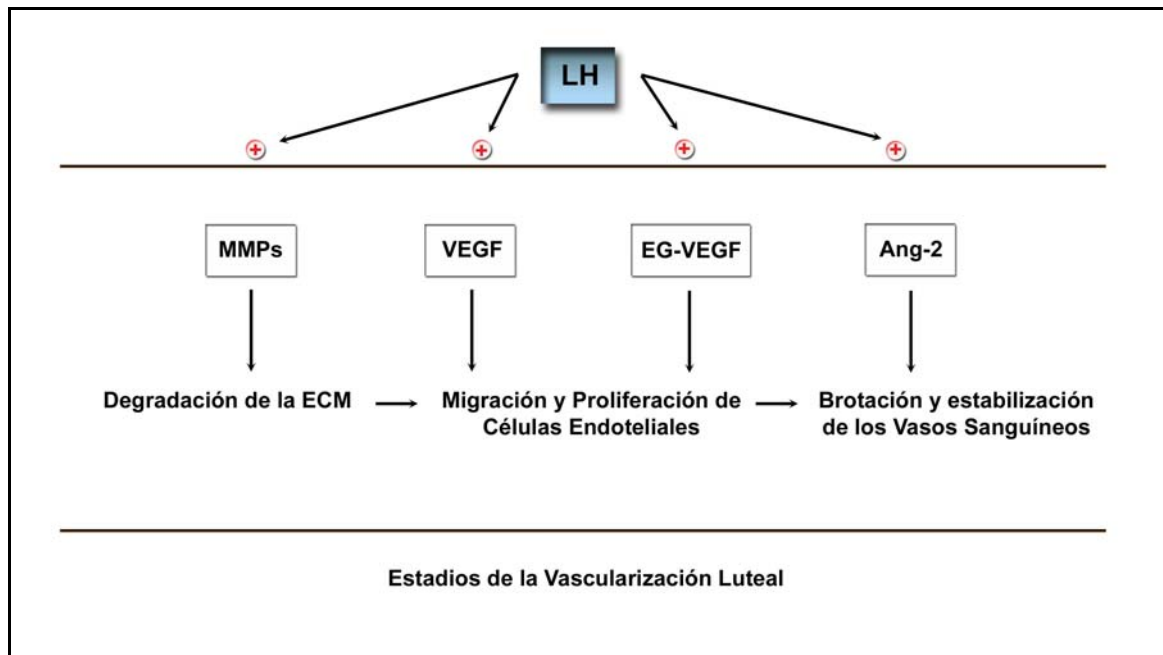


Figura 8. Esquema de los estadios de la vascularización luteal, modificado y extraído del review de Stocco y colaboradores (635).

Función del CL: Esteroidogénesis

La principal función del CL es sintetizar y secretar progesterona. También el CL es capaz de producir otros esteroides dependiendo de la especie y estado reproductivo. En la figura 9 se observa un esquema de la esteroidogénesis luteal.

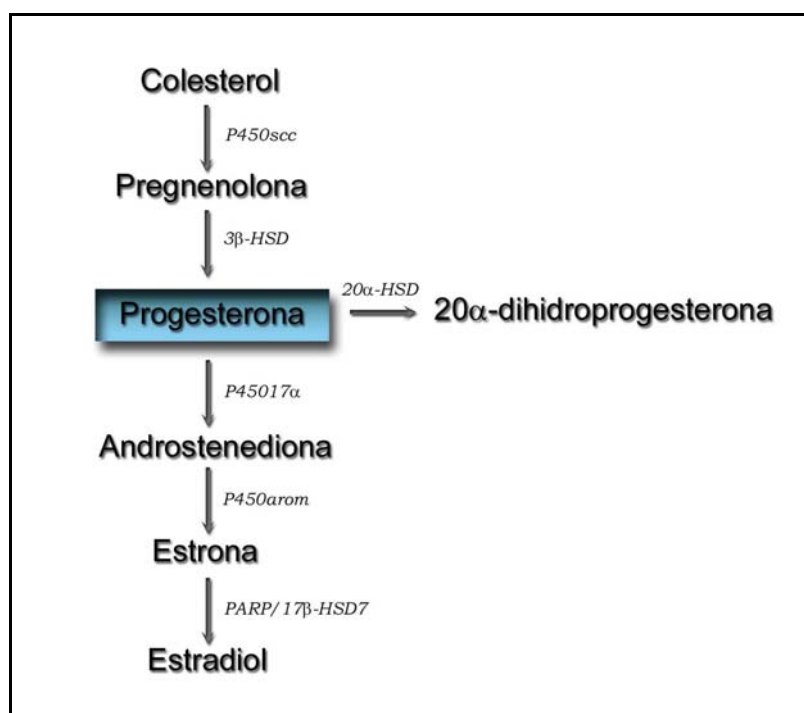


Figura 9. Esquema de la esteroidogénesis luteal.

Fuentes de colesterol y su transporte

Las hormonas esteroideas pueden clasificarse de acuerdo a su función biológica y estructura química, en tres clases: progestágenos, andrógenos y estrógenos. Las tres clases son sintetizadas a partir del colesterol, el cual puede ser obtenido de tres fuentes distintas:

- a) incorporación del mismo a partir la circulación sanguínea, unido a lipoproteínas;
- b) hidrólisis de ésteres de colesterol almacenados en gotas lipídicas citoplasmáticas dentro de la célula;
- c) síntesis *de novo* en la célula.

El suministro constante de colesterol es necesario para la síntesis de las hormonas esteroideas en el CL. La importancia relativa de cada una de las tres posibles fuentes varía de acuerdo a la especie, el tipo celular involucrado y el estado fisiológico (658). Sin embargo, está ampliamente aceptado que la principal fuente de colesterol en las células luteales es el colesterol transportado por lipoproteínas

plasmáticas (292; 454; 479). Dentro de los complejos lipoproteicos se encuentran los de baja densidad (LDL) y los de alta densidad (HDL). 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 en el ovario. De esta manera, aumenta la entrada de colesterol a la célula y la formación de ésteres de colesterol. Las partículas de LDL se unen al receptor presente en las células luteales y el complejo LDL-receptor es internalizado por endocitosis. El colesterol contenido en la partícula de LDL una vez internalizado es hidrolizado en los lisosomas, generando colesterol libre. Este colesterol es luego utilizado para la síntesis de hormonas esteroideas, esterificado y almacenado o incorporado como constituyente de la membrana celular, mientras que el receptor es reciclado o degradado. Los ésteres de colesterol forman gotas lipídicas, las cuales han sido ampliamente usadas como característica morfológica de células esteroideogénicas. Existe un equilibrio entre los ésteres de colesterol en sus depósitos intracelulares y el colesterol libre, mantenido por el balance entre dos enzimas: la colesterol éster sintetasa y la colesterol esterasa. Las actividades de estas dos enzimas están sujetas a control hormonal, y además dependen de los niveles intracelulares de colesterol (658). La hidrólisis de los ésteres de colesterol por la colesterol esterasa es uno de los primeros puntos de control de la esteroideogénesis. La activación de esta enzima se produce cuando es fosforilada por la PKA (85; 495; 718).

La captación de colesterol a partir de HDL difiere de la de LDL debido a que en este caso, la partícula de HDL se une al receptor y el núcleo de colesterol esterificado es liberado a la membrana plasmática sin la endocitosis del receptor. Las células luteales en roedores se unen a ambas partículas de lipoproteínas (LDL y HDL), no obstante su principal fuente serían las partículas de HDL (77; 578). En distintas especies se ha observado que la expresión del receptor de HDL (SR-BI) aumenta significativamente durante el desarrollo del CL *in vivo* y durante la luteinización de las células de granulosa *in vitro* (348; 512). Por otro lado, se ha demostrado que el estradiol y la LH/hCG aumentan la expresión de este receptor en el ovario de rata (340; 404).

Además, recientemente se ha demostrado en ratones knock-out que la lipasa hepática es necesaria también para una producción óptima de progesterona en el CL (733). Esta enzima facilita la captación y el transporte del colesterol, hidrolizando fosfolípidos y triglicéridos.

La síntesis de esteroides es dependiente del transporte de colesterol hacia la mitocondria y luego de la membrana mitocondrial externa hacia la interna, donde la cadena lateral del colesterol es clivada para formar la pregnenolona. Se creyó por muchos años que el principal paso limitante de la esteroidogénesis era la conversión de colesterol a pregnenolona mediada por la enzima P450 scc (scc por “side chain cleavage”). 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 una proteína identificada como una fosfoproteína de recambio de 30 kDa designada proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR) (115). También, se han descrito otras tres proteínas, la proteína transportadora de esteroides 2, SCP-2 (403; 516; 579), el polipéptido activador de la esteroidogénesis (482) y una proteína homóloga de la endozepina o del inhibidor de la fijación del diazepam, el receptor tipo benzodiazepina periférico, PBR (52), que han sido implicadas en la respuesta esteroidogénica aguda a las hormonas tróficas en la glándula suprarrenal y las gónadas.

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 (349) 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, debido a mutaciones en el gen de la StAR. Estos 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 (116). 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. 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 inicio de la transcripción (661). La expresión de StAR en el CL es

estimulada por LH/AMPC (563) e inhibida por PGF-2 α (565). Sridaran y colaboradores han demostrado la co-expresión de la StAR y del PBR en el CL de ratas preñadas y su importancia en la esteroidogénesis (609; 610).

Síntesis de progesterona

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 está ubicado en la cara que da a la matriz de la membrana mitocondrial interna. Es un complejo multienzimático formado por tres componentes: un aceptor de electrones: el citocromo P450_{scc}, 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. Una vez sintetizada, la pregnenolona abandona la mitocondria y es transportada hacia el retículo endoplásmico liso. Ahí la pregnenolona es convertida a progesterona por una de las isoformas de la enzima 3 β -HSD (hidroxiesteroide deshidrogenasa), la isoforma tipo II (488). La enzima utiliza NAD⁺ como aceptor de electrones y la reacción es irreversible en condiciones fisiológicas. Durante la formación del CL la expresión de las enzimas P450_{scc} y la 3 β -HSD se encuentra fuertemente aumentada permitiendo la síntesis de esta hormona en grandes cantidades (270; 313; 467). Durante la preñez de la rata, ambas enzimas permanecen altamente expresadas en el CL (243; 314), y su expresión es regulada por gonadotrofinas y PRL (275; 306; 312; 369; 370; 617).

Como se mencionó anteriormente, la progesterona es necesaria para una correcta implantación del ovocito fertilizado y para el mantenimiento del embarazo/preñez. También, induce la decidualización 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. Por todo lo expuesto, es muy importante que se sintetizen las cantidades adecuadas de progesterona.

Síntesis de andrógenos y estradiol

El CL también es capaz de sintetizar andrógenos y estradiol. El principal andrógeno en el ovario es la androstenediona. Este esteroide es sintetizado a partir de

progesterona y la conversión a androstenediona se encuentra mediada por la enzima P45017 α -hidroxilasa/C17-20 liasa (P450c17 o CYP17). En ratas, ambos tipos de células luteales (grandes y pequeñas) expresan a la CYP17 y son capaces de sintetizar androstenediona (608; 689). Además, se ha observado la importancia de la estimulación de la CYP17 por la LH durante la primera mitad de la preñez. Seguida de una disminución en su expresión como consecuencia de la caída de los niveles de LH circulantes. En esta etapa de la preñez, la placenta comienza a secretar niveles muy altos de androstenediona (230; 632). En el mono rhesus, la inmunomarcación para la CYP17 fue encontrada únicamente en las células de la periferia y en el tracto vascular, sugiriendo que en el mono sólo las células de origen tecal son capaces de sintetizar andrógenos (559). Otros estudios realizados en primates y humanos sugieren la misma premisa de que las células teca-luteínicas serían las encargadas de sintetizar la mayor parte de andrógenos (468; 561).

Para la conversión de androstenediona a estradiol se requieren de dos enzimas. Primero la conversión a estrona por la P450 aromatasa (P450arom o CYP19) y luego a estradiol por la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo I (17 β -HSD-I). La expresión de la P450arom en el CL fue descrita hace mucho años atrás (274). En roedores y primates, su expresión fue localizada en ambos tipos de las células luteales (pequeñas y grandes; o teca y granulosa-luteínicas) (401; 560). Sin embargo, la presencia de la 17 β -HSD en el CL fue descubierta hace unos pocos años. Originalmente la enzima descrita en el CL se llamó PRAP y luego fue renombrada como PRAP/ 17 β -HSD-7 (399; 449; 478; 523). La 17 β -HSD tipo I se expresa únicamente en las células de granulosa del folículo y desaparece luego de la luteinización (223-225), mientras que la PRAP/ 17 β -HSD-7 es altamente específica del CL (células luteales grandes) y sólo se encuentra en muy bajos niveles en las células de la teca e intersticiales (398; 631). La expresión de estos dos tipos de 17 β -HSD se encuentra regulada de manera opuesta por la LH (226; 522), siendo estimulada la 17 β -HSD-I e inhibida la PRAP/ 17 β -HSD-7. La expresión de PRAP/ 17 β -HSD-7 en el CL ha sido descrita en varias especies incluyendo rumiantes y humanos (477). En primates, altos niveles de estrógenos son producidos y secretados por el CL durante la fase lútea del ciclo menstrual (82). En la preñez de rata, la PRAP/ 17 β -HSD-7 se encuentra altamente expresada cuando los niveles circulantes de LH son bajos (624).

Metabolismo de la progesterona

En los roedores, los niveles de progesterona secretados por el CL no sólo dependen de las cantidades sintetizadas de esta hormona sino también de los niveles de expresión y actividad de la enzima 20α -HSD (20α -hidroxiesteroide deshidrogenasa), la cual convierte a la progesterona en un metabolito inactivo, la 20α -hidroxiprogesterona (20α -OH-P₄). Esta enzima utiliza preferentemente NADPH y su actividad en el CL se encuentra regulada hormonalmente. Se sabe que la PGF-2 α estimula la expresión del ARNm y de la proteína de la 20α -HSD (615; 652). Se ha observado que la 20α -HSD se encuentra aumentada en CLs que van hacia la luteólisis (337). La actividad y/o expresión de esta enzima durante la preñez de la rata es muy baja y aumenta significativamente poco después del parto, junto con la disminución de progesterona (17; 20; 339; 799). Este descenso de progesterona es necesario para que el parto pueda llevarse a cabo en roedores.

El rol de la 20α -HSD en otras especies no está bien definido.

Regulación endocrina del CL

El CL es una glándula endócrina y su función se encuentra controlada por la interacción de distintas hormonas tróficas secretadas por la hipófisis, la decidua y la placenta. Entre ellas se encuentran la LH, la PRL y las proteínas PRL like, el estradiol, los andrógenos y la progesterona.

LH

Es conocida como el principal factor regulatorio de la síntesis y secreción de progesterona en la mayoría de las especies (448). Como se describió anteriormente, la LH actúa a través de su unión al receptor presente en las células luteales, acoplado a la adenilato ciclasa y a la síntesis de AMPc (113); así como también a través del camino de la PLC (440). La LH aumenta la entrada de colesterol a la célula, la formación de ésteres de colesterol y principalmente estimula el transporte de colesterol hacia la mitocondria (111). El aumento de la síntesis de progesterona por la LH fue demostrado tanto *in vivo* (447; 576) como *in vitro* (9; 123; 309; 594; 745). La LH en la mayoría de las especies es esencial y suficiente para la estimulación y mantenimiento de la producción de progesterona por el CL. En primates (incluyendo las mujeres), es ampliamente aceptado que la principal hormona reguladora del CL es la LH o su hormona relacionada, la hCG (656). Sin embargo, en la preñez de roedores el efecto sostenido de la LH no es suficiente para mantener la

esteroidogénesis (623) y depende de una exposición previa del CL a la PRL o proteínas PRL like. Además, la LH no es necesaria a lo largo de la preñez y su efecto es mediado por el estradiol. El efecto sostenido de la LH en la producción de progesterona por el CL en ratas preñadas estaría asociado a la CYP17 y la producción de andrógenos, los cuales son rápidamente convertidos a estradiol. Además, en roedores se observó que la LH estimula la expresión de la P450scc y la P450arom (433; 611). La expresión de la P450scc permanece elevada mucho tiempo después del comienzo de la luteinización, mientras que la expresión de la P450arom disminuye al poco tiempo. Asimismo, se considera que la P450scc se expresa constitutivamente en el CL de la rata (143; 144; 244; 311), aunque puede ser regulada por algunos factores u hormonas.

Cabe aclarar que, la LH además de su conocido efecto trófico, provoca efectos deletereos sobre el CL de rata. La LH reduce la función luteal en la rata durante diestro II del ciclo estral, al final de la preñez y durante la lactancia (249; 497; 640; 769). Se observó que la LH inhibe la conversión de pregnenolona a progesterona en cultivo de células luteales del día 19 de ratas preñadas, e incluso estimula la actividad y expresión del ARNm de la 20α -HSD (363; 641; 643). No obstante, la caída en los niveles de progesterona inducidos por la LH ocurre varias horas antes de que cualquier cambio en la actividad y/o expresión de la 20α -HSD puedan ser detectados (364; 639). Se ha postulado que la bajada progresiva en la actividad de la 3β -HSD y la caída posterior en la síntesis de progesterona podrían inducir la síntesis de prostaglandinas y por lo tanto, aumentar la actividad de la 20α -HSD acelerando la regresión luteal (691).

PRL y proteínas PRL like

Se sabe que la PRL sintetizada por la hipófisis es capaz de estimular la producción de progesterona por el CL en distintas especies, en especial en roedores (409; 521; 537; 707). Sin embargo, no aumenta la esteroidogénesis adecuadamente en la mayoría de las especies (537). En roedores, la PRL es esencial para el correcto funcionamiento del CL en la preñez, sin embargo se cree que no sería importante para el proceso de luteinización durante el ciclo estral (629). Se ha reportado que el pico preovulatorio de PRL en la noche del proestro estimularía la regresión del CL del ciclo anterior (69; 207; 218). Mientras que, se sabe que el pico de PRL producido por el succionamiento de la cría en el período de lactancia en la rata posee un efecto

luteotrófico en las células luteales, inhibiendo la regresión del CL (256). Por lo expuesto anteriormente, se sugiere un efecto dual de esta hormona en las células luteales. No obstante, el papel principal de la PRL en las células luteales de roedores es el de prevenir el metabolismo de la progesterona, reprimiendo la expresión de la 20α -HSD (16; 19; 796). Esta hormona también posee otras acciones, entre ellas aumentar el número de sitios de unión a las lipoproteínas, aumentar la captación de colesterol, activar a la colesterol esterasa, aumentar la expresión de los receptores SR-BI, la SCP-2, la P450_{scc} y la 3β -HSD. También se observó que la PRL juega un papel importante en la producción y acción del estradiol en el CL (149; 231; 277; 329), y que podría estar involucrada en la vascularización del CL.

Aunque la PRL es esencial para un normal funcionamiento del CL durante la preñez, la PRL es secretada por la hipófisis sólo hasta la mitad de la preñez. No obstante, en roedores (como en humanos) la decidua expresa el gen de la PRL (241; 356; 501) y secreta suficientes cantidades de esta hormona para mantener el funcionamiento del CL durante unos días hasta que el trofoblasto comienza a sintetizar las proteínas PRL-like o lactógenos placentarios (LP). Existen dos tipos de lactógenos placentarios, I y II (LP-I y LP-II, respectivamente) y ambos se unen al receptor de PRL y mantienen el funcionamiento del CL hasta el momento del parto (350; 628). LP-I posee una función trófica en la mitad de la preñez, mientras que LP-II juega un papel importante en la etapa tardía de la preñez.

La PRL, además de su efecto luteotrófico, ha sido involucrada en la inducción de la luteólisis estructural desde hace varios años atrás (169), y dicha regresión estructural sería a través de un proceso de muerte apoptótico (373). Como se mencionó anteriormente, en el ciclo estral de roedores el pico preovulatorio de PRL en la noche del proestro estimularía la regresión del CL del ciclo anterior (68; 208; 217). La estructura del CL es conservada intacta por más de un mes en caso de realizarse una hipofisectomía en ratas luego de la formación del CL o mediante el bloqueo del pico preovulatorio de PRL con un agonista dopaminérgico (365-367). El CL de estos animales secreta principalmente 20α -OH-P₄ en lugar de progesterona y si se les administra PRL sufren una regresión estructural rápida (690). Parecería entonces que, la PRL causa la regresión estructural del CL sólo si éste no fue previamente expuesto a la PRL por al menos 2 días y si se encuentra produciendo 20α -OH-P₄ (622). El efecto apoptótico producido por la PRL podría no ser un efecto directo en las células luteales, sino a través de la participación de células del sistema

inmune las cuales poseen receptores de PRL (118). Los monocitos/macrófagos han sido asociados a la involución luteal en distintas especies (73; 271; 672). En la rata la invasión de estas células se encuentra iniciada por la PRL (67; 213). La PRL también podría facilitar el reclutamiento y unión de los monocitos/macrófagos a las células endoteliales luteales induciendo a MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1) y a ICAM-1 (Intracelular Adhesion Molecule-1) (463; 464). Asimismo, la PRL estimularía la expresión de Fas-L en las células inmune (331; 334) y Fas-L interaccionaría con su receptor (Fas) presente en las células luteales, induciendo la muerte celular de éstas últimas (627). Por otro lado, se ha demostrado que en la regresión luteal inducida por la PRL aumenta la actividad de las metaloproteasas MMP-1 y MMP-2 (170; 171; 250). A pesar de que existen muchas evidencias del papel de la PRL en la remoción del CL del ciclo, no se conoce aún si esta hormona jugaría un papel importante en la remoción del CL al final de la preñez/embarazo.

Estradiol

En roedores, el estradiol actúa como una potente hormona trófica junto con la PRL. Estimula la síntesis de progesterona, la vascularización y la hipertrofia del CL (72; 230; 621). El estradiol aumenta el suministro de colesterol en las células luteales estimulando su síntesis, su captación y su transporte intracelular (35; 227; 315; 402; 507). Una de las acciones críticas de esta hormona es la estimulación de la vascularización, principalmente en la preñez (684). El aumento de la actividad angiogénica en la preñez ocurre primero en la luteinización y luego a la mitad de la preñez donde induce una marcada proliferación de las células endoteliales.

En conejos, el estradiol es la única hormona que se requiere para una fase lútea normal (53). Se ha observado que estimula la expresión de StAR y aumenta los niveles de colesterol en la mitocondria (119; 717).

Contrariamente, hace muchos años fue propuesto por Knobil que el estradiol era un factor luteolítico endógeno que actuaba de forma local en el CL de primates (320). Esto se basó en la habilidad del CL de primates de producir estradiol y en la demostración que su administración sistémica o local inducía luteólisis prematura en monos y mujeres. Sin embargo, estudios posteriores no apoyaron esta premisa del efecto local del estradiol (577) Además, la dificultad de detectar el receptor clásico de estradiol (ER α) en el CL de primates redujo el interés en esta hipótesis. Sin embargo, estudios recientes demostraron la presencia del receptor β (ER β) en el CL de primates

(158), sugiriendo que el papel local del estradiol en el CL de primates debería ser reevaluado.

Andrógenos

Se ha observado que los andrógenos juegan un papel importante en el CL, indirectamente sirviendo como sustrato para la síntesis de estradiol y directamente estimulando la síntesis de progesterona (630). Además, la androstenediona por ejemplo, posee un efecto antiapoptótico en el CL de rata (251). No obstante, los mecanismos de acción de los andrógenos en el CL aún no se conocen.

Progesterona

La idea de que esta hormona producida en el CL de los mamíferos podía actuar localmente de manera que mantuviera la función del mismo fue propuesta hace unos cuantos años por Rothchild (537). Se ha demostrado que la progesterona puede estimular su propia síntesis (693) y además proteger al CL de la muerte celular (253).

En roedores, su acción principal estaría relacionada con la disminución en la expresión de la 20 α -HSD (638; 642; 668; 700), inhibiendo la degradación de la progesterona a su metabolito inactivo. También, se observó un papel protector de la progesterona contra la apoptosis del CL a través de la PRL (252; 335), y una disminución de la expresión del sistema Fas en el CL funcional (333). Aunque no se ha detectado la expresión del receptor clásico de progesterona en el CL de roedores, se ha demostrado que la progesterona posee una alta afinidad por los receptores de glucocorticoides pudiendo actuar a través de los mismos (620; 667). Por otro lado, recientemente se ha identificado la presencia de receptores de progesterona en membrana en el CL de rata (87) y demostrado que éstas poseen proteínas capaces de unirse a la progesterona con muy alta afinidad y especificidad. No obstante, el rol de estos receptores de membrana permanece desconocido.

En primates, aunque el papel de la progesterona en promover la esteroidogénesis *per se* no se conoce, hay evidencias suficientes que sugieren que esta hormona es necesaria para la luteinización del folículo (653). Contrariamente a lo que ocurre en roedores, ambas isoformas (A y B) del receptor clásico de progesterona fueron detectadas en el CL de primates (161; 165; 279), siendo la isoforma B la predominante en el CL del mono rhesus. La progesterona estimula la expresión de su receptor durante la luteinización temprana (107) e inhibe la expresión del ER β en la fase lútea (157). También se observó que la progesterona estimula a la MMP-1 y su

inhibidor TIMP-1 (600). En humanos, como en bovinos, se observó la supresión de la actividad de la principal caspasa efectora -3 por la progesterona (459; 676).

Luteólisis

Introducción-Etiología

El término luteólisis proviene del latín *luteolus* que significa amarillo y el sufijo *lyo* del griego que significa pérdida, disolución, ruptura. Se define generalmente como la pérdida de la función del CL seguida de la involución de la estructura luteal. Durante la luteólisis el CL experimenta numerosos cambios en su capacidad esteroidogénica y su vasculatura, experimentando la reestructuración del tejido y dando lugar al cuerpo albicans o blanco (formado principalmente de tejido conectivo). La luteólisis se divide en dos partes; la luteólisis funcional y la luteólisis estructural. La luteólisis funcional ocurre en primer lugar y se caracteriza por la pérdida de la capacidad de producir progesterona por el CL con una marcada disminución en sus niveles. En cambio, la luteólisis estructural ocurre luego de la caída de los niveles de progesterona y se caracteriza por una completa regresión morfológica del CL. Existen diferencias de acuerdo a las especies en cuanto a la luteólisis funcional y estructural, por ejemplo en roedores. En hámsters ambas etapas de la luteólisis ocurren en el mismo ciclo (257; 376), mientras que en ratas y ratones la luteólisis estructural demora varios ciclos (23). De manera que en el ovario adulto de una rata o ratón se encuentran varias generaciones de CLs. Se ha demostrado además, que estos CLs en regresión mantienen cierto nivel de actividad (producción de esteroides) (209; 211). Resultados similares asimismo fueron encontrados en los monos baboons (102). También es importante tener en cuenta la diferencia en la luteólisis del CL del ciclo (estral o menstrual), la preñez o la pseudo-preñez. Por ejemplo, en ovejas la regresión morfológica del CL luego de la preñez ocurre de manera mucho más lenta que la que ocurre en el CL del ciclo estral (452).

La muerte celular programada o apoptosis ha sido relacionada con la regresión luteal en muchas especies, incluyendo roedores y animales domésticos (29; 38; 66; 215; 220; 247; 260; 267; 308; 372; 575; 634; 679; 696; 756). Sin embargo, no se ha establecido un rol causal.

En primates además, existen controversias acerca de la participación de la apoptosis en la luteólisis. Algunos trabajos demuestran que las células luteales mueren por apoptosis (189; 221; 585; 664; 728; 771; 787). Mientras que, otras publicaciones

proponen, en cambio, que la autofagocitosis estaría involucrada en la muerte de las células luteales (191; 418; 508). En este tipo de muerte celular la destrucción del núcleo se encuentra retrasada y el citoplasma es activamente destruido mucho tiempo antes de la observación de cambios nucleares. Además, la autofagocitosis es un tipo de muerte celular independiente de caspasas.

Por estas observaciones es que consideramos muy importante estudiar el rol de la apoptosis y los mecanismos involucrados en la luteólisis del CL en diferentes especies. Cabe destacar que el estudio de la expresión y/o actividad de diversas caspasas en el CL ayudaría a dilucidar el mecanismo por el cual se produce la luteólisis, dado que la autofagocitosis es un proceso de muerte celular independiente de estas proteasas.

Apoptosis

En 1972, el australiano John Kerr y sus colaboradores escoceses Andrew Wyllie y Alastair Currie descubrieron los diferentes aspectos de las células en la muerte programada y en la patológica. Para distinguirlas, llamaron apoptosis a la primera, en oposición a la necrosis (muerte patológica de un conjunto de células o tejido del organismo, provocada por un agente nocivo). En griego antiguo, la palabra apoptosis significa “acto de caer”, como caen los pétalos de las flores y las hojas de los árboles en otoño, y fue elegido porque sugiere pérdidas benéficas – la muerte celular, en este caso-, necesarias para el buen funcionamiento y la supervivencia del organismo (357).

La apoptosis o muerte celular programada es un evento que se caracteriza por la formación de fragmentos celulares sellados, llamados cuerpos apoptóticos, evitando la inflamación causada por la liberación descontrolada del contenido intracelular, tal como ocurre en la necrosis. Como consecuencia del complejo mecanismo bioquímico involucrado en la apoptosis, se producen alteraciones estructurales específicas, tales como, formación de ampollas (“blebbing”) en la superficie celular, retracción celular, condensación de cromatina, con persistencia de la integridad de la membrana plasmática. Este último hecho diferencia claramente a la apoptosis de la necrosis.

Además de estos cambios morfológicos a nivel celular, ocurren cambios bioquímicos a nivel nuclear. La característica principal es la fragmentación que sufre

el ADN como consecuencia de la activación de señales intracelulares que concluyen en la activación de una endonucleasa $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ dependiente produciendo clivajes en el ADN de forma regular entre las unidades nucleosomales. Como resultado de la activación de esta enzima se generan fragmentos de múltiplos de 180-200 pares de bases, que se visualiza como un patrón característico de bandas en geles de agarosa (287).

La apoptosis es un proceso altamente regulado que puede ser inducido, estimulado e inhibido en diferentes etapas. A su vez, la cascada de apoptosis puede ser dividida en tres etapas secuenciales: iniciación, ejecución y muerte apoptótica.

La etapa de iniciación incluye a la inducción de la cascada apoptótica, que puede ser provocado, por ejemplo, por interacciones entre ligandos y receptores que llevan a los primeros eventos proteolíticos por activación de caspasas iniciadoras. Las caspasas son una familia de cisteína-proteasas (sitio activo, la cisteína) intracelulares que clivan a moléculas diana cuyos sitios específicos se encuentran situados a continuación de un residuo de ácido aspártico. El nombre deriva del inglés “cysteine aspartases”.

Las caspasas se encuentran en las células en forma inactiva, llamada procaspasas (zimógeno). La activación requiere su clivaje, el cual puede ocurrir en forma autocatalítica o bien ser inducido por otras caspasas activas.

La etapa de ejecución comienza con la activación de las caspasas ejecutoras. Su activación es llamada "punto de no retorno", ya que una vez activadas estas proteasas ejecutoras degradan una variedad de proteínas que ocasionan daños irreversibles en la célula.

La etapa de la muerte apoptótica, es el resultado de una cascada de eventos muy compleja que finalmente lleva al colapso del núcleo celular y de la célula misma. Aún en la etapa final, la célula no libera componentes intracelulares, evitando de esta manera la reacción inflamatoria.

La apoptosis puede ser inducida por distintos factores/estímulos:

- Unión de ligandos con sus respectivos receptores. Este proceso ocurre con la familia de los factores de necrosis tumoral (TNF).
- Compuestos citolíticos secretados por linfocitos citotóxicos.
- Disminución o ausencia de factores de crecimiento específicos.
- Aumento o disminución de hormonas específicas (ej. Hormonas esteroideas o trofinas hipofisarias).

- Estímulos no fisiológicos, como la ausencia de nutrientes, irradiación, quimioterápicos o calor.

Sobre la base de las interacciones establecidas entre los mediadores de la apoptosis, emergen 4 vías clásicas de señalización de apoptosis en las células de los mamíferos:

- Vía que involucra la señalización inducida por la activación de receptores de superficie, llamados receptores de muerte.
- Vía iniciada por daño del DNA. Esta vía es regulada por la proteína p53 y también por las proteínas de la familia de Bcl-2.
- Vía iniciada por la caída de los factores de crecimientos, que es regulada por la familia de proteínas Bcl-2.
- La cuarta vía es la iniciada por compuestos citosólicos secretados por linfocitos citotóxicos. Estas células liberan granzima B y perforina.

Este conjunto de múltiples señales apoptóticas convergen en la activación de las caspasas, llevando finalmente a los cambios morfológicos que caracterizan a la apoptosis.

Familia de Bcl-2

Una de las vías clásicas de señalización de la apoptosis más importante en el ovario es la vía que involucra la activación de miembros de la familia de Bcl-2. Bcl-2 es el acrónimo de B-cell leukemia/lymphoma 2 y se aisló por primera vez como un protooncogen cuya translocación cromosomal se asociaba al linfoma de células B(720). Esta traslocación conduce a la sobreexpresión de Bcl-2 en células linfoideas ya que queda bajo el control del promotor de la cadena pesada de inmunoglobulina, ocasionando tumorigenesis.

Vaux y colaboradores (1988) fueron los primeros en reportar que Bcl-2 puede prolongar la supervivencia celular. También se vio que reducciones en la expresión de Bcl-2 provocadas por un “antisense” aceleran el grado de muerte celular en ausencia de factores de crecimiento (514; 515) confirmando de esta forma, la importancia de Bcl-2 en la regulación de la supervivencia celular. Por otro lado, se observó que la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 suprime la apoptosis inducida por distintos agentes, tanto in vitro como in vivo (39; 392; 450). Sin embargo, su acción supresora de la apoptosis no es universal y esta proteína no puede evitar la apoptosis en muchas

ocasiones (127; 726), como por ejemplo en el caso de la apoptosis inducida por la ausencia de factores tróficos como la IL-2, IL-6 o el factor neurotrófico ciliar de células dependientes. De esta manera, la supresión de la apoptosis por Bcl-2 está restringida a estímulos apoptóticos determinados y en ciertos tejidos.

La proteína Bcl-2 es homóloga a la proteína Ced-9 del nematode *Caenorhabditis elegans* y se localiza en la mitocondria, en la membrana perinuclear y en el retículo endoplásmático liso. Además de Bcl-2 existen varios miembros en esta familia que pueden ser tanto pro como antiapoptóticos, entre ellos: Bax (Bcl-2 Associated X Protein), Bclx (por splicing alternativo da lugar a las isoformas corta (Bclx-S, proapoptótica) y larga (Bclx-L, antiapoptótica)), Bok (Bcl-2 Related Ovarian Killer), Bad (Bcl-2 Associated Death Promoter), Bod (Bcl-2 Related Ovarian Death), Mcl-1 (Myeloid Cell Leukemia-1) y Bid (BH3 Interacting Domain Death Agonist).

Las proteínas de la súper familia de Bcl-2 se pueden dividir en tres grandes grupos:

- 1- Proteínas antiapoptóticas formadoras de canales con dominios BH (Bcl-2 Homology) (BH1 a 4) y con una secuencia de anclaje transmembrana: Bcl-2, Bclx-L, Mcl-1
- 2- Proteínas proapoptóticas formadoras de canales con todos los dominios BH menos el BH4 (esencial para la inhibición de la apoptosis): Bax, Bak, Bok
- 3- Ligandos proapoptóticos que poseen solamente el dominio BH3 (esencial para su actividad de unión): Bik, Hrk, Bad, Bod y Bid

Los dos primeros grupos de proteínas se cree que se anclan a la membrana mitocondrial, mientras que el tercer grupo de proteínas actúa como ligando que dimeriza con los receptores de la familia de Bcl-2 formadores de canales, anclados en la membrana. Las proteínas de la familia de Bcl-2 ancladas en la membrana mitocondrial (representadas por Bcl-2 y Ced-9) forman probablemente canales iónicos capaces de mantener la homeostasis y evitar la liberación de citocromo c, favoreciendo la supervivencia celular. Estas proteínas también interactúan con Apaf-1 (factor activador de la apoptosis) a través del dominio BH4 para evitar su activación de caspasas asociadas, suprimiendo la cascada de caspasas y por lo tanto la apoptosis. Además de Ced-9 y Bcl-2 muchas otras proteínas de la familia de Bcl-2 (Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 y Bfl-1) tienen una actividad antiapoptótica y dominios funcionales similares pero con un patrón de distribución de tejidos únicos o superpuestos.

Las proteínas del segundo grupo no sólo antagonizan la acción de la supervivencia de las proteínas antiapoptóticas sino que también desencadenan activamente la apoptosis en células transfectadas. Estas proteínas pueden formar heterodímeros con las proteínas antiapoptóticas de Bcl-2 y de esta manera liberan al Apaf-1 de la supresión ejercida por las proteínas antiapoptóticas y producen alteración de las caspasas. Pueden también producir la apoptosis alterando la homeostasis mitocondrial e incrementando la liberación del citocromo c.

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. El dominio BH3 en las proteínas proapoptóticas funciona como un ligando para unirse al dominio receptor de las proteínas antiapoptóticas.

La relación existente entre las proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bclx-L) respecto a las proteínas proapoptóticas (Bax, Bclx-S) funciona como un “reóstato” que determina la susceptibilidad de la célula a la apoptosis (325; 466).

El patrón de expresión de los homólogos de Bcl-2 en los distintos tejidos parece estar bien determinado, algunos se encuentran ampliamente distribuidos mientras otros se encuentran limitados. Los homólogos de Bcl-2 regulan la apoptosis de una manera tejido-específica (285).

En el ovario, la presencia y la regulación de la expresión de Bcl-2, Bax y Bcl-x ha sido documentada en varias especies (471; 472; 551; 714). La presencia de Bcl-2 en el CL humano ha sido descrita por primera vez en 1995 por Rodger y colaboradores, quienes observaron su expresión proteica en las células luteales (granulosa y teca-luteínicas) y en células endoteliales (535). Dicha expresión no variaba a lo largo de la fase lútea ni en respuesta a hCG. Sin embargo, estudios posteriores mostraron que variaba a lo largo de la fase lútea, en el embarazo temprano y en respuesta a hCG (666; 730). Esta misma discrepancia fue descrita para Bax. Rodger y colaboradores tampoco observaron diferencias en la expresión proteica de Bax en la fase lútea (534), mientras que Sugino y colaboradores observaron un aumento de expresión de Bax en el CL en regresión y ausencia en el CL del embarazo (663). Por otro lado, se ha descrito que la administración de un análogo de GnRH produjo una caída en los niveles mitocondriales de Bcl-xL asociados a un aumento en los niveles mitocondriales de Bax y aumento en la fragmentación del ADN en el CL

de ratas preñadas (470) y en folículos preovulatorios (473). Además, en cultivos de células luteales de rata se observó que la apoptosis se encontraba asociada al clivaje de Bid y a la caspasa-9, señalando la participación del camino mitocondrial en la muerte de las células luteales (254). En bovinos, se observó que la administración de PGF-2 α produjo un aumento en la relación Bax/Bcl-2 y en los niveles de Bid truncados, junto con el aumento en la actividad de distintas caspasas y la apoptosis (754).

Como se explicó anteriormente uno de los mecanismos por los cuales esta familia de proteínas regula la apoptosis es a través su homodimerización y/o la heterodimerización con proteínas de su misma familia. Por lo tanto, no sólo son importantes sus niveles sino también sus posibles interacciones con otros miembros de la familia de Bcl-2 y su localización subcelular.

Caspasas

Las caspasas son cisteín-proteasas intracelulares que clivan a moléculas target en sitios específicos situados a continuación de un residuo aspartato. Su nombre proviene del inglés: cysteine aspartases. Hasta la actualidad se han descripto 14 miembros de la familia de las caspasas en células de mamíferos. Estas proteasas presentan una alta homología con el gen de muerte Ced-3 de *Caenorhabditis elegans* y se encuentran presentes en prácticamente todas las células en forma inactiva (proenzima). Esta proenzima puede ser procesada y activada en respuesta a un gran número de estímulos proapoptóticos y/o inflamatorios.

Estructura básica de las caspasas

Contienen cuatro dominios (ver figura 10):

- Un predominio (de tamaño variable, que puede ser largo o corto): 2-25 KDa
- Una subunidad grande: 17-21 KDa
- Una subunidad pequeña: 10-13 KDa
- Una pequeña región entre las dos subunidades

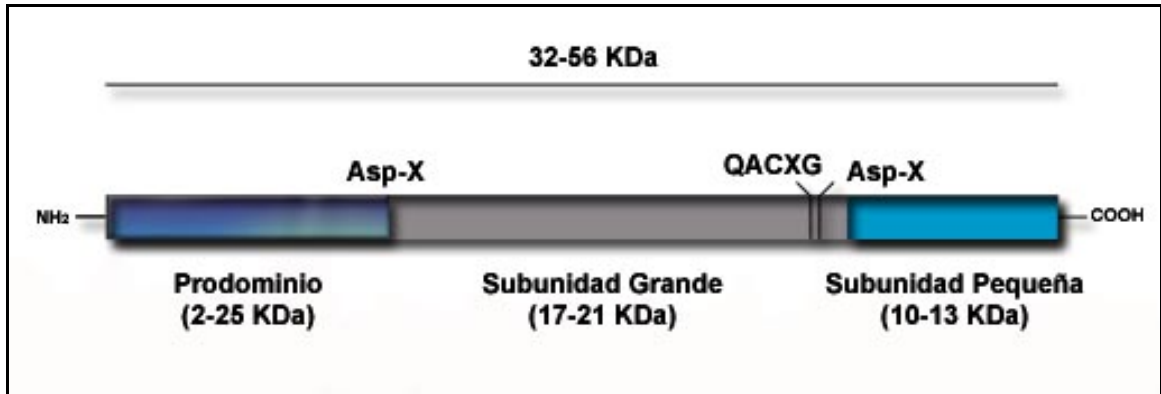


Figura 10. Estructura básica de las caspasas conteniendo los cuatro dominios: predominio, subunidad grande, subunidad pequeña y región conectora.

La activación de las caspasas requiere de un procesamiento proteolítico en residuos de aspartato entre los dominios (ver figura 11), resultando en la eliminación del predominio y de la pequeña región conectora. Luego de este clivaje, la subunidad grande y la pequeña forman un heterodímero. Pero para que esta proteasa se active se debe formar un tetrámero entre dos heterodímeros, y sólo así la caspasa es activa.

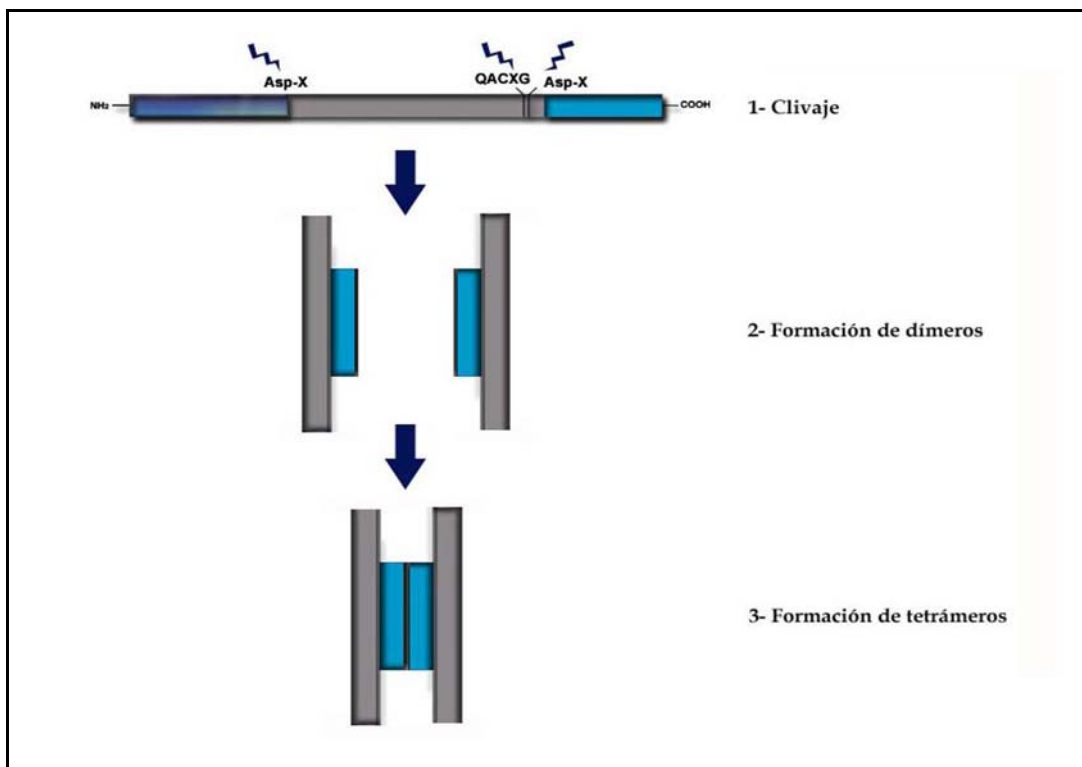


Figura 11. Esquema general de la activación de las caspasas.

Durante la apoptosis estas proteasas clivan a un gran número de proteínas, entre ellas: proteínas estructurales, señalizadoras, reguladores de la transcripción y

traducción, reguladores de la replicación y del ciclo celular, reguladores del clivaje y reparación del ADN, reguladores del metabolismo del ARN, reguladores de la interacción célula-célula, reguladores de citoquinas pro-inflamatorias, e incluso reguladores de la apoptosis misma.

Cabe destacar, que en muchos casos la localización celular de la enzima activa difiere de la localización de la proenzima (ver tabla a continuación). Por lo que las caspasas una vez activadas son traslocadas hacia otro compartimento celular donde se encuentra/n la/s molécula/s target. Por ejemplo, las caspasas efectoras (-3, -6 y -7) necesitan ser traslocadas al núcleo para clivar a sus sustratos nucleares, como ser PARP (Poli-ADP ribosa polimerasa), nucleasas, etc.

Enzima	Forma Inactiva	Forma Activa
Caspasa-1	<i>Citoplasma</i>	<i>Citoplasma, núcleo</i>
Caspasa-2	<i>Citoplasma, núcleo, mitocondria</i>	<i>Núcleo, Golgi</i>
Caspasa-3	<i>Citoplasma, mitocondria</i>	<i>Citoplasma, núcleo, mitocondria</i>
Caspasa-6	<i>Citoplasma</i>	<i>Citoplasma, núcleo</i>
Caspasa-7	<i>Citoplasma</i>	<i>Citoplasma, núcleo, mitocondria, ER</i>
Caspasa-8	<i>Citoplasma</i>	<i>Citoplasma</i>
Caspasa-9	<i>Citoplasma, mitocondria</i>	<i>Citoplasma, núcleo, mitocondria</i>
Caspasa-10	<i>Citoplasma</i>	<i>Citoplasma</i>
Caspasa-12	<i>ER</i>	<i>ER</i>

Existen diversas formas de clasificar a las caspasas:

1- De acuerdo a la secuencia de clivado

Grupo I: Preferencia por WEHD (Trp-Glu-His-Asp): Caspasa-1, -4, -5, 13 y 14

Grupo II: Preferencia por DEXD (Asp-Glu-X-Asp): Caspasa-2, -3 y -7

Grupo III: Preferencia por L/VEXD (Leu/Val-Glu-X-Asp): Caspasa-6, -8, -9 y -10

* No se conoce bien la secuencia de clivado para las caspasas-11 y -12

2- De acuerdo a su estructura y función

Iniciadoras: Caspasa-2, -8, -9 y -10

Efectoras: Caspasa-3, -6 y -7

Activadoras de citoquinas: Caspasa-1, -4, -5, -11 y -13

Otras funciones: Caspasa-12 y -14

3- De acuerdo a sus dominios

En el prodominio existen los llamados dominios de muerte (DD), como ser CARD (Caspase Recruit Domain) y DED (Death Effector Domain). Estos dominios son

responsables del reclutamiento e interacción con otras proteínas. Dependiendo de cual de estos dominios de muerte posean (o ausencia) se los puede clasificar en:

Caspasas-CARD: Caspasa-1, -2, -4, -5, -9, -11, -12 y -13

Caspasas-DED: Caspasa-8 y -10

Caspasas-Efectoras (poseen un prodominio muy pequeño): Caspasa-3, -6, -7 y -14

4- De acuerdo a su secuencia aminoacídica (ver figura 12)

Grupo I: Caspasa-1, -4, -5, -11, -12, -13 y -14

Grupo II: Caspasa-2, -8, -9 y -10

Grupo III: Caspasa-3, -6 y -7

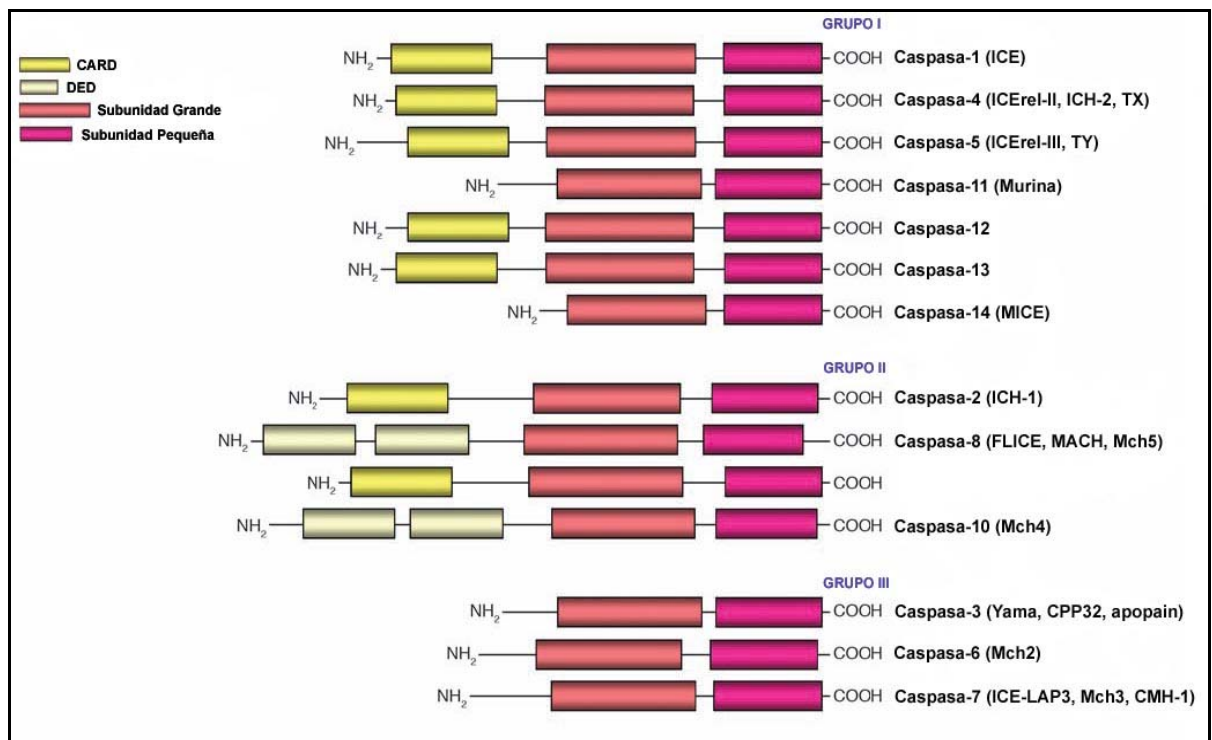


Figura 12. Esquema de los distintos grupos de los miembros de la familia de las caspasas de acuerdo a su secuencia aminoacídica, extraído y modificado de Lavrik y colaboradores (341).

5- De acuerdo a su relación filogenética (ver figura 13)

Subfamilia ICE: Caspasa: -1, -4, -5 y -13

Subfamilia CED-3: Caspasa-2, -3, -6, -7, -8, -9 y -10

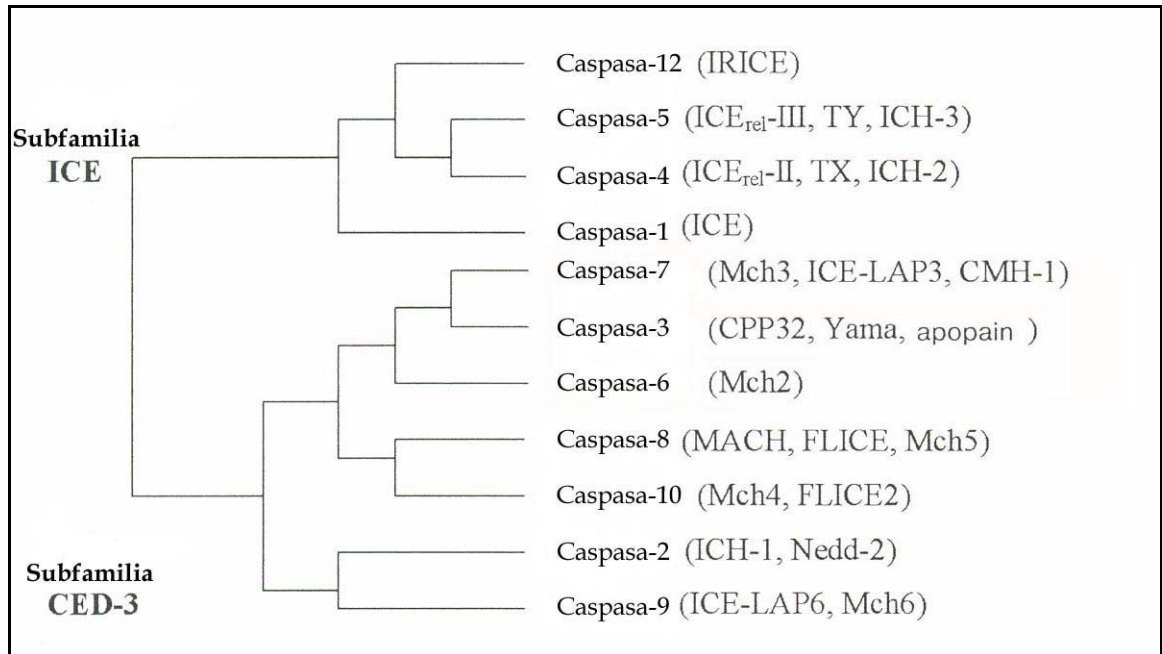


Figura 13. Esquema filogenético de los distintos miembros de la familia de las caspasas

Diferentes miembros de la familia de las caspasas han sido detectados en el ovario de distintas especies (64; 92; 132; 371; 541; 550). En el CL de diferentes especies han sido identificadas caspasas iniciadoras y efectoras (caspasa-1, -2, -3 y -9), también expresadas en los folículos preovulatorios (5; 65; 317; 328; 542). Por otro lado, el aumento en los niveles del mRNA de caspasa-1 en CLs de bovinos se ha correlacionado con el comienzo de la luteólisis (552). En ratones knock-out para la caspasa-3, se ha observado que la actividad de la misma era requerida en la regresión morfológica del CL en caso de no producirse la fertilización (91). Asimismo, luego de la administración de PGF-2 α se ha observado un aumento en la expresión del ARNm y en la actividad de la caspasa-3 en el CL de ovinos (543). Un trabajo reciente utilizando un modelo de ratas pseudopreñadas, manifestó la importancia de las caspasas-3 y -8 en la apoptosis luteal luego del tratamiento con PGF-2 α (762).

Pero es necesario enfatizar que excepto por unos pocos trabajos, la información relacionada con las caspasas y la estructura-función-regresión del CL se

encuentran limitados principalmente a la caspasa effectora -3. Además, la mayoría de los artículos publicados son utilizando modelos farmacológicos y/o artificiales de luteólisis. Cabe destacar que, la importancia que tendría estudiar el proceso de la luteólisis en un modelo fisiológico ha sido resaltado, entre otros, por el último review del área (“The molecular control of corpus luteum formation, function and regression”, Stocco et al, 2006): *“It is important to mention that most of the data on luteal cell death in rodents were obtained from models that are not representative to the physiological luteolytic process that takes place at the end of pregnancy in rats and mice. For instance, most in vivo models use superovulated rats; in this model the CL has not been exposed to the luteotropic effect of placental lactogens that profoundly alter luteal function, as well as the response of luteal cells to luteolytic factors. Studies oriented to examine the apoptotic pathways during the physiological luteolytic process that take place at the end of pregnancy and after parturition in rodents should be conducted to establish the molecular events that lead to apoptosis of luteal cells at this time.”*

Receptores de muerte

La vía extrínseca que involucra la activación de los receptores de superficie llamados receptores de muerte será explicada a continuación cuando se mencione a las citoquinas TNF- α y FasL.

Mediadores de la luteólisis-luteolisinas-factores luteolíticos

Actualmente no se ha podido demostrar con certeza y/o precisión si uno o más factores son los responsables de iniciar tanto la luteólisis funcional como la estructural. Al mismo tiempo, los posibles factores luteolíticos varían entre las especies. De manera que un gran número de factores han sido implicados en el proceso de luteólisis; la PGF-2 α , algunas citoquinas (FasL, TNF- α , INF- γ), cambios en la vasculatura y flujo sanguíneo, niveles elevados de especies reactivas de oxígeno, el óxido nítrico, el camino de la esfingomielina, la endotelina-1 y la PRL (mencionada anteriormente), entre otros.

Las primeras evidencias de que una señal luteolítica podía ser de origen uterino provinieron de estudios realizados en conejillos de india y en conejos, donde la histerectomía prolongaba la vida del CL en estos animales (32; 353). Luego, estudios realizados en animales de granja apoyaron esta teoría (746). Sin embargo, en

humanos y primates no humanos la histerectomía no prolonga la vida del CL, sugiriendo que el o los factores luteolíticos no serían de origen uterino en primates.

En 1969, la PGF-2 α fue propuesta por primera vez como un posible factor luteolítico o luteolisina por Pharriss and Wyngarden (494), debido a que era un potente vasoconstrictor secretado por el útero pudiendo restringir el flujo sanguíneo al ovario e inducir luteólisis.

PGF-2 α

La PGF-2 α es un miembro de la familia de las prostaglandinas (PG). Las prostaglandinas son moléculas lipídicas bioactivas que se sintetizan a partir del ácido araquidónico (ácido graso poli-insaturado de 20 carbonos). El ácido araquidónico se encuentra almacenado en forma de éster en la membrana plasmática y es hidrolizado y liberado por la fosfolipasa A₂ (PLA₂). Una vez liberado, la cicloxigenasa (COX) lo convierte rápidamente en PGH₂. El último paso en la síntesis de la PGF-2 α es la conversión de la PGH₂ a PGF-2 α por la prostaglandina F sintasa (PGFS). Luego de la síntesis, las prostaglandinas son capaces de difundir libremente al espacio extracelular para actuar de manera parácrina y/o endócrina. Se ha identificado un receptor para PGF-2 α denominado FP, del cual se han descrito múltiples variantes por splicing alternativo. EL FP es un receptor de tipo rodpsina acoplado a la proteína G α q con siete dominios transmembrana, ligado al camino de la PLC (liberación de IP3 (inositol trifosfato) y DAG (diacilglicerol)) e incremento en los niveles de Ca²⁺ intracelulares. Evidencias genéticas, bioquímicas y farmacológicas indican que las prostaglandinas serían cruciales para una correcta ovulación, luteólisis, implantación, decidualización y parto.

La PGF-2 α es considerada la principal luteolisina fisiológica en muchos mamíferos y dependiendo de la especie puede ser de origen principalmente uterino o del CL mismo (347; 388; 595; 748) La síntesis de PGF-2 α y la regulación de la misma a nivel del útero han sido extensamente estudiadas (139; 383; 444; 480). Sin embargo, a nivel del CL no se conoce muy bien la regulación de su síntesis y se proponen varios factores moduladores como ser la progesterona, IL-1 β , TNF- α , INF- γ y endotelina-1 (138). En rumiantes se observó que la PGF-2 α aumentaba la expresión de la COX en células luteales (140; 382; 719). Asimismo, provoca la exocitosis de gránulos de oxitocina (132; 387). La liberación de oxitocina por el CL ocurre en respuesta a bajos niveles de PGF-2 α uterina. A su vez la liberación de PGF-2 α uterina

es provocada por la oxitocina pituitaria. De manera que el efecto uterino de la PGF-2 α se encontraría amplificado por una señal autócrina estimulando la síntesis de PGF-2 α en el CL. Así, el útero serviría como transductor de la señal luteolítica, convirtiendo la secreción de la oxitocina central a la producción de PGF-2 α y el CL serviría como un amplificador de la señal uterina (381; 595). En primates, un proceso similar ocurriría pero sin el útero como intermediario y la luteólisis por lo tanto sería un evento mediado por el ovario (380; 595). En este grupo, señales luteolíticas como ser la oxitocina y la PGF-2 α junto con sus respectivos receptores fueron detectados en el CL. Además, se observó que los niveles de PGF-2 α en la sangre de la vena ovárica aumentan en la fase lútea tardía (389).

La unión de la PGF-2 α a su receptor FP ubicado en la superficie de las células luteales, desencadena rápidamente la activación de la PLC, la liberación de Ca²⁺ del retículo endoplásmico, y finalmente la activación de las distintas isoformas de la PKC (132). Además, la PGF-2 α en las células luteales activa al camino de la fosfolipasa D (PLD), produciendo ácido fosfatídico además de DAG (766), y activa a la cascada de MAPK (108; 648; 678). En ratas, se demostró que la activación del camino de la quinasa ERK1/2 por la PGF-2 α en células luteales era mediado por un incremento en los niveles de Ca²⁺ intracelulares de una manera calmodulina-dependiente (647), resultando en la fosforilación de un factor de transcripción expresado constitutivamente en estas células llamado JunD (646). El camino de la ERK puede interferir con la habilidad de las gonadotrofinas de estimular la expresión de StAR y la secreción de progesterona en células luteales (132).

El principal papel de la PGF-2 α es la luteólisis funcional. Se han realizado investigaciones intensivas para determinar el mecanismo por el cual la PGF-2 α reduce los niveles de progesterona secretados por el CL. En roedores, se sabe que no estimula la inhibición de la síntesis de progesterona sino que estimula a la 20 α -HSD desencadenando su metabolismo. Originalmente se demostró que la PGF-2 α estimulaba la actividad de la 20 α -HSD (79; 310; 659). No obstante, luego se observó que la PGF-2 α no estimulaba la actividad de la 20 α -HSD ya existente en el CL, sino que causaba un aumento sorprendente en la expresión del ARNm de la 20 α -HSD (619; 650). Stocco y colaboradores demostraron que en el CL de roedores, la PGF-2 α induce la expresión del receptor nuclear huérfano y el factor de transcripción Nur77, lo que desencadena la estimulación de la transcripción de la 20 α -HSD y la subsecuente disminución en los niveles de progesterona (626; 649). Además, se

observó que la inducción del factor de transcripción Nur77 por la PGF-2 α era mediado por el factor de transcripción JunD (645). Sin embargo, se observó que la PGF-2 α también puede inhibir la expresión y/o actividad de la 3 β -HSD (397; 699). Por otro lado, se demostró que la PGF-2 α además reduce el transporte de colesterol en el ovario de rata disminuyendo la expresión de SCP-2 y StAR (120; 427; 562; 564). Se demostró que la PGF-2 α puede inhibir la estimulación en la síntesis de progesterona producida por la LH y PRL (48). La PGF-2 α inhibe la expresión de los receptores de PRL y reduce la señal de la PRL a través del camino Jak/Stat (128; 618). Recientemente, a partir de un trabajo donde se observó una supresión de la P450arom luteal al final de la preñez por la PGF-2 α , se sugirió que en roedores la PGF-2 α podría reducir la síntesis de progesterona suprimiendo la producción de estradiol por el CL (613).

Por otro lado, el tratamiento con PGF-2 α interviene en el stress oxidativo, reduciendo rápidamente los antioxidantes luteales como por ejemplo el ácido ascórbico, aumentando los radicales superóxidos y disminuyendo la expresión de los genes involucrados en la eliminación de radicales libres (34; 412; 425; 572). La PGF-2 α además, induce la expresión de la endotelina-1 y se cree que ésta aumentaría o potenciaría el efecto anti-esteroidogénico de la PGF-2 α (379). Luego se profundizará en mayor detalle estos dos temas: stress oxidativo y endotelina-1 relacionados con la PGF-2 α .

Se cree que la PGF-2 α podría tener un efecto indirecto en la involución del CL o luteólisis estructural. Sin embargo, se ha observado que la PGF-2 α modula la regulación de diversos genes que podrían estar relacionados con la luteólisis estructural (132; 378). Se demostró que induce la expresión de la MCP-1 en el CL pudiendo facilitar el reclutamiento y unión de los monocitos/macrófagos a las células endoteliales luteales (391; 716). Asimismo, reduce la expresión luteal de TIMP-1 (166). Por otro lado, la PGF-2 α puede regular componentes de la cascada apoptótica. Varios trabajos publicaron que la PGF-2 α incrementa la expresión y/o actividad de distintas caspasas en diferentes especies; ratón, rata, vaca y oveja (544; 764), sugiriendo un papel importante en la activación de estas proteasas y la apoptosis de las células luteales. Carambula y colaboradores sugirieron que la PGF-2 α podría iniciar la regresión luteal *in vivo*, en parte, incrementando la bioactividad o biodisponibilidad de citoquinas como FasL (94). Un trabajo recientemente publicado

demonstró un aumento en los niveles de FasL, Bax y de la actividad de las caspasas en las células luteales de ratas pseudopreñadas luego del tratamiento con PGF-2 α (755).

Sin embargo, el papel de las caspasas y su regulación por la PGF-2 α en la regresión del CL de la preñez en la rata no han sido establecidos. Cabe resaltar que, es importante tener en cuenta las diferencias en la luteólisis del CL del ciclo, la preñez o incluso de la pseudo-preñez.

Citoquinas

Las citoquinas son sustancias polipeptídicas producidas por múltiples tipos celulares, que actúan como modificadores de las respuestas biológicas, como ser la respuesta inmune, la hematopoyesis, la inflamación, etc. Las citoquinas incluyen a los factores de crecimiento celular, las monoquinas (producidas por macrófagos), las linfoquinas (producidas por linfocitos) y muchas otras proteínas producidas por las células endoteliales, los fibroblastos y otros tipos celulares. Dentro de las citoquinas se encuentran el factor de necrosis tumoral (TNF- α), Fas ligando (FasL) y el interferon gamma (INF- γ), que describiremos a continuación.

TNF- α

La superfamilia de TNF está formada por 20 proteínas o ligandos, entre los que se incluye TNF- α , cuya acción principal se desarrolla en el sistema inmune, modulando tanto la inmunidad innata como adquirida, aunque se han descrito funciones no inmunológicas. El TNF- α fue originariamente descrito como una proteína capaz de eliminar células tumorales in vitro. Su principal función es el reclutamiento y estimulación de neutrófilos y monocitos, junto con la inducción y regulación de mediadores de la inflamación, ya que desempeña un importante papel en la protección frente a la infección bacteriana. El TNF- α es una citoquina con un amplio espectro de acciones, habiéndose descrito tanto la inducción de apoptosis (6; 263; 734) como la protección de muerte celular mediada por la activación de NF κ B, factor nuclear kapa B (46; 736; 749). Es producida por un amplio espectro de células como monocitos, macrófagos, linfocitos B y T, células NK (natural killers), así como células no pertenecientes al sistema inmune como fibroblastos y queratinocitos. Ejerce su acción a través de dos receptores, receptores 1 y 2 de TNF- α (TNFR1 y TNFR2), expresados en la mayoría de las células. La unión TNF- α a su receptor, induce la polimerización de sus receptores y el reclutamiento de la proteína

adaptadora TRADD (TNF-R1-Associated Death Domain), la cual se une en una segunda etapa a la proteína adaptadora FADD (Fas-Associated Death Domain), formando un complejo proteico denominado DISC (“Death Inducing Signaling Complex”). Luego de la formación de este complejo, se une al mismo la procaspasa iniciadora -8, o -10 o -2 (menos estudiada/conocida). La unión de las procaspasas induce su propia activación por clivaje autocatalítico y es entonces capaz de activar a otras caspasas efectoras y desencadenar la apoptosis. Esta vía de la apoptosis se llama muerte celular inducida por activación dado que se ve inducida por la activación receptor/ligando y no por la ausencia de estímulos de supervivencia.

El principal receptor responsable de la señalización intercelular parece ser TNFR1, mientras que TNFR2 potencia esta actividad. De esta manera, TNFR2 podría incrementar la sensibilidad de una célula a la estimulación de TNF- α , aunque en condiciones experimentales también se ha observado que TNFR2 puede reducir la respuesta inflamatoria. Ambos receptores pueden presentarse de forma soluble debido a la sección del dominio extracelular del receptor por MMPs en respuesta a señales inflamatorias. Las formas solubles actúan como inhibidores naturales de la actividad de TNF- α , ya que compiten por esta citoquina con los receptores transcelulares, bloqueando su actividad. De esta manera, el papel de TNFR1 y TNFR2 no se limita a la transducción de señales, sino que también ejercen funciones autorreguladoras extracelulares que afectan a la biodisponibilidad de TNF- α .

El ARNm o la proteína del TNF- α ha sido detectado/a en el CL de diferentes especies; entre ellas ratas, conejos, cerdo, vacas y humanos (41; 272; 461; 532; 556; 557; 706; 793). Su origen es principalmente de monocitos o macrófagos, sin embargo se han detectado concentraciones significantes en las células endoteliales del CL (273; 490; 794), y se cree que las células endoteliales del CL son las primeras en sufrir la apoptosis y que el TNF- α sería quien induzca la muerte en este tipo celular (198; 503). La función primordial de los macrófagos en el CL es la de fagocitar a las células luteales degeneradas pero también son responsables de la producción local de citoquinas. Los macrófagos son atraídos y luego se infiltran en el CL durante la luteólisis resultando en el aumento de la producción local de citoquinas (75). Esta acumulación de macrófagos en el CL que esta degenerándose se cree que es en respuesta a factores quimiotácticos, como podría ser la proteína MCP-1. La expresión de TNF- α puede aumentar la expresión de MCP-1 y el número de macrófagos, subsecuentemente acelerando la apoptosis (3). Se ha publicado que las células luteales

de rata son capaces de sintetizar TNF- α , así como también de desencadenar la apoptosis al ser inducidas con TNF- α recombinante (2). Por otro lado en bovinos, se ha observado que TNF- α induce la apoptosis en células del CL (687) y que en la luteólisis natural y/o inducida por PGF-2 α los niveles del ARNm del receptor TNFR1 y del TNF- α aumentan en el tejido (197; 439). Zhang y colaboradores sugirieron que citoquinas como el TNF- α podrían modular los procesos de remodelación y angiogénesis en el CL bovino, regulando a la MMP-2 (792). Asimismo, se ha observado que TNF- α posee un efecto citotóxico sobre las células endoteliales derivadas del CL bovino (199). En el CL humano, TNF- α es expresado a lo largo de la fase lútea y se ha observado un pequeño aumento que concuerda con el aumento de la apoptosis durante la muerte luteal (727). En células luteales porcinas se observó que el TNF- α inducía la fragmentación del ADN desencadenando la apoptosis celular, sugiriendo al TNF- α como un factor inductor de la apoptosis en el CL porcino (456). Un trabajo reciente publicó que el TNF- α a bajas concentraciones inicia una cascada positiva entre la PGF-2 α uterina y varios factores luteolíticos (incluyendo al óxido nítrico) para completar la luteólisis prematura en bovinos (598). Sin embargo, se sabe que TNF- α puede tener efectos tanto luteolíticos como luteotróficos, dependiendo de la especie, el estadio del CL o del ambiente. TNF- α puede aumentar el pegado de la hCG, estimulando la síntesis de progesterona en células esteroideogénicas provenientes de folículos preovulatorios humanos (11). No obstante, TNF- α en células luteales derivadas de la etapa media o tardía de la fase lútea inhibe las respuestas a luteotrofinas *in vitro* (8; 10; 496; 737; 767). Se ha observado que la inyección de TNF- α en la etapa funcional del CL del mono rhesus disminuye significativamente la expresión de StAR, TGF- β y sus receptores RI y RII (206). Cabe aclarar que, TGF- β juega un papel importante en la formación y mantenimiento del CL funcional. Por otro lado, los resultados obtenidos a partir de la utilización de un modelo knock-out para el receptor TNFR1, resaltó la importancia del TNF- α como regulador crítico en la regresión luteal (531), dado que estos animales permanecieron arrestados en diestro, no pudiendo continuar con el ciclo estral.

FasL

El receptor Fas (CD95) pertenece a la familia de los receptores que incluyen el receptor para el TNF y el NGF. Este receptor es una proteína de superficie de 36 kDa con un dominio citoplasmático de "muerte celular" conservado. El ligando Fas (FasL

o Apo-1) es una proteína de membrana tipo II de 40 kDa miembro de la familia del TNF que está altamente expresado en linfocitos activados. El FasL es una citoquina capaz de activar el programa de la apoptosis en células que expresan el receptor Fas y que posean la maquinaria genética necesaria. Fas juega un papel crítico en la citotoxicidad mediada por células T y la unión con su ligando provoca la apoptosis de las células. Esta vía apoptótica está implicada en la eliminación de linfocitos activados inservibles o de células infectadas por virus. FasL se une a Fas en la misma célula o células adyacentes, formándose grupos de tres o más moléculas de Fas. A causa de esta agregación, los dominios de muerte intracelulares de estos receptores agrupados por Fas se unen a una proteína adaptadora FADD, formando al complejo DISC. Esta proteína adaptadora, por su parte, se fija además a la forma inactiva de la caspasa-8 la cual experimenta una autoactivación catalítica y activa a otras caspasas efectoras desencadenando la apoptosis.

La expresión y/o acción del sistema Fas-FasL ha sido descrita en el CL de distintas especies. Quirk y colaboradores demostraron que las células granulosa-luteínicas humanas expresaban el antígeno Fas y que eran sensibles a la apoptosis inducida por este sistema (509). Por otro lado, la expresión de Fas en las células granulosa-luteínicas del CL humano fue detectada en la etapa temprana de la fase lútea pero se observó un aumento en sus niveles durante la fase lútea media, mientras que en las células teca-luteínicas la expresión de Fas fue detectada sólo en la fase lútea media (324). En ratas preñadas, se observó un aumento de Fas y de su ligando durante la regresión natural del CL (538). Asimismo, se ha demostrado el desencadenamiento de la apoptosis en respuesta a Fas-L en células luteales de ratones (511). En bovinos, se ha encontrado que el sistema de Fas-Fas ligando media la muerte celular en células del CL (686). Como se comentó anteriormente, se ha sugerido que la PGF-2 α podría iniciar la regresión luteal *in vivo*, en parte, incrementando la bioactividad o biodisponibilidad de citoquinas como FasL (93). Por otro lado, luego del tratamiento con PGF-2 α se observó un aumento en los niveles de FasL, en las células luteales de ratas pseudopreñadas (763). En cultivos de células luteales, se observó reactividad contra FasL y desencadenamiento de la apoptosis como consecuencia del pretratamiento con TNF- α o INF- γ (322). Los autores de este trabajo sugieren entonces que los macrófagos iniciarían la agregación de los linfocitos T en la etapa temprana de la regresión y luego éstos inducirían la apoptosis de las

células luteales, las cuales desarrollarían reactividad contra FasL por el TNF- α y/o el INF- γ .

INF- γ

El INF- γ o interferón de tipo II es una glicoproteína multifuncional de aproximadamente 143 aminoácidos que fue observada por primera vez en leucocitos humanos en cultivo, estimulados por fitohemoaglutinina (PHA) e infectados por el virus Sindbis. El INF- γ es producido principalmente por subpoblaciones de linfocito TCD4⁺ Th1, células CD8⁺, células NK, linfocitos con TCR γ / δ (receptor de la célula T). El INF- γ actúa inhibiendo la replicación viral, influye en el tipo de inmunoglobulinas secretadas por las células B, además aumenta la expresión de moléculas del CMH (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) de tipo I y de tipo II, e incrementa la eficiencia de los macrófagos para eliminar parásitos intracelulares, entre otras funciones. La mayoría de las actividades atribuidas a INF- γ son producidas por proteínas inducidas por esta citoquina intracelularmente. Se han observado dos formas moleculares de 20 y 24 kDa que difieren en el grado de glicosilación y que posee una pequeña secuencia homóloga con INF- α e INF- β . Los INF no actúan aisladamente, sino que influyen y son influidos por la mezcla de citoquinas y las demás situaciones celulares en las que intervienen. Cualquier efecto atribuido a un INF o a cualquier otra citoquina puede ser diferente bajo condiciones distintas.

Se ha demostrado que el INF- γ inhibe la producción de progesterona tanto basal como la estimulada por las gonadotrofinas en células luteales humanas (176; 204; 738). Sin embargo, no se ha observado ningún efecto del INF- γ sobre la producción de progesterona en células luteales aisladas de monos cinomolgus provenientes de distintos días del ciclo (773). Asimismo, esta citoquina es capaz de inducir la muerte en células luteales humanas, bovinas y murinas (49; 104; 510; 671; 685); mientras que posee un efecto luteotrófico en el CL de porcinos (499). Por otro lado, se observó que el INF- γ aumenta los niveles de PGF-2 α en el cultivo de células luteales bovinas (175), pero no en el cultivo de células luteales aisladas de monos cinomolgus del ciclo (772). Un aumento en los niveles del ARNm del INF- γ fue observado en el CL bovino durante la luteólisis inducida por PGF-2 α (438). El tratamiento con indometacina (inhibidor de la PGF-2 α) no fue capaz de reducir el efecto inhibitorio del INF- γ sobre la producción de progesterona, sugiriendo que la PGF-2 α no mediaría el efecto antiesteroideogénico del INF- γ (177). La expresión del

INF- γ no fue detectada en los CL funcionales o comenzando el proceso de regresión en ratones, sin embargo se detectó una elevada expresión del mismo en la etapa tardía de regresión (323). El conocimiento acerca del INF- γ en el CL se encuentra relacionado principalmente a la causa y efecto y no tanto a los mecanismos celulares involucrados. Se demostró que el tratamiento con INF- γ de células luteales esteroidogénicas bovinas produce un aumento en los niveles nucleares del factor de transcripción STAT-1 fosforilado y una rápida inducción del IRF-1 (cytokine-specific transcription factor interferon regulatory factor 1) que permaneció elevada 48 horas post tratamiento (670). La importancia y/o papel del IRF-1 en el CL no se conoce aún pero se sabe que en otros sistemas el IRF-1 se encuentra involucrado en diversos procesos, como ser la inducción de la cicloxigenasa, de la óxido nítrico sintasa, de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad, de las caspasas-1 y-7 y de genes relacionados con la apoptosis (368; 688). Además, el INF- γ puede activar otros caminos de transducción de señales como el de la esfingomielina y regular la secreción de hormonas hipofisarias (TSH, GH, PRL, LH, FSH). Se ha observado que la inyección de INF- γ en la etapa funcional del CL del mono rhesus disminuye significativamente la expresión de StAR, TGF- β y sus receptores RI y RII (110; 206).

Flujo sanguíneo y cambios en la vasculatura

La regresión luteal ha sido atribuida en parte a cambios en el flujo sanguíneo del CL. Existen controversias si estos cambios son causales o son eventos secundarios que contribuyen con la luteólisis. Se han observado cambios agudos en el flujo sanguíneo en respuesta a luteolisinas. Por ejemplo, la administración de PGF-2 α disminuye el flujo sanguíneo en ovarios de rata y conejos (492; 493). Estudios realizados en ovejas demostraron también que la PGF-2 α era capaz de disminuir el flujo sanguíneo simultáneamente con los niveles de progesterona (437; 446). Estos resultados junto con los obtenidos de estudios morfológicos sugirieron que la PGF-2 α afectaba los componentes de la vasculatura del CL. Sin embargo, se observó también que bajos niveles de PGF-2 α eran suficientes para reducir los niveles de progesterona previo a la disminución en el flujo sanguíneo (384). Estas discrepancias pueden atribuirse quizás a las diferencias en la concentración de la PGF-2 α . Los cambios en el flujo sanguíneo podrían ser posteriores a la luteólisis funcional pudiendo, en cambio, estar asociados con la regresión estructural del CL (7). Miyamoto y colaboradores sugirieron que un aumento agudo en el flujo sanguíneo luteal ocurre

como el primer paso de la luteólisis en respuesta a la PGF-2 α y por lo tanto, jugaría un papel importante en el inicio de la regresión luteal (413). Un estudio reciente demostró que el flujo sanguíneo del CL bovino aumenta y disminuye con pulsos individuales de PGF-2 α durante la luteólisis espontánea (235). Sin embargo, otros estudios sugieren que el flujo sanguíneo luteal no sería afectado por la PGF-2 α (298; 469). Por ejemplo en equinos, no se ha podido determinar un aumento o disminución aguda en el flujo sanguíneo previa a la disminución en los niveles plasmáticos de progesterona en la luteólisis fisiológica o inducida con PGF-2 α (233; 234).

Por otro lado, se sabe que la disminución en el flujo sanguíneo puede aumentar las especies reactivas de oxígeno y posiblemente llevar a la muerte celular a las células luteales.

Radicales libres

Los radicales libres son especies químicas que poseen uno o más electrones desapareados, capaces de existir en forma independiente, que se producen en todas las células. La mayoría de los radicales que se producen *in vivo* son originados tanto a partir de las especies reactivas de oxígeno (ROS) como de nitrógeno (RNS). Los radicales libres tienen el potencial de reaccionar con una variedad de especies químicas, ya que participan en un amplio rango de funciones biológicas en la señalización celular (ej. óxido nítrico, NO) y en la enzimología (ej. el rol de los radicales libres unidos a proteínas en el mecanismo de una variedad de reductasas, peroxidasas, catalasas y oxidasas). La mayoría de los radicales libres producidos *in vivo* son oxidantes, capaces de oxidar una gama de moléculas biológicas, incluyendo carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos y nucleótidos. Los ROS pueden provocar daños a nivel del ARN, ADN y proteínas, así como también iniciar la peroxidación de lípidos que pueden comprometer la función o la señalización celular. Como es imposible prevenir la producción *in vivo* de todos los radicales libres, no es sorprendente que se hayan desarrollado en el cuerpo una gran cantidad de defensas antioxidantes.

Se sabe que la disminución de progesterona provocada por PGF-2 α en las ratas se encuentra asociada con un aumento de los ROS, incluyendo los radicales superóxidos (33; 411; 573). El tratamiento con PGF-2 α también produce un aumento en el peróxido de hidrógeno (100; 519; 520), el cual puede inhibir a la LH y al AMPc

pero sin afectar los niveles basales de progesterona (47), e inhibe las proteínas de inducción rápida que median al colesterol dentro de la mitocondria (426).

TNF- α y el INF- γ , solos o la combinación de ambos, estimulan los niveles del NO (26; 597). El NO es sintetizado por la oxidación de la L-arginina por la óxido nítrico sintasa (NOS). En roedores, las células luteales sintetizan al NO y se lo ha relacionado en la regresión luteal como un mediador (299; 302; 465). Asimismo, en bovinos se ha sugerido que TNF- α y NO jugarían un papel crucial en la luteólisis funcional y estructural (596), induciendo la apoptosis del CL modulando la expresión de genes de la familia de bcl-2 y la expresión y actividad de la caspasa-3. No obstante, *in vitro* se ha sugerido que la muerte celular inducida por citoquinas es independiente de NO(303; 491).

Se ha observado que la administración *in vivo* de un inhibidor de la NOS en bovinos, prolonga la vida del CL y además es capaz de atenuar los efectos luteolíticos de la PGF-2 α (300). Asimismo, un estudio reciente sugiere que el NO sería un factor luteolítico con un papel crucial en la regulación del ciclo estral en bovinos induciendo la luteólisis estructural mediante la apoptosis de las células luteales (301; 326). Se ha observado que la PGF-2 α *in vitro* aumenta los niveles de NOS y reduce la síntesis de progesterona en CLs aislados de conejas pseudopreñadas (60; 62; 63; 240). Contrariamente, en ovejas se observó que el NO no tendría un efecto luteolítico en el ciclo estral sino que prevendría la luteólisis (741). Además, se observó la estimulación en la expresión de factores angiogénicos por el NO en el CL de ovejas (44; 732). Aparentemente, el NO podría tener un efecto protector en el CL funcional o por el contrario podría mimetizar el efecto luteolítico de la PGF-2 α dependiendo del estadio del desarrollo del CL (422).

Se cree que el NO no sería obligatorio para la regresión luteal pero la haría más eficiente.

Camino de la esfingomielina

Los esfingolípidos tienen doble papel como moléculas bioactivas: por un lado, actúan como segundos mensajeros en la transducción de señales extracelulares, pero además, regulan la dinámica de las membranas biológicas formando parte de los microdominios de las membranas llamados "lipid rafts".

El camino de la esfingomielina es un sistema de transducción de señal ubicuo y evolucionariamente conservado (30). Su segundo mensajero es la ceramida, que

junto a otros intermediarios (esfingosina o esfingosina-fosfato) son capaces de transmitir la señal iniciada en la superficie celular hacia el núcleo y a otros compartimentos celulares. La ceramida es generada por la hidrólisis de un esfingolípido (esfingomielina) ubicado en la membrana plasmática, por una esfingomielinasa (SMasa). Al menos cinco subtipos diferentes de SMasas han sido identificados basándose en su pH óptimo, localización subcelular y dependencia de cationes. Algunas de estos subtipos pueden ser activadas por el receptor de TNF. La hidrólisis de la esfingomielina es considerada como la principal vía para la producción de ceramida que actúa como transductor de señales que regulan la muerte celular. También, las citoquinas pueden estimular la síntesis *de novo* de la ceramida estimulando a la ceramida sintasa que se encuentra localizada en las membranas de la mitocondria y el retículo endoplásmico. La ceramida se genera (por hidrólisis de la esfingomielina o mediante síntesis *de novo*) como consecuencia de numerosos estímulos tanto apoptóticos como de estrés, incluyendo ligandos de receptores de muerte, drogas quimioterapéuticas, radiación gamma o UV, choque térmico, privación de factores de crecimiento, hipoxia o exposición a cannabinoides.

Uno de los aspectos más importante de la función biológica de los esfingolípidos es su papel en la decisión del destino celular. Mientras que la ceramida activa señales de muerte, la ceramida 1-fosfato y la esfingosina 1-fosfato activan señales de supervivencia celular. Por lo tanto los niveles relativos de estos metabolitos son los que determinarán si la célula entra en apoptosis o si prolifera.

Se ha observado que la ceramida media la inhibición de la actividad de distintas enzimas (P450_{scc}, 3 β -HSD isomerasa, P450_{arom}) producida por TNF- α (567; 568). Por otro lado, se demostró que la esfingosina fue capaz de inhibir el AMPc inducido por LH y forskolina en las células luteales (232; 283; 513), y que el tratamiento con esfingosina de células esteroideogénicas luteales sin estimular produjo una disminución en la producción de progesterona y en la viabilidad celular (282). Se ha observado que Fas media la activación del camino de la esfingomielina en células luteales esteroideogénicas en bovinos (430). Además, el camino de la esfingomielina estaría involucrado en la muerte celular inducida por TNF- α en las células endoteliales derivadas del cuerpo luteo bovino (505).

La PGF-2 α puede aumentar la peroxidación de lípidos e iniciar cambios en la fluidez de la membrana, quizás mediante una reestructuración de los fosfolípidos (97;

99). Asimismo, cambios en la fluidez de membrana se han observado en células luteales durante la regresión del CL (96; 98; 248; 571; 750).

Endotelina-1

La endotelina-1 (ET-1) es un potente vasoconstrictor sintetizado por el endotelio vascular que ha sido relacionado como mediadora de la inhibición esteroidogénica en las células luteales inducida por la PGF-2 α (59; 61; 203; 236; 408; 592). Su expresión es inducida por la PGF-2 α y la oxitocina, observándose una inhibición en la síntesis de progesterona por las células luteales *in vitro* (385). Sin embargo, otro estudio realizado en conejas pseudopreñadas demostró que la PGF-2 α no requería de la ET-1 para producir sus efectos (58). La ET-1 activa a la proteína Gq e inicia las señales asociadas al calcio y a la PKC y la consiguiente activación de Erk, p38 y JNK (429; 662). La activación de la isoforma epsilon de la PKC ha sido relacionada con la disminución en los niveles de progesterona por la ET-1 (205). Por otro lado, se ha observado una relación inversa entre ET-1 y la NO sintasa a lo largo de la vida del CL (536), y que el sistema de NO podría ser un intermediario en la disminución de progesterona por ET-1 (715). Conjuntamente, la oxitocina podría modular la secreción local de ET-1 y PGF-2 α en el CL de bovinos (591). Los niveles del ARNm de la preproET-1 y/o ET-1 son elevados en la etapa media de la fase lútea y aumentan durante la regresión luteal espontánea o inducida por PGF-2 α (51; 237; 239; 346; 455). No obstante, existen controversias acerca del aumento en los niveles de ARNm de ET-1 en la etapa media de la fase lútea (747). Se ha observado también que TNF- α estimula a las células endoteliales para secretar ET-1 en el CL de porcinos (205). Por otro lado, ET-1 puede estimular a la PGF-2 α y a la PGF-E. ET-1, además puede inhibir la síntesis basal de progesterona y la inducida por gonadotrofinas de manera dosis dependiente (238), pero dicho mecanismo permanece desconocido. Asimismo, durante la regresión espontánea del CL en bovinos se ha observado un aumento de la expresión de ET-1, angiotensina-II y PGF-2 α que inducirían una vasoconstricción, reduciendo el flujo sanguíneo (590). Sin embargo, ET-1 por sí sola no sería suficiente para inducir la luteólisis, definida como la pérdida de la función del CL seguida de la involución de la estructura luteal.

Clasificación de ciclos ováricos

Existen distintos tipos de ciclos reproductivos en mamíferos placentarios y se los puede dividir en cinco grandes grupos (ver figura 14):

- 1- Ciclo menstrual: Sólo en primates (monos y humanos)
- 2- Ciclo estral en animales domésticos: Ovejas, vacas, cabras, chanchos y caballo
- 3- Ciclo estral en roedores de laboratorio: Ratas, ratones y hámsteres
- 4- Ciclo estral en animales de ovulación inducida: Conejos, gatos, camellos, visones y hurones.
- 5- Ciclo estral en caninos: perros y lobos.

Cabe destacar, que sólo se profundizarán el ciclo menstrual en primates y el ciclo estral de la rata dado que en esta tesis se utilizaron como grupos experimentales distintos modelos utilizando monos rhesus y ratas Sprague Dawley.

Animales Domésticos: La ovulación y la formación del CL se encuentran reguladas por las gonadotrofinas. Los ciclos ováricos poseen una fase folicular corta y una fase luteal larga.

Animales de ovulación inducida: El desarrollo folicular ocurre en olas durante un período prolongado de receptividad sexual. El estímulo del apareamiento es requerido para la liberación neuroendócrina de LH y por lo tanto para la inducción de la ovulación y desarrollo del CL.

Caninos: Sólo poseen dos ciclos ovulatorios por año. Tanto la ovulación como la formación del CL ocurren bajo control de las gonadotrofinas. La luteólisis del CL no ocurre en caso de no producirse la fertilización y ninguna señal del embrión es requerida para extender la vida del CL.

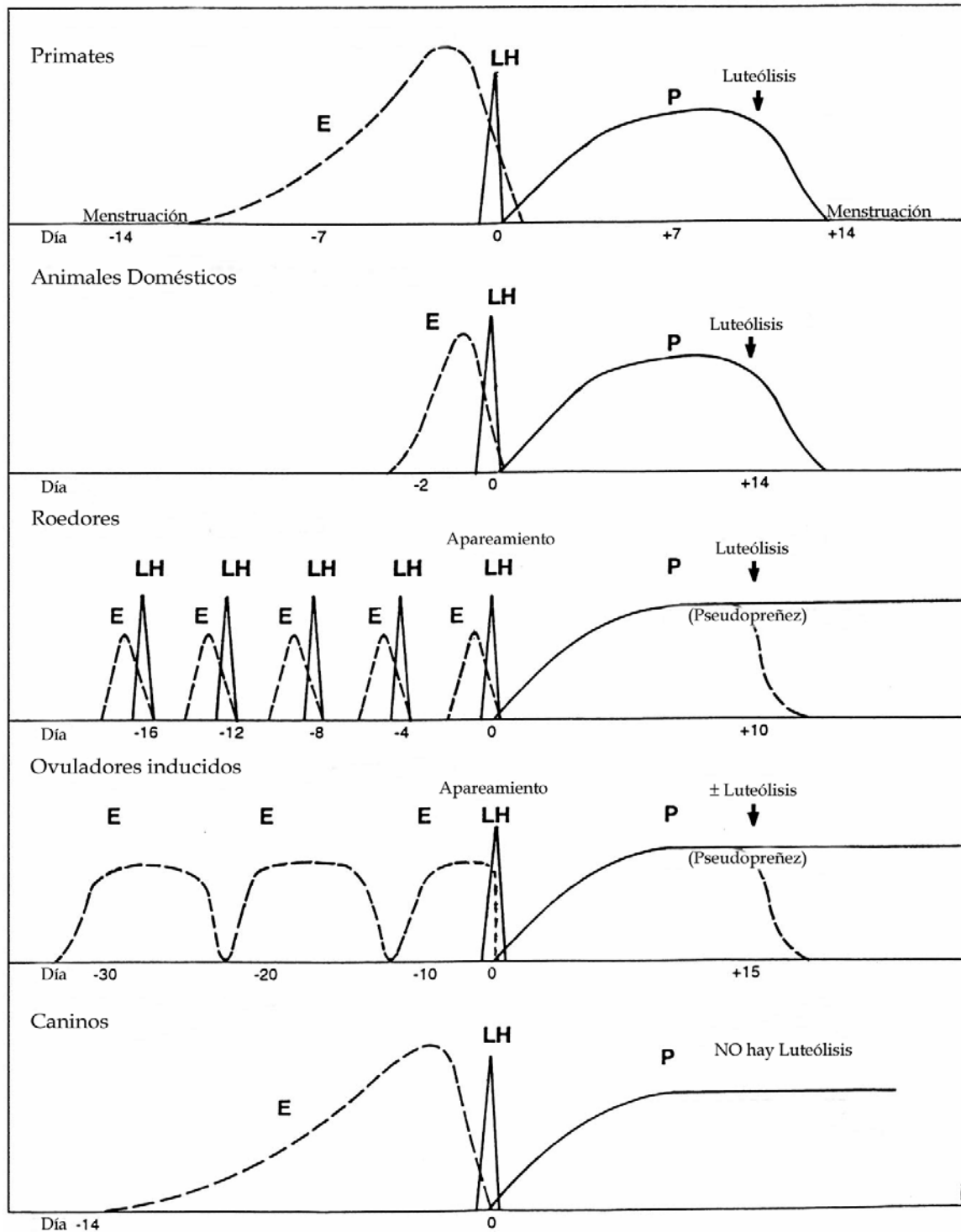


Figura 14. Diferentes ciclos reproductivos. Patrones de secreción de estradiol (E), progesterona (P) y LH. Modificado de Mc Cracken y colaboradores (377).

Ciclo menstrual en primates

Humanos

El ciclo menstrual (ver figura 15) en la mujer dura aproximadamente 28 días, siendo el día 1 el primer día de la menstruación. Este ciclo se puede dividir en dos fases, la fase folicular y la fase lútea o luteínica. La primera fase es la fase folicular y dura del día 1 al 14. En esta fase los folículos ováricos maduran hasta alcanzar la etapa de folículo preovulatorio y entonces el folículo dominante es ovulado en el día 14. Luego de la ovulación, comienza la fase lútea y dura hasta el día 28. En esta etapa se produce la formación del CL y esta glándula comienza a sintetizar y secretar progesterona. Cabe aclarar, que en los primates también se sintetiza estradiol, pero el esteroide principal de producción y secreción es la progesterona. Al final del ciclo, si no se produce la fecundación el CL degenera y los niveles de progesterona descienden. La caída en los niveles de progesterona ocasiona la menstruación. La menstruación es un proceso que normalmente dura entre 4-7 días, por el cual se produce la descamación superficial del endometrio (mucosa que cubre el interior del útero) en cada ciclo.

Durante el ciclo menstrual no sólo se producen cambios a nivel ovárico sino también a nivel del endometrio uterino y se pueden encontrar dos fases, la proliferativa y la secretora. La fase proliferativa del endometrio ocurre junto con el aumento en los niveles de estradiol plasmático, aumentando su espesor hasta alcanzar su máximo justo antes de la ovulación. En esta fase, las células del tejido conectivo estromal proliferan y aumentan los depósitos de colágeno extracelular. En la fase secretora, las glándulas uterinas en respuesta a los altos niveles de progesterona, aumentan su complejidad estructural de simples elementos tubulares a gruesas estructuras espiraladas con un lumen glandular conteniendo abundante material secretorio. Por otro lado, las arterias espiraladas dentro del endometrio se engrosan y aumenta el volumen de sangre, especialmente en respuesta a los niveles de progesterona. Si la implantación del huevo o cigoto no ocurre, alrededor del día 11 luego de la ovulación el endometrio empieza a ser invadido por linfocitos. Luego, debido a caída en los niveles de progesterona, se produce la isquemia de las arterias espiraladas y la menstruación.

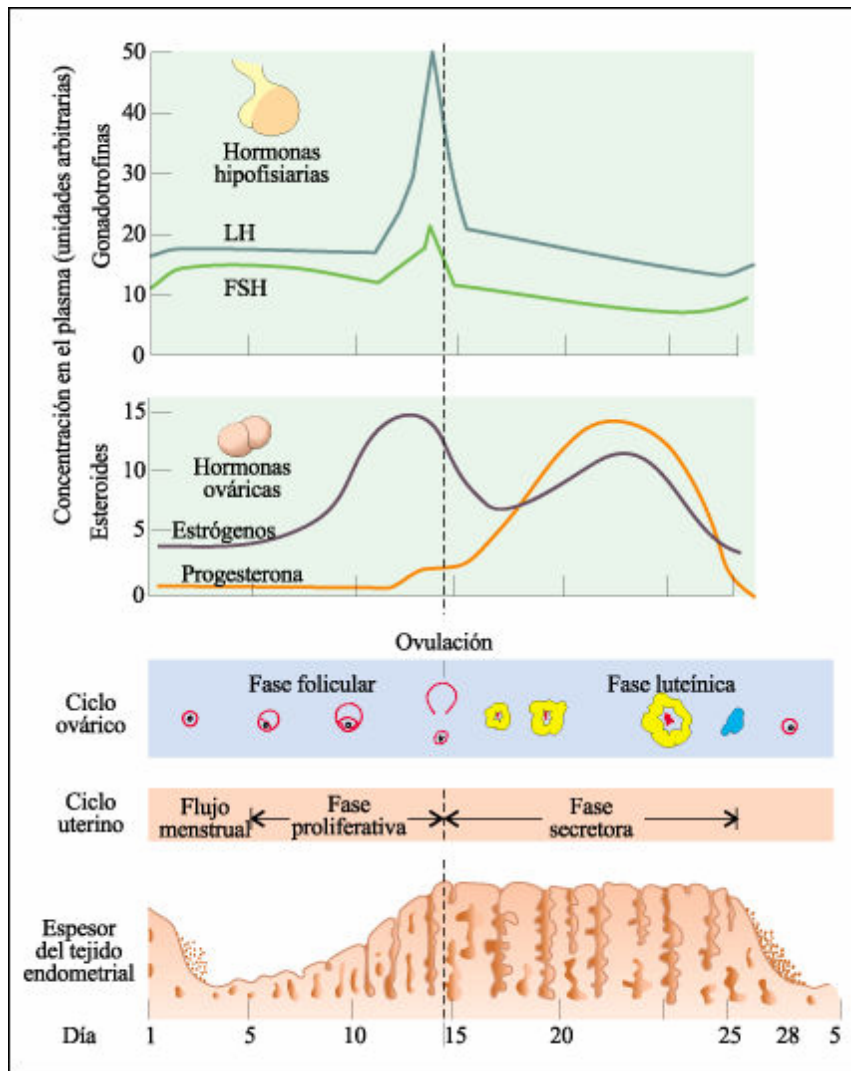


Figura 15. Esquema de todos los acontecimientos que se producen en un ciclo menstrual, que implica cambios de concentración hormonal y anatómicos en el ovario en el endometrio (130)

Mono rhesus

En cautiverio (en las temperaturas de la zona norte de América, EE.UU.) la mayoría de las monas presentan un ciclo menstrual regular de octubre a abril (otoño), mientras que en verano sus ciclos son infrecuentes o irregulares. El período

reproductivo es en otoño de manera que la cría nazca en primavera, ya que la gestación dura aproximadamente 165 días. Sus ciclos menstruales varían de 21 a 33 días, siendo el más frecuente de 28 días como en el caso de las mujeres. La fase preovulatoria dura de 9 a 17 días, siendo el día 13 el día de ovulación más frecuente. Hasta el día 12 post ovulación no se encuentran diferencias entre el CL de las monas preñadas respecto al de las monas no preñadas (125). La implantación del embrión se produce en el día 9 post ovulación y recién en el día 11 el trofoblasto comienza a ser muy activo. Por lo tanto, se sugiere que la implantación es la que determinaría el destino y el rescate del CL en caso de producirse la fertilización.

Dadas las similitudes con los ciclos menstruales en las mujeres, el mono rhesus es un excelente modelo experimental para estudiar la formación y regresión del CL, así como también otros aspectos del ciclo reproductivo.

En la figura 16 se pueden observar los patrones de secreción de las gonadotrofinas y las hormonas esteroideas en el mono rhesus.

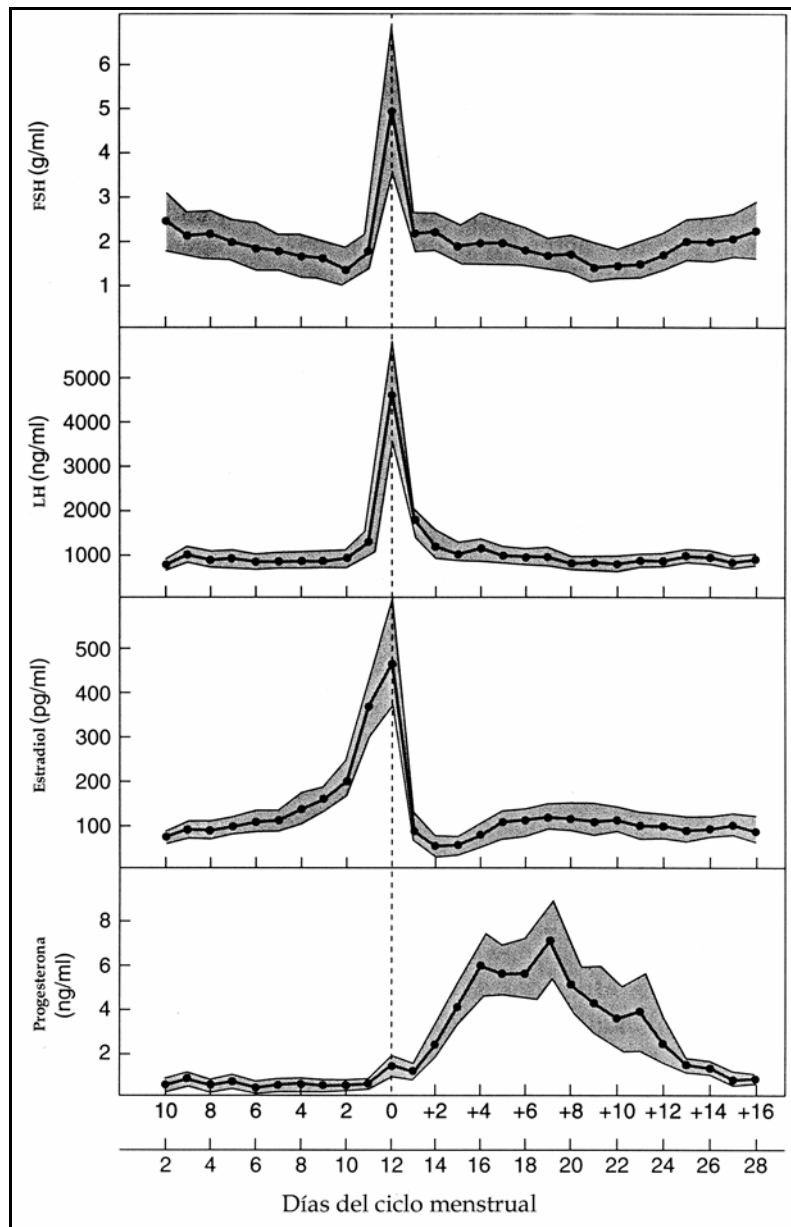


Figura 16. Patrones cíclicos de secreción de las gonadotrofinas y las hormonas esteroideas en el mono rhesus: Niveles séricos de FSH, LH, progesterona y estradiol del ciclo menstrual. Esquema modificado de Dizerega y colaboradores (142).

Ciclo estral en la rata

El término estro (E) 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. Dicho término proviene de la palabra griega *oistros* que significa calor, pasión, frenesí o deseo loco. 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 diestro I o también conocido como metaestro. El período siguiente, diestro II (DII), 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. En la figura 17 se pueden observar los patrones de secreción de distintas hormonas (PRL, gonadotrofinas y esteroides ováricos) durante el ciclo estral de la rata. La pubertad en la rata está definida como el primer E y ocurre aproximadamente 34 días post nacimiento. Los ciclos reproductivos regulares continúan hasta alrededor de 10-12 meses de edad y luego los animales comienzan a tener ciclos irregulares.

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. La ovulación ocurre cada 4 o 5 días, siempre y cuando los animales se mantengan bajo estricto control de luz y oscuridad, y sólo se interrumpe por la preñez o la pseudo-preñez (195). Los estadios secuenciales del ciclo estral pueden ser monitoreados examinando el tipo celular que predomina en el extendido vaginal (415). Por lo tanto, los distintos estadios del ciclo son determinados observando al microscopio a bajo aumento. En el proestro predominan las células epiteliales nucleadas, redondas y algunas veces escamosas. En el E predominan las células escamosas mientras que en el D I y II, los leucocitos son mayoritarios.

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.

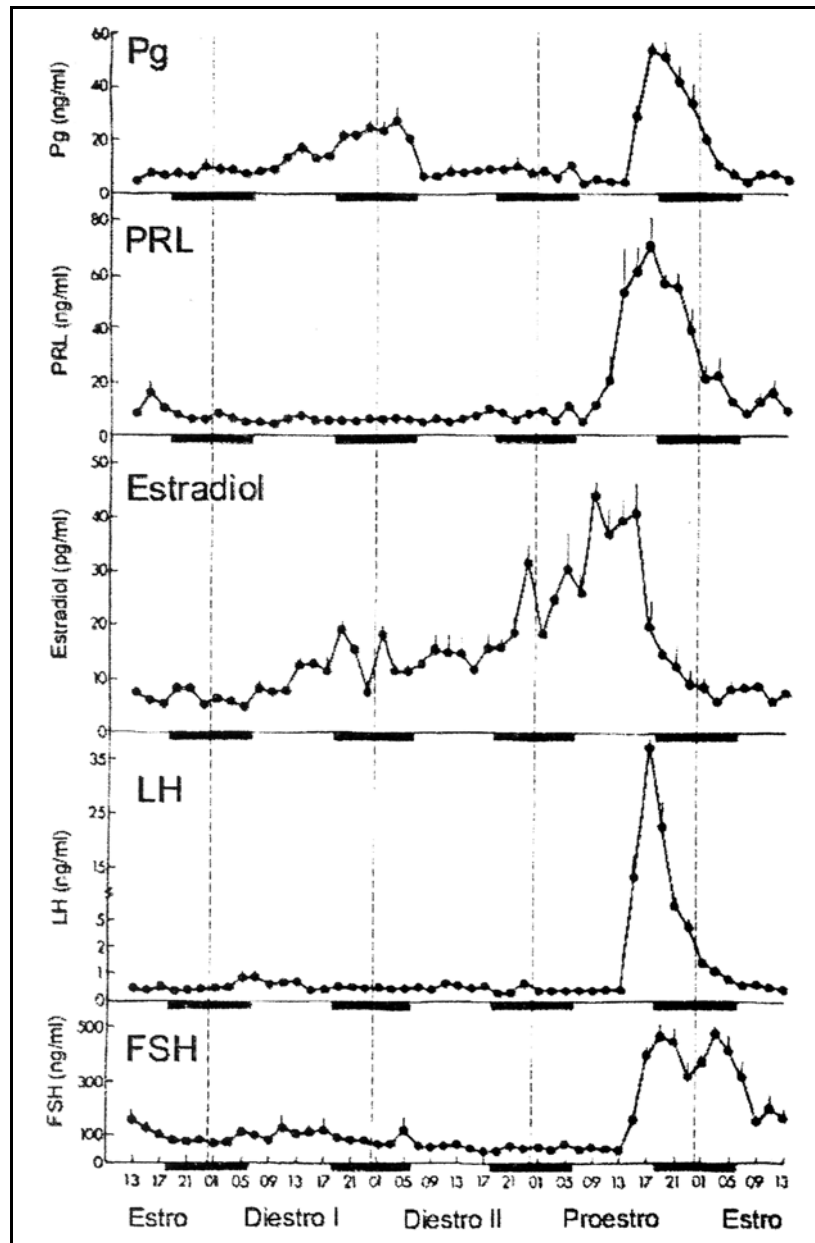


Figura 17. Niveles séricos de progesterona, prolactina, estradiol, LH y FSH, a lo largo de los cuatro días del ciclo estral en la rata. Los números sobre el eje x representan distintos momentos del día considerando 24 horas de reloj. Las barras negras representan el período de oscuridad de (1800 a 0600) y los números en la abscisa indican la hora del día. Las líneas de puntos verticales señalan la medianoche. Modificado de Smith y colaboradores (603).

Preñez y el reconocimiento materno

El reconocimiento materno de la preñez o embarazo involucra una comunicación bioquímica entre la madre y el embrión para permitir la síntesis y la liberación ininterrumpidas de progesterona (525). En la mayoría de las especies la hembra preñada rápidamente reconoce la presencia del embrión y sus membranas asociadas (105; 269; 410; 421; 451). La extensión de la función luteal más allá del ciclo estral (o menstrual, en primates) es la primer evidencia de la presencia del reconocimiento materno (281; 593). Cabe destacar que, a pesar de las diferencias en los mecanismos para el mantenimiento de la síntesis de progesterona en las distintas especies, sólo unos pocos tipos de señales generales son utilizados y sus tiempos además son críticos. En general, el embrión secreta factores que previenen la secreción o la acción luteolítica de la PGF-2 α o factores que son luteotróficos directamente. A continuación se detallara el reconocimiento materno en primates y roedores.

En primates

Los mecanismos involucrados en el reconocimiento materno del embarazo en primates son únicos e involucran una señal producida por el embrión, la hormona coriónica (CG). A partir del día 8-12 del embarazo (días post fertilización) el embrión comienza a producir esta hormona, la cual rescata al CL hasta el momento en el que la placenta sustituirá al CL en la producción de progesterona. En primates, el CL no permanece funcional durante todo el embarazo (nueve meses) sino sólo durante la etapa temprana a diferencia de lo que ocurre en roedores. La CG es una glicoproteína estructural y biológicamente similar a la LH, que estimula directamente al CL para secretar progesterona.

En roedores (En particular en la rata)

En la rata la gestación tiene una duración de 22-24 días, y el CL funcional debe ser mantenido hasta poco antes del parto. La transición de recurrentes ciclos estrales a la preñez es dependiente del mantenimiento en la producción de progesterona (como explicamos anteriormente) por parte del CL, la principal fuente de esta hormona durante la preñez de la rata. La terapia de reemplazo sólo con progesterona es suficiente para mantener la preñez en ratas ovariectomizadas.

El establecimiento y mantenimiento de la preñez en la rata involucra dos eventos neuroendócrinos. El primero es desencadenado por el apareamiento, en el que la estimulación cervicovaginal y de los flancos desencadenan un reflejo nervioso que modifica la liberación de factores hipotalámicos. Dicho reflejo nervioso y la consiguiente modificación de los factores hipotalámicos, permiten la descarga bifásica (una diurna y otra nocturna) de PRL hipofisaria durante los primeros 10-12 días de la preñez o pseudo-preñez (80; 196). Este estímulo de PRL es necesario para rescatar y mantener en funcionamiento al CL de la preñez. Cabe destacar, que existen algunas diferencias en la secreción de PRL en la preñez y pseudopreñez en cuanto a descargas o duración principalmente, siendo menor en la pseudopreñez (605). El segundo evento es dependiente de la implantación y del desarrollo del feto normal. En roedores preñados, la placenta y las células deciduales del endometrio producen hormonas similares a la PRL (PRL-like), que ejercen un efecto luteotrófico necesario para el mantenimiento del CL hasta el final de la preñez (43).

Un estricto control de la secreción y acción de las hormonas ováricas es fundamental durante la preñez. En primer lugar, la concentración plasmática de progesterona alcanza un máximo alrededor del día 16 de la gestación y cae precipitadamente durante los últimos días (luego del día 18), antes del parto. Esta caída de los niveles de progesterona es indispensable para que el parto ocurra. Por el contrario, las concentraciones de estradiol aumentan gradualmente hacia el momento del parto (202). Por último, la relaxina es una hormona polipeptídica sintetizada por el CL (en la rata) que comienza a ser detectable en el día 10 de la preñez y sus niveles comienzan a elevarse a partir del día 12 y hasta el momento del parto, seguida de una abrupta caída luego del parto (583). En la figura 18 se muestran los niveles de progesterona, estradiol y relaxina durante la preñez en la rata.

El mantenimiento del CL de la preñez en la rata involucra la interacción entre varios factores tróficos. Los más importantes son la PRL (o las proteínas PRL-like) y los andrógenos (sustrato para el estradiol intraluteal). Durante la primer semana de preñez (días 1 al 6), el CL es dependiente de la PRL pituitaria para su mantenimiento y desarrollo. En este período la PRL es capaz de mantener los niveles basales de progesterona y su inhibición reduce los niveles de progesterona (327). Luego del día 6, la PRL pituitaria ya no es esencial aunque sigue siendo secretada hasta el día 10 (420). Durante la segunda semana (días 7 al 11), la placenta y la decidua madura comienzan a secretar factores PRL-like, entre ellos PRL de origen decidual. En este

estadio el requerimiento de estradiol es absoluto para la secreción de progesterona (229), mientras que la PRL es necesaria para las acciones de la LH (31). La LH a su vez estimula la producción de andrógenos luteales y su aromatización a estradiol (228; 230). En la etapa media de la preñez se producen cambios bruscos en la regulación del CL. Los picos de PRL pituitaria decaen abruptamente, la LH desciende a niveles muy bajos y la producción de PRL decidual declina. A pesar de la caída en estos factores estimulatorios, el CL aumenta de tamaño, su vascularización y su capacidad esteroidogénica como resultado de la secreción de factores tróficos por la placenta. Las células gigantes del trofoblasto comienzan a producir una proteína PRL-like, llamada lactógeno placentario I (LP-I) (453). El LP-I se une al receptor de PRL y produce las mismas acciones que la PRL en el CL y en la decidua (703; 709; 711; 798). La placenta también comienza a producir andrógenos (androstenediona y testosterona), los cuales son luego convertidos por el ovario a estradiol (230; 297; 740). Luego, en la etapa tardía de la preñez las células gigantes del trofoblasto comienzan a producir otra proteína PRL-like, denominada lactógeno placentario II (LP-II) (179; 606), y disminuyen la expresión de LP-I (178). Las acciones del LP-II son idénticas a las de la PRL y LP-I (705; 710; 797), pero LP-II es la responsable del mantenimiento del CL en la etapa tardía de la preñez.

Cabe resaltar que, a pesar de los numerosos estudios realizados en el CL de roedores, actualmente no se conocen con certeza los caminos involucrados en la luteólisis funcional y estructural que ocurren en el CL del ciclo y/o de la preñez.

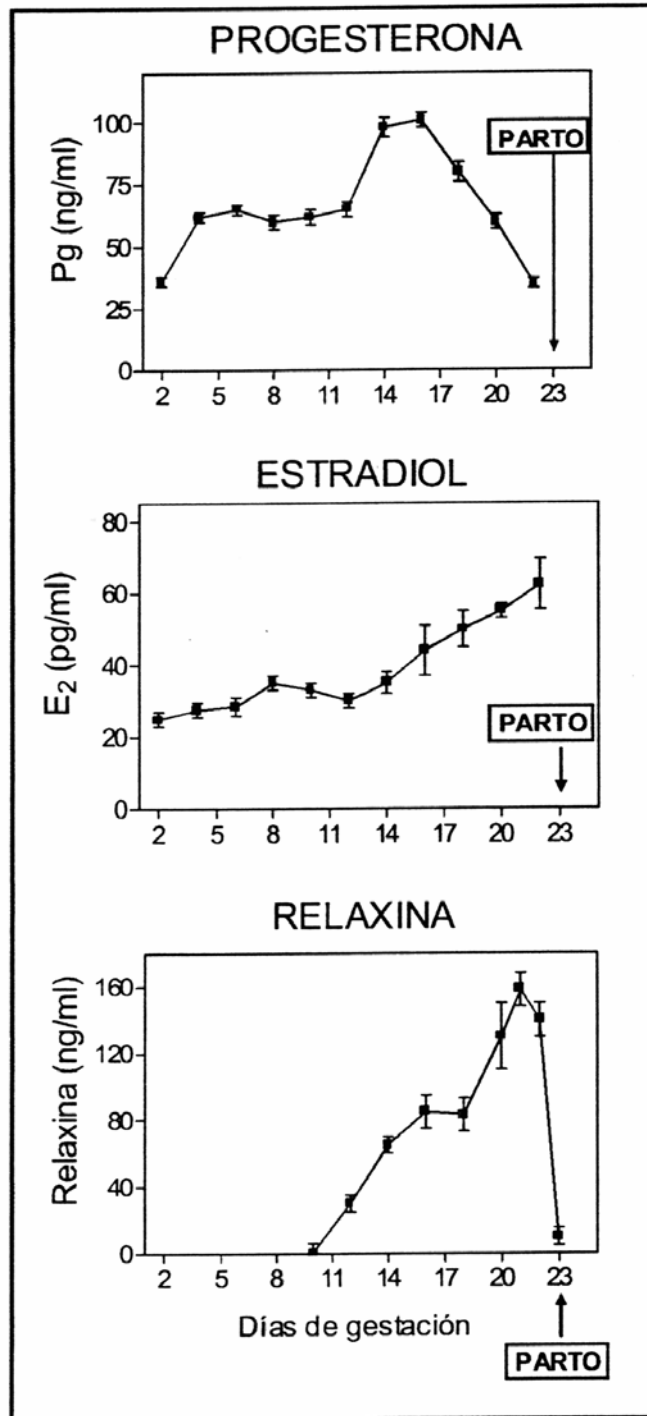


Figura 18. Niveles séricos de progesterona, estradiol y relaxina durante la preñez de la rata, determinados por radioinmunoensayo. Los resultados se expresan como promedio \pm error Standard. Modificado de Sherwood y colaboradores; y Smith y colaboradores (584; 604).

Disfunción luteal

La fase lútea deficiente o inadecuada (LPD) es un desorden que se describe generalmente como un patrón anormal o retraso en el desarrollo secretorio del endometrio debido a una producción inadecuada de progesterona por el CL y habitualmente las mujeres presentan una fase lútea corta (533; 723). Como consecuencia de la LPD suelen encontrarse la subfertilidad y/o la pérdida del embarazo en etapa temprana. Sin embargo la patofisiología de este desorden no se conoce con exactitud y existen controversias acerca de su diagnóstico e incluso acerca de la existencia de esta patología. La LPD es considerada como un camino común final originado por una gran variedad de causas o factores de predisposición. Las deficiencias funcionales del CL pueden ser consecuencia de una dinámica endocrina anormal de la fase folicular, una foliculogénesis pobre o una disfunción luteal. Además de implicar el ovario, este desorden generalmente implica una disfunción a nivel del hipotálamo o de la hipófisis. Aún pequeñas anormalidades en la secreción de gonadotrofinas durante la fase folicular pueden comprometer la calidad y la duración de la función luteal. Se ha observado que las mujeres que presentan una fase lútea corta generalmente exhiben una relación FSH/LH más baja y una disminución en la amplitud de los pulsos de LH (660). Asimismo, se ha demostrado que las bajas concentraciones de estradiol y progesterona o el retraso en la maduración secretoria del endometrio, suelen estar asociadas a una disminución en los niveles de FSH durante la fase folicular, temprana y media (124; 582). Por otro lado, en esta patología se han observado anormalidades en el pico preovulatorio de LH (disminución en la concentración de LH inmuno y bioactiva) y también durante la fase lútea (disminución en la bioactividad de LH (607). Dado que, el pico de LH es el estímulo para la luteinización y esta hormona subsecuentemente regula la secreción de progesterona por el CL durante la fase lútea, cualquier cambio en la LH va a afectar la función luteal. Cabe aclarar que, los patrones pulsátiles de liberación de las gonadotrofinas pituitarias están correlacionadas con la secreción de GnRH hipotalámica, y que la frecuencia en los pulsos de GnRH también influyen sobre las cantidades relativas de FSH y LH que se liberan. El eje hipotálamo-hipófisis-ovario también puede ser perturbado como consecuencia de desórdenes en la tiroides o la prolactina y predisponer la LPD.

Actualmente existen discrepancias acerca de si el origen de la LPD reside en una disfunción luteal o una falla en la regulación del eje hipotálamo-hipofisario, o

ambas. Lamentablemente en la actualidad no existe un criterio único para el diagnóstico de la LPD y se utilizan diferentes métodos. Entre ellos, duración de la fase lútea determinada por el monitoreo de la temperatura basal o por la detección del pico de LH, medición de la concentración sérica de progesterona, observación histológica de los cambios en el endometrio secretorio (denominado “histologic endometrial dating”), etc. La falta de un mecanismo etiológico claro del síndrome de la LPD, ha llevado a múltiples tratamientos con pocas terapias que solucionen la esterilidad o pérdida temprana del embarazo, muchas veces asociada a este síndrome. El recurso de tratamientos de reproducción asistida, en algunos casos resulta eficaz, sin embargo un gran porcentaje de dichas pacientes no logran embarazos exitosos. El tratamiento para la LPD en general es más bien empírico e incluye, citrato clomifeno (anti estrógeno comúnmente utilizada para inducir la ovulación), estimulación con gonadotrofinas, suplementación con progesterona y hCG.

Consideramos que un buen entendimiento de los mecanismos regulatorios de la formación y regresión del CL, puede contribuir al tratamiento de ciertas enfermedades asociadas con falla lútea, como ser la fase lútea inadecuada o deficiente (LPD). Además, este estudio aporta nuevas evidencias que contribuyen a esclarecer las controversias existentes respecto al papel de la apoptosis en el CL.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

La hipótesis postulada en esta tesis es que cambios en la expresión y/o actividad de las caspasas están involucrados en la regresión o luteólisis del CL

Para corroborar esta hipótesis, evaluamos los cambios de expresión y/o actividad de algunos miembros de la familia de caspasas (-2, -8, -9 y -3) durante la formación y regresión del CL. La selección de estas cuatro caspasas se debió a que se

eligió a la principal caspasa efectora (caspasa-3) y a tres caspasas iniciadoras relacionadas con distintos caminos apoptóticos (caspasa-2, -8 y -9). La caspasa-8 se encuentra relacionada con el camino de los receptores de muerte y la caspasa-9 con el camino mitocondrial. Mientras que, la caspasa-2 está involucrada en ambos caminos.

En la primera parte del proyecto se evaluaron los cambios de expresión y/o actividad de las caspasas (-2, -8, -9 y -3) durante la formación y regresión del CL en el ciclo natural del mono rhesus. Su similitud con el ciclo menstrual de la mujer hace de este modelo una buena herramienta experimental para estudiar los procesos naturales de luteinización y luteólisis. Además, se evaluó la regulación hormonal de la actividad enzimática de estas caspasas, utilizando un modelo de tratamiento de remoción y reemplazo hormonal.

Como segunda parte del proyecto decidimos extender estos estudios utilizando como modelo experimental la rata. Examinamos en el ciclo natural de la rata los mismos miembros de la familia de caspasas estudiados en primates para luego comparar los resultados en las distintas especies. La elección de este segundo modelo experimental se debió a la facilidad y comodidad de trabajar con estos animales. Dado a que el ciclo natural de la rata es considerablemente distinto al de primates, se evaluaron además dichas caspasas durante la preñez de la rata, ya que el CL de la preñez en rata posee ciertas similitudes al CL del ciclo natural de primates. Por último, en este modelo se estudió la regulación de las caspasas por la PGF-2- α (factor luteolítico fisiológico en roedores).

Objetivo general:

Evaluar los cambios de expresión y/o actividad de caspasas durante la formación y regresión del CL.

El trabajo se dividió principalmente en dos amplios capítulos:

a) Estudio en el CL del mono rhesus (*Macaca mulatta*)

(Lugar de trabajo: ONPRC-OHSU, Oregon National Primate Research Center - Oregon Health & Science University. EE.UU.)

Objetivos específicos:

- Evaluar algunos miembros de la familia de caspasas (-2, -8, -9 y -3) en distintos estadios del CL del ciclo natural, determinando los niveles de ARNm, expresión proteica y su actividad enzimática.
- Cuantificar los niveles del fragmento activo de la caspasa-3 (p17) mediante un ELISA
- Evaluar la apoptosis mediante TUNEL.
- Evaluar la regulación hormonal de la actividad enzimática de estas caspasas, utilizando un modelo de tratamiento de remoción y reemplazo hormonal.

b) Estudio en el CL de ratas (*Rattus norvegicus*, cepa Sprague Dawley)

(Lugar de trabajo: IBYME-CONICET, Instituto de Biología y Medicina Experimental

- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas).

Objetivos específicos:

- Evaluar las caspasas (-2, -8, -9 y -3) en el CL (población actual y anterior) del ciclo natural de la rata en estro y diestro II. Medición de su actividad enzimática, expresión proteica y localización celular.
- Cuantificar los niveles de la procaspasa-3 y de su fragmento activo (p17) mediante western blots.
- Evaluar los índices estructurales y funcionales del CL (peso, niveles de progesterona (P_4), niveles de P450scc y actividad de la 20α -HSD).
- Evaluar la apoptosis mediante TUNEL y/o hematoxilina eosina en los distintos grupos del CL del ciclo natural.
- Evaluar las caspasas (-2, -8, -9 y -3) en el CL de la preñez (día 7, 17, 19, 21 de gestación) y post-parto (día 1 y 4). Medición de su actividad enzimática, expresión proteica, localización celular y cuantificación de los niveles de la procaspasa-3 y de su fragmento activo (p17) mediante western blots.
- Evaluar los índices estructurales y funcionales del CL (niveles de P_4 , niveles de P450scc y actividad de la 20α -HSD); así como también de la apoptosis mediante TUNEL el CL de la preñez (día 7, 17, 19, 21 de gestación) y post-parto (día 1 y 4).
- Estudiar el papel del factor luteolítico fisiológico en roedores ($PGF-2-\alpha$), estudiando a distintos tiempos el efecto de la administración de esta hormona en la regulación de la expresión y actividad de las caspasas mencionadas.
- Evaluar los índices estructurales y funcionales del CL (niveles de P_4 , niveles de P450scc y actividad de la 20α -HSD); así como también la apoptosis mediante TUNEL a los distintos tiempos post administración de $PGF-2-\alpha$.

Materiales y Métodos

Animales

Esta tesis se encuentra dividida en 2 capítulos principales de acuerdo a la especie utilizada. El primero comprende los resultados obtenidos en 2 modelos experimentales de primates: ciclo menstrual natural (NCL) y ciclo menstrual regulado (RCL). Mientras que el segundo comprende a datos obtenidos de tres modelos experimentales de roedores: ciclo estral (NCL), preñez y luteólisis farmacológica inducida por PGF-2 α (PGF-2 α)

Monos

En todos los experimentos realizados con primates se utilizaron monas hembras adultas (*Macaca mulatta*) del Oregon National Primate Research Center-Oregon Health and Science University (ONPRC-OHSU. EE.UU.). Todos los experimentos y protocolos fueron aprobados por el comité de uso y cuidado animal del ONPRC y llevados a cabo de acuerdo a la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorios del NIH (National Institutes of Health). El ciclo menstrual de las monas fue monitoreado diariamente según el protocolo del instituto. Seis días luego del sangrado, se tomaron muestras de sangre utilizando jeringas (saphenous venipuncture). El suero fue separado y guardado a -20°C para luego medir las concentraciones de estradiol y progesterona siguiendo el protocolo descrito por Young y colaboradores (782). Ha sido demostrado que el primer día de baja concentración de estradiol luego del pico preovulatorio de esta hormona, corresponde al día posterior del pico de LH, y por lo tanto fue determinado como día 1 de la fase luteal (151). Estos experimentos fueron realizados en el laboratorio dirigido por el Dr. Richard L. Stouffer.

Ratas

Las ratas empleadas en esta tesis fueron ratas hembras adultas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Sprague Dawley (60 días o más), del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME). Todos los experimentos y protocolos fueron aprobados por el comité de ética del IBYME y llevados a cabo de acuerdo a la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorios del NIH. Se utilizaron ratas en distintos estadios del ciclo estral (Estró; E y Diestro II; DII), así como también ratas preñadas a distintos tiempos de gestación (días 7, 17, 19 y 21) y distintos tiempos post-parto (días 1 y 4). El E fue seleccionado debido a que el pico de PRL en este estadio desencadena la luteólisis del CL del ciclo anterior pero no la del CL (en

formación) del ciclo actual. Asimismo, se eligió al DII para estudiar al CL recién formado (previo a ser funcional en caso de producirse la preñez), así como también al CL regresionado del ciclo anterior. El patrón de secreción de progesterona durante el ciclo estral consta de dos incrementos substanciales, uno durante el DII y otro en la tarde del proestro. La secreción de progesterona comienza en la tarde del DI y alcanza sus valores máximos por la mañana del DII, seguidos de una brusca caída. Hasta la tarde del proestro los niveles de progesterona permanecen bajos y luego alcanzan un pico coincidente con el comienzo y duración del pico de LH (601). De manera que, nuestras muestras incluyen CLs en formación (CL del ciclo actual en E), preparándose para una eventual preñez (CL del ciclo actual en DII), durante la regresión funcional (CL del ciclo anterior en E) y al comienzo de la regresión estructural (CL del ciclo anterior en DII). El ciclo estral fue seguido diariamente mediante la realización de extendidos vaginales. Los estadios del ciclo estral fueron monitoreados examinando el tipo celular que predomina en el extendido vaginal (415). Sólo las ratas con 2 o más ciclos consecutivos fueron utilizadas. En el caso de los estudios en ratas preñadas, ratas de 90 días de edad fueron puestas junto a un macho la noche del proestro. El día 1 de preñez fue considerado la mañana en que se encontraron espermatozoides en el extendido vaginal. En nuestro instituto el parto ocurrió el día 23 de gestación. A las ratas que fueron utilizadas para estudiar los CLs los días 1 y 4 post-parto, se les retiró la cría el mismo día del parto para evitar el pico de prolactina (PRL) producido por el succionamiento de la cría.

Los animales en el bioterio estaban bajo 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 19.00 hs), recibiendo alimento balanceado y agua *ad libitum*.

Tratamientos

Monos (Ciclo menstrual regulado, RCL)

El tratamiento de remoción y reemplazo hormonal fue realizado diariamente en monas adultas en los días 9-11 de la fase luteal de acuerdo al protocolo previamente descrito por el laboratorio del Dr. Stouffer (781). Estos días fueron seleccionados debido a que el CL comienza a regresionar cerca del final de este período, y además estos días forman parte de la ventana de rescate del CL en primates en caso de producirse la fecundación (657). Para evaluar los potenciales roles regulatorios de LH y progesterona, se dividieron a las monas hembras en 5 grupos al

azar (n=4/5 por grupo): control (Sin tratamiento), antide (Inyección subcutánea con un antagonista de GnRH, 3 mg/Kg), antide + LH recombinante humana (Inyección intramuscular con LH, 40 UI, 3 veces al día,), antide + LH + TRL (El TRL (trilostano) es un inhibidor de la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenada y fue administrado en una única dosis de 600 mg vía oral), antide + LH + TRL + R5020 (R5020, es un pregestágeno no metabolizable y fue administrado en forma subcutánea, 2,5 mg). En trabajos previos del laboratorio del Dr. Stouffer han estudiado el efecto del antide, LH recombinante humana, TRL y R5020 en monas adultas. Han demostrado que el antide suprime los niveles bioactivos circulantes de LH y la función luteal, así como también observaron que la administración de LH recombinante reconstituye las funciones de LH (160). En otro trabajo demostraron que el TRL era capaz de inhibir la producción luteal de progesterona y que R5020 fue capaz de reconstituir la función de progesterona (156).

En el día 12, el CL fue extraído de las monas mediante una operación realizada por un equipo de cirujanos veterinarios del ONPRC.

Ratas PGF-2 α

A un grupo de ratas se le administró PGF-2 α (400 μ g/rata) en el día 14 de preñez y los ovarios fueron recolectados a distintos tiempos post-inyección (0, 8, 16, 24 y 36 horas). El día 14 fue seleccionado debido a que la producción de progesterona por el CL de la rata aumenta durante los primeros 16 días y luego decae a niveles muy bajos alrededor de los días 20-22 de preñez, seguidos de la luteólisis estructural luego del parto. De esta manera, la luteólisis farmacológica inducida por la PGF-2 α se encuentra espacialmente separada de la luteólisis natural, evitando posibles interferencias.

Aislamiento de los CLs

Mono

A distintos estadios de la fase luteal (n=4/5 por grupo) se extrajo el CL de las monas mediante una operación realizada por un equipo de cirujanos veterinarios del ONPRC. Se aislaron CLs en los siguientes estadios: temprano (ECL, días 3-5), medio (MCL, días 6-8), medio-tardío (MLCL, días 10-12), tardío (LCL, días 14-16) y muy tardío (VLCL, días 17-18). Una vez aislado el CL, se procedió a cortarlo en 4 fracciones. Una se la colocó en buffer formalina para la realización de cortes

histológicos. Las otras 3 porciones fueron colocadas en 3 criotubos distintos y guardados a -80°C para luego realizar la extracción de ARN, de proteínas y de reserva, respectivamente.

El mismo procedimiento fue utilizado en el caso de las monas sometidas a la remoción y reemplazo hormonal.

Rata

Una vez sacrificada la rata, los ovarios fueron desgrasados y un ovario fue colocado en buffer formalina para la realización de cortes histológicos, y el otro fue utilizado para realizar el aislamiento de los CLs. Dicho aislamiento se realizó bajo la lupa utilizando agujas finas y los CLs aislados ($n=5-9$ CLs/ovario) fueron inmediatamente colocados en criotubos y guardados a -80°C para la posterior extracción de proteínas y esteroides. En el caso del ciclo natural ($n=6/7$ ratas/grupo), el aislamiento fue complejo debido a que en los roedores el CL persiste por más de un ciclo. Se reconocieron 2 tipos de CLs (pertenecientes al ciclo actual y al ciclo anterior) tanto en estro como en diestro II. Los diferentes CLs fueron identificados y recolectados de acuerdo a criterios de tamaño e irrigación. Los del ciclo anterior tenían un aspecto más blancuzco y menor irrigación. Mientras que los del ciclo actual tenían un aspecto más transparente y con mayor irrigación.

En el modelo de preñez ($n=4$ ratas/grupo), el aislamiento fue mucho más sencillo debido a que sólo se encontraron los CLs de la preñez y eran de mayor tamaño. Luego del parto se observaron 2 poblaciones de CLs (CLs de la preñez y CLs recién formados), debido a que luego del parto las ratas ovulan. Pero el reconocimiento y aislamiento de los CLs de la preñez fue más sencillo debido a que sus tamaños fueron mucho mayores y poseían un aspecto más opaco en comparación a los recién formados.

Con respecto a los CLs del grupo de ratas inyectadas con $\text{PGF-}2\alpha$ ($n=4$ ratas/grupo), fue el mismo caso de los CLs de preñez, existiendo sólo un tipo de población.

Extracción de ARN de los CLs de mono rhesus

La extracción del ARN a partir de los CLs extraídos se realizó siguiendo el método de extracción desarrollado por Chomczynski y Sacchi (1987) utilizando Trizol (114). Los CLs se homogenizaron en 1 ml de Trizol inmediatamente de ser retirados del nitrógeno líquido. Luego se procedió a la separación de fases incubando

los homogenatos 5 min. a temperatura ambiente para favorecer la disociación de los complejos nucleoproteicos. Se transvasó el homogenato a un tubo nuevo y se agregaron 200 μ l de cloroformo (para separar las proteínas de ARN), se agitó vigorosamente durante unos seg. y se incubó durante 2-3 min. Luego se centrifugó a 12000g durante 15 min. a 4°C. Inmediatamente se transfirió la fase acuosa (de arriba) a un tubo nuevo, se agregaron 500 μ l de alcohol isopropilo (para facilitar la precipitación del ARN) y se incubó durante 10 min. a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 12000g durante 10 min. a 4°C y cuidadosamente se aspiró el sobrenadante. En seguida se lavó el ARN con 1 ml de etanol al 75%, se mezcló utilizando el vortex y se centrifugó a 10000g durante 5 min. a 4°C. Por último se dejó secar el pellet al aire y una vez que se evaporó el etanol se lo disolvió en 30 μ l de agua libre de ARNasas.

Se tomó una alícuota y se midió la absorbancia a 260 nm. También se midió la absorbancia a 280 para luego realizar la relación OD260/280 y verificar que se encontrara en un rango de 1,8-2,1.

Gel de agarosa para ARN

Para examinar la integridad del ARN se procedió a realizar un gel de agarosa y observar la ausencia de degradación de las moléculas del ARN ribosomal (18S y 28S).

Una alícuota de cada muestra (1 μ g) se separó electroforéticamente en geles de agarosa en una concentración de 1%. Para ello, se disolvió 1 μ g de agarosa en un Erlenmeyer conteniendo 72 ml de agua. Se lo colocó unos minutos en un microondas hasta que la agarosa se disolvió por completo. Se dejó enfriar para luego agregar bajo campana 18 ml de formaldehído y 10 ml de buffer MESA 10X (MOPS-EDTA-Acetato de Sodio). En seguida se procedió a armar la cuba electroforética. Previo al sembrado, las muestras fueron sometidas a un paso de calentamiento. Un μ g de cada muestra fue colocado en un tubo de 200 μ l y se le agregaron 0,3 μ l de bromuro de etidio y 8-10 μ l de buffer loading (Loading Dye for Formaldehyde gels, Ambion). Se incubaron las muestras durante 15 min. a 70°C en una máquina de PCR (Termociclador).

Se realizó una precorrida de los geles a 80V durante 15 min. Luego se sembraron las muestras y se corrió a 80V durante 2 horas. La presencia de las 2

bandas correspondientes al ARN ribosomal 18S (1,8 Kb) y 28S (4,8 Kb) se visualizó en un transiluminador UV a 302 nm y se fotografiaron los geles.

RT-PCR de los ARN de mono rhesus

La RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction) es una técnica que permite amplificar un gen o una región del mismo a partir de ARN. Primero se obtiene una copia del ADN (ADNc) a partir del ARN por medio de la transcriptasa reversa (TR) utilizando como primers (cebadores) a oligodTs o a hexámeros y luego se procede a la amplificación.

Transcripción reversa (RT)

Antes de utilizar las muestras de ARN se las trataron con ADNasa libre de ARNAsas para eliminar posibles restos de ADN que pudieran haber quedado. Para ello, 1 µg de ARN fue incubado 15 min. a temperatura ambiente con 1 µl de ADNasaI (1 U/ µl) y 0,7 µl de su respectivo buffer en un tubo de 200 µl para PCR. Luego se agregó 1 µl de EDTA 25 mM para parar la reacción y se incubó a 65°C durante 10 min (En la misma máquina de PCR). Se realizó un spin para bajar posibles gotas en las paredes del tubo y se procedió a realizar la transcripción reversa. Se agregaron 3 µl de primers hexámeros (50 ng/µl; para llevarlos a una concentración final de 150 ng/µl), 1 µl de dNTPs (10 mM c/u) y se incubaron a 70°C durante 10 min. y se enfrió a 4°C. Luego se agregaron 7 µl de la mezcla conteniendo 4 µl de buffer 5X, 2 µl de DTT 0,1M y 1 µl de ARNasa Out (40 U/ml) y se incubó a 37°C durante 2 min. Rápidamente se agregó 1 µl de la enzima M-MLV (200 U/ µl, Invitrogen) y se incubó a 37°C durante 50 min. Seguido de la inactivación a 70°C durante 15 min. Las muestras se diluyeron mediante el agregado de 80 µl de agua ultra pura.

Esta técnica de RT fue puesta a punto en el laboratorio del Dr. Stouffer (106) con un muy buen rendimiento.

PCR

Los primers para todas las caspasas fueron diseñados de acuerdo a las secuencias humanas publicadas en el Pubmed. La mezcla de la reacción de PCR fue la siguiente: 1 µl de dNTPs (10 mM c/u), 1 µl de cada uno de los primers específicos (ver tabla 1), 2,5 µl del buffer de la taq polimerasa 10X, 0,75 µl de la taq (Advantage 2 Taq, Clontech) y 5 µl del producto de la RT.

Las condiciones de cada uno de los pares de primers fueron previamente optimizadas a distintas temperaturas y número de ciclos. Se eligieron aquellas condiciones en donde los resultados entraron dentro del rango de linealidad basándose en el siguiente protocolo:

- Desnaturalización inicial a 94°C durante 1,5 min.
- 30-35 ciclos: Paso de desnaturalización a 94°C durante 30 seg.
 Paso de hibridación a 55/60°C (dependiendo del par de primers) durante 30 seg.
 Paso de polimerización a 70°C durante 2 min.
- Polimerización final a 70°C durante 5 min.

Tabla 1. Sets de primers forward (FOR) y reverse (REV) diseñados para la RT-PCR del ADNc del CL de los distintos estadios de la fase luteal del mono rhesus				
Gen	Primer	Secuencia	Tm (°C)	N° de Ciclos
Caspasa-2	FOR	CTCATCATCAGGAACTCT	60	35
	REV	AGTTCTTTCTCTCCAGTGA	60	35
Caspasa-3	FOR	5- ACATGGAAGCGAATCAATGGACTC	60	35
	REV	5- AAGGACTCAAATTCTGTTGCCACC	60	35
Caspasa-8	FOR	5- CCGCAAAGGAAGCAAGAA	60	35
	REV	5- GGTAGGTAATCAGCAAATCCAGT	60	35
Caspasa-9	FOR	5- GCTCTTCCTTTGTTTCATC	55	30
	REV	5- CTCTTCCTCCACTGTTCA	55	30

Geles de agarosa y secuenciación

Para examinar los productos de las PCRs se procedió a realizar un gel de agarosa y observar la presencia de las distintas bandas esperadas correspondientes a los fragmentos amplificados.

Una alícuota de cada muestra junto con un marcador de peso molecular (100 bp Molecular Ruler, Bio-Rad) se separó electroforéticamente en geles de agarosa en una concentración de 1,4 %. Para ello, se disolvieron 1,4 µg de agarosa en un Erlenmeyer conteniendo 100 ml de TBE (Tris-Borato-EDTA). Se lo colocó unos

minutos en un microondas hasta que la agarosa se disolvió por completo. Se dejó enfriar para luego agregar 0,1 ug/ml de bromuro de etidio. En seguida se procedió a armar la cuba electroforética. Previo al sembrado, se tomó una alícuota de cada muestra y se le agregaron 2 µl de buffer loading (DNA loading dye, Bio-Rad). Luego se sembraron las muestras y se corrió a 110V durante 1 hora y media. La presencia de las bandas correspondientes se visualizó en un transiluminador UV a 302 nm y se fotografiaron los geles. El análisis densitométrico de las bandas se realizó utilizando el software Quantity One (Bio-Rad) y los resultados se normalizaron con la banda correspondiente a ciclofilina.

Los productos de las PCRs fueron corroborados por secuenciación en el ONPRC (Molecular Biology Core facility). Para ello, se realizaron PCRs con pools de ADNc con los correspondientes pares de primers y los productos de las PCRs fueron purificados directamente con el kit comercial (QIAquick PCR Purification Kit). Alternativamente, los productos de las mismas fueron corridos en geles de agarosa y las bandas correspondientes a los distintos fragmentos amplificados fueron cortadas de los geles para luego realizar la extracción del ADN con un kit comercial (QIAquick gel extraction kit). El ADN purificado o extraído luego se envió a secuenciar.

PCR en tiempo real (Real time PCR) para la caspasa-2 de los ARN de mono rhesus

La RT-PCR para la caspasa-2 no fue tan sensible u homogénea como para las otras caspasas. Así que se procedió a realizar una PCR en tiempo real, la cual es una técnica más sensible y específica. Pero previo a la realización de esta técnica se debió conocer la secuencia del mono rhesus de esta caspasa. Una vez obtenida la secuencia por el “Molecular Biology Core facility” del ONPRC, se la colocó en el blast para analizar su homología con la caspasa-2 humana la cual fue del 97%. Con estos datos, se procedió al diseño de la sonda fluorescente (TaqMan probes, PE applied Biosystems) y los primers específicos para real time PCR (ver tabla 2). Como control interno se utilizó el gen del ARN ribosomal 18S. Las sondas fueron marcadas en 5’ con el colorante reportero (6-carboxifluoresceína) y en 3’ con el colorante quencher (6-carboxitetrametilrodamina). La sonda del gen de interés fue marcada con el colorante FAM, mientras que la sonda del 18S fue marcada con VIC.

Para determinar las condiciones óptimas de los componentes de la reacción, se realizó una matriz variando la concentración de los primers.

Tabla 2. Sets de primers forward (FOR), reverse (REV) y sonda diseñados para la PCR en tiempo real del ADNc del CL de los distintos estadios de la fase luteal del mono rhesus			
Gen	Primer-Sonda	Secuencia	Tm (°C)
Caspasa-2	Primer FOR	5-GCACTGAGGGAGACCAAGCA	60
	Primer REV	5-CACAGCTCAACGGTGGGAGTA	60
	Sonda	5-TCACCACCCTTTCCGGGCTTCAG	60

La reacción de PCR en tiempo real fue realizada en un volumen de 10 µl conteniendo: sonda para la caspasa-2 (250 nm/l), sonda para el 18S (250 nm/l), primers para la caspasa-2 forward y reverse (300 nm/l, c/u), primers para el 18S forward y reverse (40 nm/l, c/u), 20 ng ARN de cada muestra, 5 µl de la mezcla master (TaqMan Universal PCR master mix, PE Biosystems) conteniendo el colorante ROX (como una referencia pasiva). La PCR se corrió en un termociclador (ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, PE applied Biosystems) en una placa p96 sellada con el siguiente programa:

- 2 min. a 50°C
- Desnaturalización inicial a 95°C durante 10 min.
- 40 ciclos: Paso de desnaturalización a 95°C durante 15 seg.
Paso de hibridación a 60°C durante 1 min.

Durante los distintos ciclos, las amplificaciones fueron monitoreadas y cuantificadas analizando los cambios en las emisiones fluorescentes de cada pocillo (well).

Junto con las muestras se corrió una curva standard con un pool de ADNc con 5 diluciones seriadas (1:10).

Extracción de proteínas y técnica de Lowry

Los CLs de cada grupo se homogenizaron en buffer de lisis (50 mM Tris HCL, 150mM NaCl, 10 % glicerina y 1% x-Triton) suplementado con inhibidores de proteasas (Halt Protease Inhibitor Cocktail, EDTA free, Pierce Biotechnology). El lisado se centrifugó a 10000 g durante 10 minutos a 4°C, el sobrenadante se transvasó a un tubo nuevo y el pellet se descartó. Luego se midió la concentración de las

proteínas del sobrenadante mediante la técnica de Lowry utilizando un kit de Bio-Rad.

Actividad de caspasas

Para medir la actividad de las 4 caspasas se utilizó un kit fluorométrico (Clontech, 30225), que contenía sustratos específicos para cada una de las 4 caspasas inmovilizados en pocillos separados. Se agregaron de 10 a 20 (caspasas-2 y -3) y de 10 a 40 (caspasas-8 y -9) μg de proteína totales extraídas y se incubaron durante 2 hs a 37°C . La actividad fue determinada mediante la detección de fluorescencia (Ex: 380nm, Em: 460nm) y los valores del control negativo fueron sustraídos de todas las muestras. Se realizó una curva de concentración de proteínas para optimizar la cantidad de proteína a utilizar en cada uno de los modelos y se eligió la menor concentración dentro del rango de linealidad. Se utilizaron 10 μg de proteínas para todas las caspasas en los modelos de primate. Mientras que en el caso de las ratas, se utilizaron distintos valores de acuerdo a la cantidad de proteína disponible. Se utilizaron 15 μg para todas las caspasas en las ratas del ciclo estral. En cambio, en los modelos de preñez y PGF-2 α se utilizaron 20 μg para las caspasas-2 y -3; y 40 μg para las caspasas-8 y -9.

ELISA para la caspasa-3 clivada (activa) de mono rhesus

Se realizó un ELISA para detectar y cuantificar la cantidad de fragmentos clivados de la subunidad mayor (P17) de la caspasa-3 en el extracto proteico del CL de los distintos estadios de la fase luteal (487). Se utilizó un kit (Quantikine-human active caspase-3, R&D Systems Inc.) que contenía inmovilizado en pocillos separados a anticuerpos monoclonales para la subunidad mayor de la caspasa-3 humana. Dicho kit es capaz de detectar y cuantificar solamente la subunidad mayor clivada de la caspasa-3 al ser modificada con biotina-ZVD-fluorometilketona. Esto se debe a que la modificación puede ser sólo realizada si la subunidad se encuentra clivada. De esta manera, la cantidad de caspasa-3 clivada es directamente proporcional a la cantidad de subunidad mayor modificada con biotina-ZVD-fluorometilketona.

Cinco μg de proteínas totales de cada muestra fueron utilizados en el ensayo siguiendo el protocolo del kit. Los niveles de caspasa-3 clivada fueron determinados por absorbancia a 450 nm y relativizados con una curva Standard.

Cada muestra fue realizada por duplicado, así como también el control negativo (buffer sin muestra) y este último fue sustraído de todas las muestras.

Western blot de P450scc, caspasa-3, β -actina y GAPDH de las proteínas de rata

Se utilizaron 40 μ g de cada muestra en todos los westerns realizados. Antes de sembrar las muestras, éstas fueron colocadas en un tubo eppendorf conteniendo buffer loading (SDS 2%, β -mercapto 10%, Glicerol 40%, Tris 50 mM pH 6,8, Azul de bromofenol 0,1%) y hervidas durante 5 minutos (para desnaturalizar las proteínas). Las muestras fueron sembradas junto con un marcador de peso molecular (Full Range Rainbow, Amersham) en un gel de poliacrilamida 15% con SDS (SDS-PAGE) y luego las proteínas separadas por electroforesis fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa 0,45 μ M 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 TTNBS 0,5 % (TBS con 0,5 % Tween 20) con 5% de leche en polvo descremada, durante toda la noche a 4°C. Luego se incubaron con el anticuerpo policlonal de conejo (o monoclonal de ratón en el caso de β -actina) correspondiente (Caspasa-3: 1:200; P450scc: 1:2000; β -actina: 1:1000; GAPDH: 1:1000) en buffer TTNBS 0,5% con 1% de leche durante toda la noche a 4°C. Luego se lavó con el mismo buffer y se incubó con el segundo anticuerpo (1:1000; anti-IgG de conejo (o ratón para β -actina) acoplado a peroxidasa) diluido en TTNBS 0,01% durante 1h a temperatura ambiente. Se lavó con TTNBS 0,02%, seguido de un lavado con TBS. Luego se reveló por quimioluminiscencia utilizando un kit comercial (Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus-PerkinElmer Life Sciences, Inc.). El contenido de las proteínas en las distintas calles se cuantificó por densitometría utilizando el programa Scion Image beta 4.02 win. Los datos de densidad óptica se expresaron como unidades arbitrarias \pm SEM (n=5-9 CLs/rata; 3-4 ratas/grupo). Para confirmar que se sembraron igual cantidad de proteínas en cada calle, se tiñó la membrana con Rojo Ponceau y se relativizaron los valores con los obtenidos para β -actina o GAPDH. El control negativo se realizó en ausencia del primer anticuerpo.

Actividad de la 20 α -HSD

A partir de los extractos proteicos de los distintos modelos de rata (NCL, preñez y PGF-2 α) se procedió a realizar la medición de la actividad de la enzima esteroidogénica 20 α -HSD, como índice de la luteólisis funcional (78). Para ello, se preincubaron a 37°C durante 10 min. 65 μ g (NCL) o 75 μ g (preñez y PGF-2 α) de

proteínas con 1 μmol de NADP en buffer de reacción (Tris 0,1M, EDTA 1mM, pH 8). Luego se agregaron 0,316 μmol de $20\alpha\text{-OH-P}_4$ (disuelta en etanol) y se incubaron otros 5 min a 37°C . La reacción se llevo a cabo en placas de 96 pocillos (p96) en un volumen final de 300 μl . La actividad fue determinada por la absorbancia medida a 340nm y el valor del control negativo (sin muestra) fue sustraído de todas las muestras. La medición de la absorbancia se realizó cada 10 seg. durante los 5 min. de reacción para controlar la pendiente de la curva. Los valores obtenidos a los 5 min fueron los utilizados para realizar el análisis de la actividad en todas las muestras. Los resultados se expresaron como nmol de NADPH/min/mg de proteína.

Extracción de esteroides de los CLs de rata

Pooles de 2-3 CLs de cada ovario, se homogeneizaron en 800 μl de acetona y se tomó una alícuota para luego realizar la medición de proteínas. Se transvasó el homogenato a un tubo nuevo y se centrifugó a 1600g durante 10 min. Luego el sobrenadante fue trasvasado a un tubo cónico y se evaporó a sequedad. El remanente se resuspendió en 1 ml de agua destilada y luego se incubó a 50°C 10 min. Sobre el resuspendido se realizaron dos extracciones con éter dietílico (1:2,5 vol/vol) para lo cual se agitaron con vórtex 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 agitaron con vórtex durante 2 min. y se descartó la fase superior. Finalmente se agregaron 2 ml de diclorometano a la fase inferior, y luego de su agitación con vórtex durante 2 min. se descartó la fase superior acuosa dejándose evaporar la inferior. Los residuos se resuspendieron en 750 μl de buffer RIA y se agitaron con vortex 4 veces durante 20 seg. Los esteroides extraídos fueron conservados a -20°C hasta realizarse las correspondientes mediciones (293).

Se realizó la medición de la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bio-Rad) en la alícuota de proteínas de cada muestra.

Radioinmunoensayo (RIA) de progesterona

Los esteroides extraídos del CL fueron utilizados para medir el contenido tisular de progesterona 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 10000 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%.

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 (294; 569).

Inmunohistoquímica (IHC)

Los ovarios extraídos fueron inmediatamente fijados en formalina 10% 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 montado sobre tacos de madera; se tallaron los tacos y se procedió a cortarlos con un micrótopo rotativo Reichert-Jung (espesor de 5 (rata) o 6 (mono) μm), adhiriéndoselos a portaobjetos cubiertos con polisina para los cortes utilizados para inmunocitoquímica. Y algunos cortes fueron adheridos a portaobjetos sin recubrir para luego realizar la tinción con hematoxilina-eosina.

Estos procedimientos fueron realizados por la Dra. Kelly Young en el ONPRC (muestras de monos) y en el laboratorio histológico de la técnica Patricia Bustingry en Buenos Aires (muestras de rata).

Cortes de rata

Las secciones ováricas se desparafinaron en xileno, se rehidrataron con distintas graduaciones de alcohol y se calentaron con microonda en buffer citrato de sodio 0,01M para la exposición de antígenos. La peroxidasa endógena se inactivó con peróxido de hidrógeno 3% durante 30 minutos a temperatura ambiente y se incubó con suero normal de conejo para evitar el pegado inespecífico. Las secciones ováricas se incubaron con los distintos primeros anticuerpos a 4°C durante toda la noche. Se utilizaron distintas concentraciones del primer anticuerpo de conejo, 1:500, 1:1000,

1:200, 1:200, respectivamente, para la IHC de caspasa-2, -3, (Santa Cruz, sc-626, sc-7148) -8 (Biovision Research Products, 3020-100) y -9 (sc-7885). Todos los primeros anticuerpos utilizados reaccionaban con tejido de rata, ratones y humanos. El primer anticuerpo fue detectado mediante el uso de un segundo anticuerpo anti conejo biotilado (dilución 1:400, Vector Laboratories, BA-1000) y el uso de Vector ABC kit (PK-4000). Se visualizó con el agregado de diaminobenzidina (DAB with a metal-enhanced substrate, Roche) y una contratinción con hematoxilina.

Los controles negativos fueron incubados sin el primer anticuerpo y las células positivas se identificaron por la presencia de reactividad marrón.

Cortes de mono

El protocolo utilizado para realizar las IHC en los cortes de mono constó de cambios menores como ser: una preincubación inicial (Antes de la desparafinización en xileno) a 57°C durante 5 min., el paso de citrato se realizó en una olla a presión durante 10 min. antes del bloqueo de la peroxidasa endógena y este último bloqueo se realizó durante 10 min. con peróxido de hidrógeno 3% en metanol (486). Los primeros anticuerpos para las caspasas-2, -3, -8 y -9 utilizados para los cortes de monos fueron los siguientes: sc-626, sc-1226, sc-7890, sc-7885; respectivamente. La información suministrada por la empresa (Santa Cruz) de estos anticuerpos indicaba que todos los anticuerpos reaccionaban con tejido humano. Cabe destacar que, utilizando los cortes de mono sólo funcionaron los anticuerpos de las caspasas-2 y-3.

Hematoxilina-Eosina (H&E) de los cortes del NCL de rata

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 en el laboratorio histológico de la técnica Patricia Bustingry. Luego se procedió a la evaluación de los cortes histológicos para evaluar la apoptosis en los CLs en el ciclo estral. Sólo se tuvieron en cuenta aquellas células con avanzados signos apoptóticos como ser múltiples fragmentos nucleares o pequeños núcleos marcados intensamente. Estos parámetros fueron los descriptos por Telleria y colaboradores en CL de rata (695).

TUNEL

Para la cuantificación y la localización in situ de núcleos con fragmentación apoptótica del ADN en cortes de ovario se realizó la técnica de TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Nick End Labeling), utilizando un kit comercial (DeadEnd Colorimetric TUNEL, Promega). La técnica se realizó siguiendo el protocolo del kit con unas pequeñas modificaciones (483; 485). Los cortes fueron desparafinaron y rehidratados de manera similar a descrita para la inmunohistoquímica. La incubación con la proteinasa K (20 µg/ml) se realizó durante 20 min. a temperatura ambiente. Los preparados se incubaron con la enzima rTdT (Enzima Deoxinucleotidil Transferasa Terminal recombinante) y la mezcla de nucleótidos biotinilados por 1 hora a 37°C una cámara húmeda. Los controles negativos no incluyeron la enzima rTdT. Luego de parar la reacción retirando los cortes de la estufa y colocándolos en solución SSC 2X durante 15 min., se inactivó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno 3% durante 20 min. Las muestras se incubaron 30 min. con una solución de estreptavidina HRP (1:500 en PBS) a temperatura ambiente, se lavaron con PBS y se visualizaron las células positivas con el agregado de diaminobenzidina (DAB) y una contratinción con hematoxilina.

El conteo se realizó utilizando el objetivo de 100X del microscopio. En el caso del ciclo estral se seleccionaron al azar 3 campos por CL (3 CLs del ciclo actual y 3 del ciclo anterior/ovario, 6-7 ovarios por estadio). En el modelo de preñez, se seleccionaron al azar 3 campos por CL (3 CLs por sección/ovario, 3-4 ovarios por grupo). Los resultados fueron expresados como porcentaje de células apoptóticas.

Análisis estadísticos de los datos

Los datos pareados fueron analizados utilizando el test de Student. Mientras que el análisis de los datos múltiples fue realizado utilizando el análisis de varianza (ANOVA), seguido por el test de Student-Newman-Keuls o el de Dunn's. Las diferencias fueron consideradas significativas con un $p < 0.05$ y los resultados se presentaron como el promedio \pm SEM.

El programa utilizado para realizar el análisis de los datos fue el Prism.

Resultados (Capítulo I, Parte A)

Capítulo I

(Estudios realizados en monos rhesus (*Macaca mulatta*))

- ✓ Expresión del ARNm, niveles proteicos y actividad de las caspasas-2, -8, -9 y -3 en el CL del mono rhesus en el ciclo menstrual natural y la regulación hormonal de la actividad en dichas caspasas.

- ✓ Niveles de apoptosis en el CL del mono rhesus en el ciclo menstrual natural

A- Expresión y actividad de las caspasas-2, -8, -9 y -3, y su correlación con los niveles de apoptosis en el CL del mono rhesus en el ciclo menstrual natural (NCL)

Niveles de expresión del ARNm de las caspasas-2, -8, -9 y -3 en el CL del mono rhesus durante el ciclo menstrual mediante las técnicas de RT-PCR y PCR en tiempo real

Los geles de agarosa realizados para analizar la integridad del ARN extraído de las muestras de mono del ciclo natural, demostraron la integridad del mismo al visualizarse claramente las 2 bandas correspondientes a los fragmentos 18S (1,8 Kb) y 28S (4,8 Kb), (ver Figura 1).

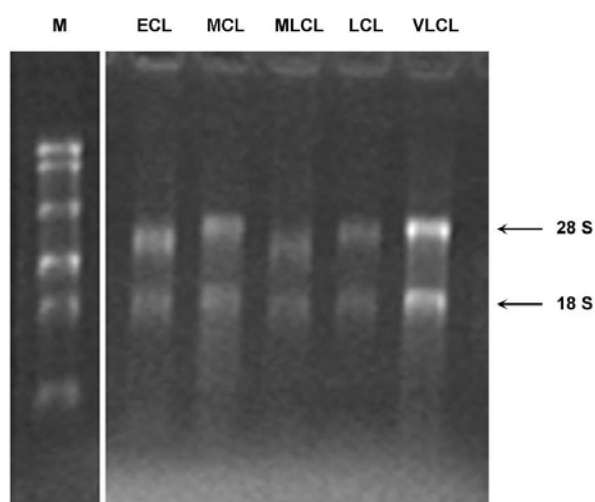
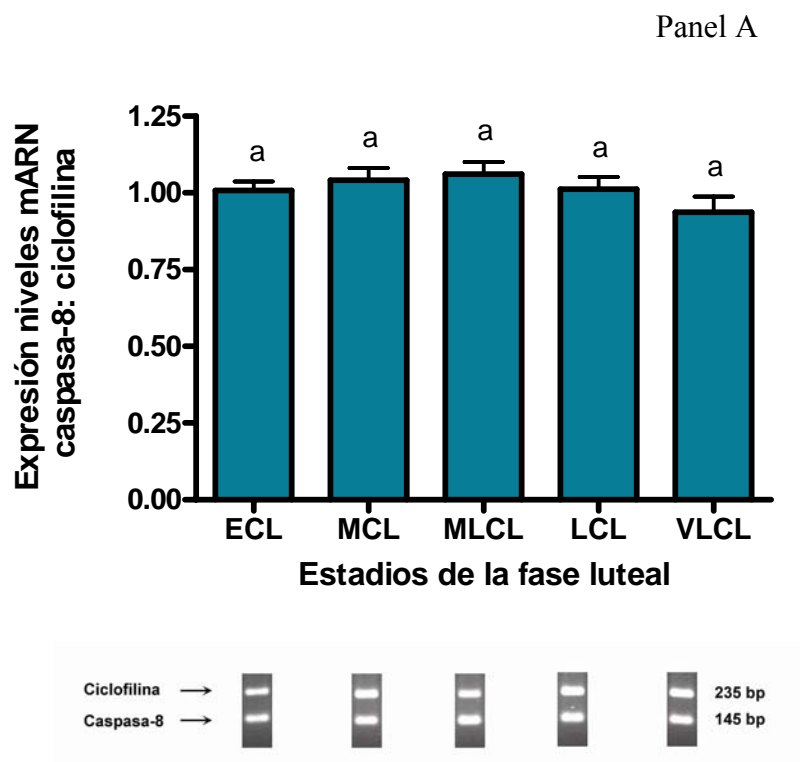
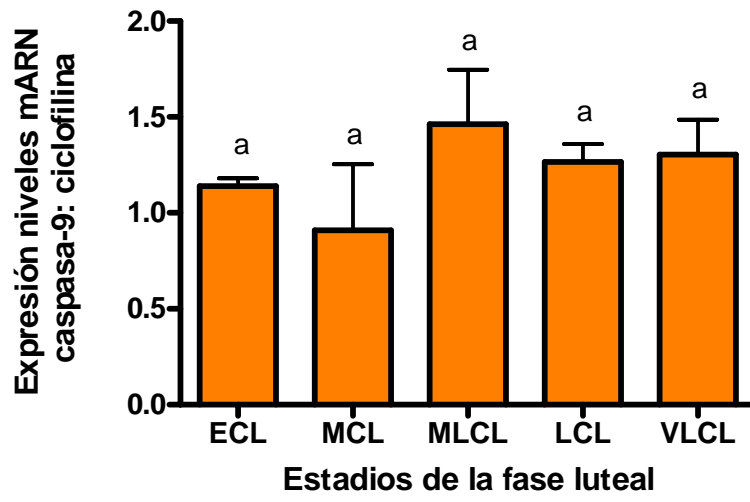


Figura 1. Gel de agarosa 1% para analizar la integridad del ARNm (Gel representativo) durante distintos estadios de la fase lútea en el mono rhesus [temprano (ECL, días 3-5), medio (MCL, días 6-8), medio-tardío (MLCL, días 10-12), tardío (LCL, días 14-16) y muy tardío (VLCL, días 17-18)]. Se corrió junto a las muestras un marcador de peso molecular (M)

Una vez chequeada la integridad del ARN de las muestras, se procedió a realizar la RT-PCR para las caspasas-2 (gráfico no mostrado), -8, -9 y -3. En ninguno de los casos se encontró una diferencia significativa ($p>0,05$) en la expresión del ARNm a lo largo de la fase luteal (ver Figura 2).



Panel B



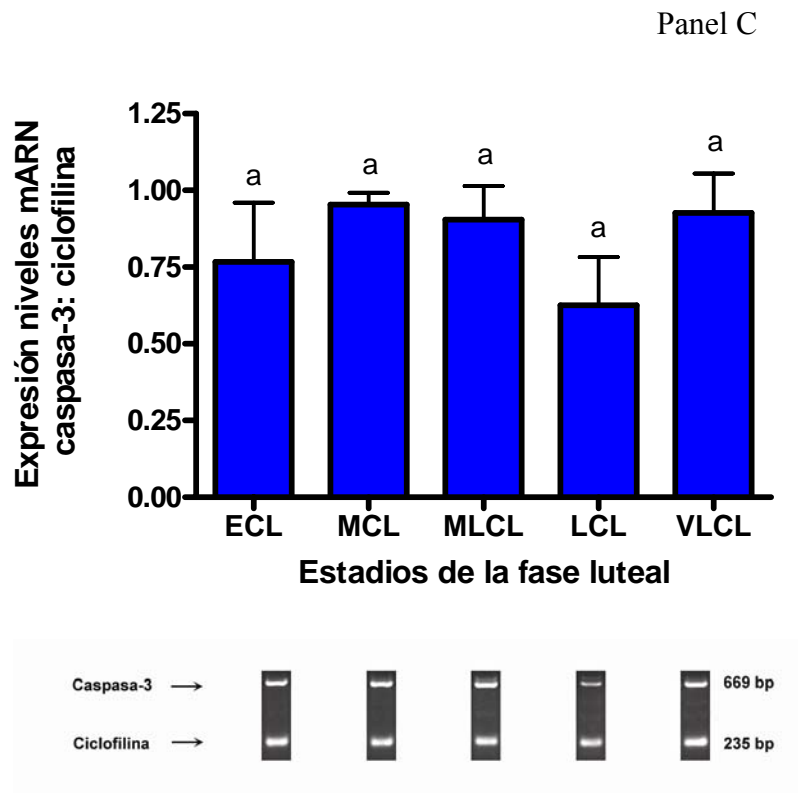


Figura 2. Niveles del ARNm (promedio \pm SEM) obtenidos por RT-PCR de las caspasas-8 (Panel A), -9 (Panel B) y -3 (Panel C) en el CL del mono rhesus durante distintos estadios de la fase lútea [temprano (ECL, días 3-5), medio (MCL, días 6-8), medio-tardío (MLCL, días 10-12), tardío (LCL, días 14-16) y muy tardío (VLCL, días 17-18)]. Los valores fueron normalizados con los niveles del ARNm de la ciclofilina. No se encontraron diferencias significativas en los niveles del ARNm de ninguna de las caspasas en estudio ($p > 0,05$, $n = 3-4$).

Secuenciación

Los resultados de la secuenciación de los 4 productos de amplificación confirmaron una homología del 93 al 97% con las caspasas humanas al introducir las secuencias obtenidas en el “BLAST” (Basic Local Alignment Search Tool). El BLAST es un programa que compara secuencias nucleotídicas o proteicas con secuencias que se encuentran en una base de datos y calcula su homología estadísticamente significativa. Una pequeña porción de los extremos en los fragmentos amplificados no fueron tenidos en cuenta para la secuenciación debido a la presencia de varios nucleóticos desconocidos. Las secuencias y homología de las 4 caspasas estudiadas se detallan a continuación:

Caspase-2 (Rhesus), 97 % homología

tctcatcatcaggaaactctaaaaagaaccgagtgtgctagccaaacagctgttgtagtgaactgttagaacatctct
ggagaaggacatcatcaccttggaatgaggagagctcatccaggccaaagtgggcagtttcagccagaacgtggaact
cctcaactgtgctgctaagaggggtcccaagctttgatgcttctgtgaagcactgaggagaccaagcaaggccact
ggaggatatgtgctcaccaccttccgggctcagcatgtactcccaccgtgagctgtgaccacgacttgagtctccttt
cccgtgtgtgagctctgtccacttcacaagaaggtccgctgtcgacagatactgtggaacactccctagacaataaagat
ggctctgtctgctcaggtgaagccttgactctgagtttatcagacacactccagctggcttataggttgagctctggc
ctcgtggcctgactgggttgagcaatgtgacttactggag

Caspase-3 (Rhesus), 94 % homología

Taaggactcaaaattctgtgcccacttccggtaaccgggctaagaatgtgcataaattcaagctgtcggcgtactgttc
agcatggcacaagcagctggtatgaaccaggcagccatccttgaatttcgccaagaataataaccaggtgctgtggcag
tatgcatacaagaagtcggcctcactgggattttatgacacgcatgtcctcctcaacaccactgtctgtctcaatgccaca
gtccagttctgtgccagcggcctgaataatgaaaagttgggtttccagtttagacttactacaatcccctctgaaaa
gcttgaatttttcaggtcaagaggtccattgttccaaaaattattccttcttccatggctcagaagcacacaaaaaac
tgetccttttctgtgatcttcttagaaacattacgcatcaattccacaatttctcagtgtaagatcgtttttattcctgactcgt
attcaagtttatgaatgtttccctgaggttctgcatcaacatctgtaccagaccgagatgccattccagtctgttatgaaa
attcttattattaaytattatacataaacccatctcaggataatccattttataactgtgtccagggatattcc

Caspase-8 (Rhesus), 93 % homología

Cnttnatggtnttccctcagactccancgaaaaagagtaatgttgtagggaaaaaatctggnccttctggaaggga
gnntgntcttccgcaattaatagactggattgntgattacnacca

Caspase-9 (Rhesus), 95 % homología

gggaaagtagagtaggacacaaagatgtcgctgggtgtgggcaaactagatacagcgtctagctggcgaaggctctcaa
atcttctggaacggggtggcgtctggctcggggtactgccagaggactcgtctcaggggaggtggaggccacctcaa
acctatggtctttctgctccccaccacaggcctggatgaaaaagagcttgggcttccctcccaggctggggcagctggtcc
cattgaagatgttcacaatcctctcgaccgacacaggcatccatctgtgccgtagacagcccctgggaactgcaggtggc
tggcctgacagccgtgagagagaatgaccaccacacagcagtcagagcactgtggtcccgcctgccagctccagca
aagctagcaccatttcttggcagtcaggtcgtgcttcacctcmccatgaaatgcagcaaagagaagcggcgtgcaac
ttctcacagtcaa

En el caso de la RT-PCR para la caspasa-2, los resultados fueron muy variables y poco confiables por lo que se procedió a realizar una PCR en tiempo real, obteniéndose un resultado similar al de la RT-PCR sin diferencias significativas ($p>0,05$) en los distintos estadios de la fase lútea (ver figura 3)

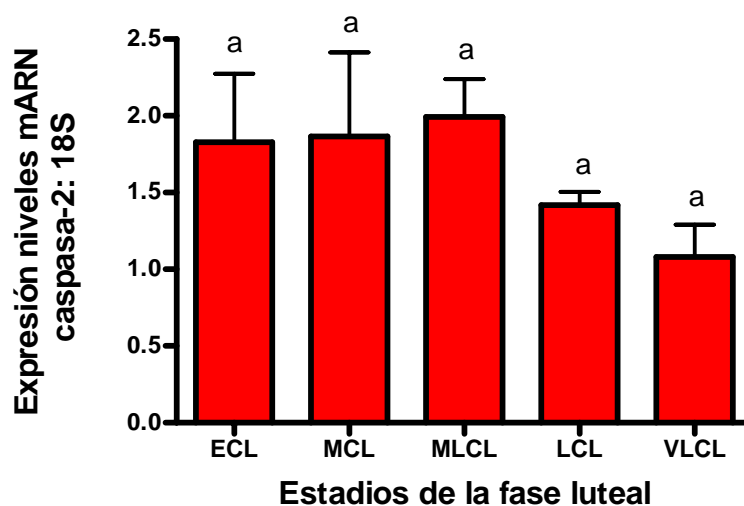
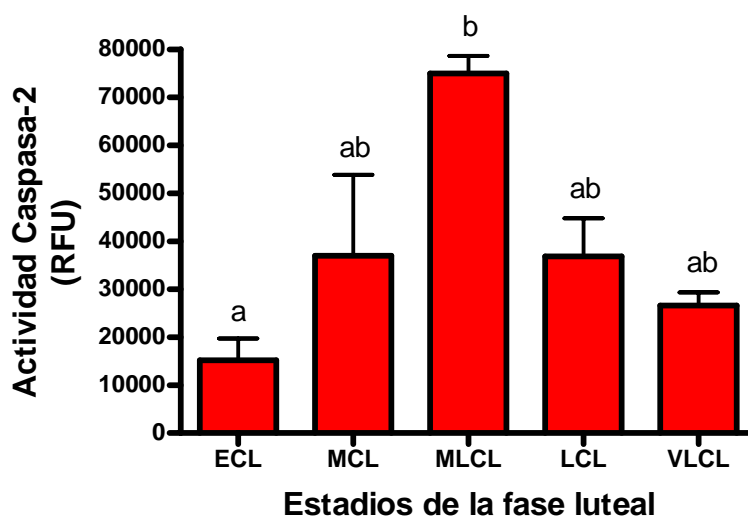


Figura 3. Niveles del ARNm (promedio \pm SEM) obtenidos por RT-PCR en tiempo real de la caspasas-2 en el CL del mono rhesus durante distintos estadios de la fase lútea [temprano (ECL, días 3-5), medio (MCL, días 6-8), medio-tardío (MLCL, días 10-12), tardío (LCL, días 14-16) y muy tardío (VLCL, días 17-18)]. Los valores fueron normalizados con los niveles del ARNm del 18S. No se encontraron diferencias significativas en los niveles del ARNm de esta caspasa ($p>0,05$, $n=3-4$).

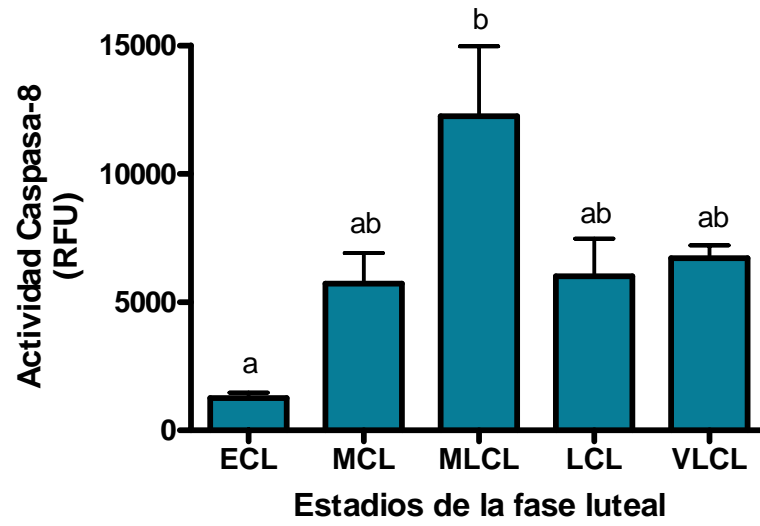
Cuantificación de la actividad de las caspasas-2, -8, -9 y -3 en los distintos estadios del CL en el ciclo menstrual del mono rhesus por un método enzimático

Se observó un patrón similar durante los distintos estadios de la fase luteal en la actividad de las 4 caspasas estudiadas (ver figura 4). La actividad fue baja en ECL, aumentando hasta alcanzar un pico de actividad en MLCL ($p < 0,05$), seguido de una disminución en LCL y VLCL. La disminución de MLCL a VLCL fue significativa ($p < 0,05$) en el caso de la caspasa efectora -3, pero dicha disminución no fue significativa para ninguna de las caspasas iniciadoras (-2, -8 y -9).

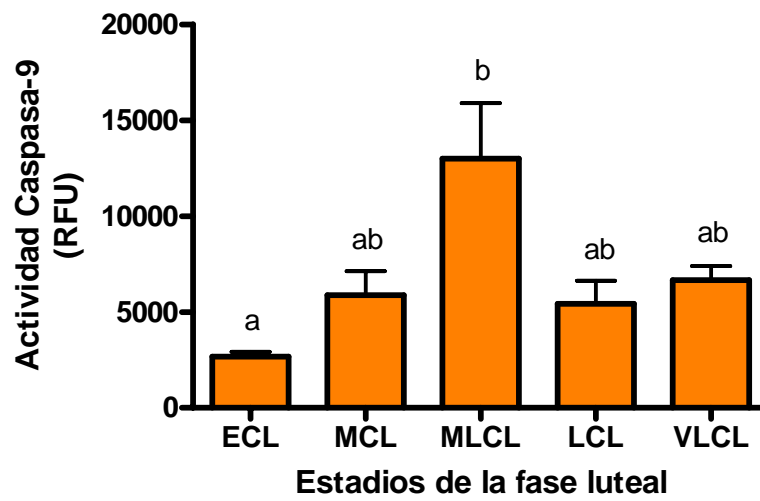
Panel A



Panel B



Panel C



Panel D

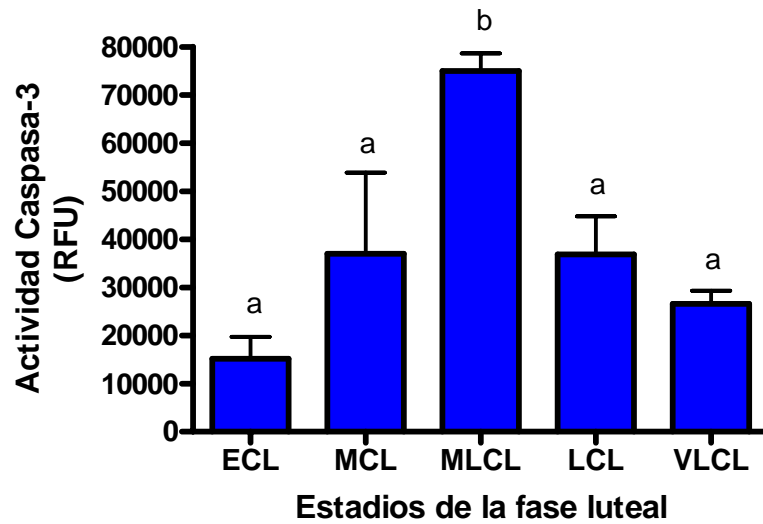


Figura 4. Actividad enzimáticas de las caspasas iniciadoras -2 (Panel A), -8 (Panel B) y -9 (Panel C), y la efectora caspasa-3(Panel D) durante la fase lútea del mono rhesus. La actividad (promedio \pm SEM) fue expresada como unidades relativas de fluorescencia (RFU). Las diferentes letras muestran una diferencia significativa en la actividad de estas caspasas en los distintos estadios del CL ($p < 0,05$, $n = 3-4$).

Cuantificación del fragmento clivado (p17) de la caspasas-3 por un ELISA en los distintos estadios del CL en el ciclo menstrual del mono rhesus

En los estadios tempranos (ECL y MCL) de la fase luteal fueron detectados bajos niveles del fragmento clivado (p17) de la caspasa-3. Sin embargo, los niveles aumentaron significativamente ($p < 0,05$) en el siguiente estadio (MLCL) donde se alcanza un pico máximo de detección (ver figura 5). Dicho incremento fue de 58 veces con respecto a MCL. Luego se observó una disminución en los niveles de p17 en los siguientes estadios (LCL y VLCL).

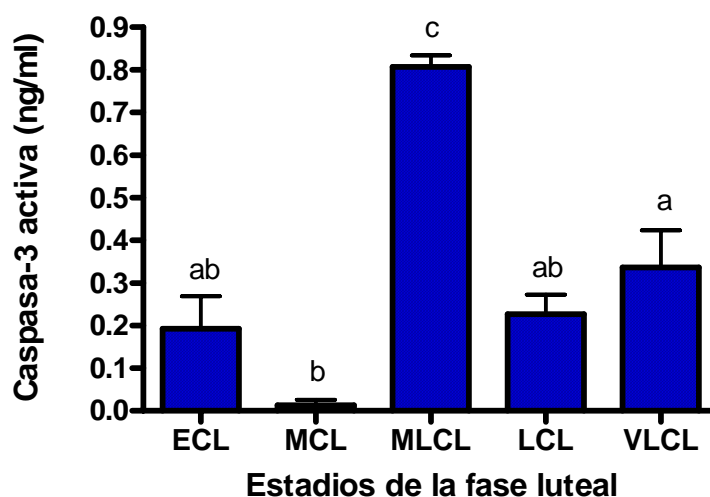


Figura 5. Niveles proteicos de la caspasa-3 clivada (promedio \pm SEM) determinados con un ELISA en el CL a lo largo de la fase luteal del mono rhesus [temprano (ECL, días 3-5), medio (MCL, días 6-8), medio-tardío (MLCL, días 10-12), tardío (LCL, días 14-16) y muy tardío (VLCL, días 17-18)]. Las distintas letras representan una diferencia significativa en los niveles proteicos entre los estadios a lo largo de la fase lútea ($p < 0,05$, $n = 3-4$).

Expresión proteica y localización de las caspasas-2 y -3 en el CL del mono rhesus en el ciclo menstrual

La marca positiva (marca marrón) para la IHC de caspasa-2 (ver figura 6) fue detectable en el CL durante toda la fase lútea, pero con un incremento en los últimos estadios (LCL y VLCL). La marca se encontró principalmente en el citoplasma de las células granulosa-luteínicas, pero no en las células teca-luteínas ni en el estroma. A partir de MLCL se encontraron células teñidas intensamente aumentando hacia los últimos estadios. El control negativo sin el primer anticuerpo no presentó marca.

La marca específica para la IHC de la caspasa-3 (ver figura 7) se observó durante toda la fase luteal en el CL de mono. La marca se encontró en el citoplasma y/o núcleo de las células granulosa y teca-luteínicas, pero no en el estroma. La marca para la caspasa-3 fue más intensa a partir de MCL. La aparición de marca positiva en el núcleo de las células luteales fue detectada principalmente en MLCL y a partir de dicho estadio se observó en núcleo hasta los estadios tardíos de la fase luteal. Al igual que para la caspasa-2, no se observó marca en el control negativo.

Como se mencionó en materiales y métodos, los anticuerpos utilizados para la IHC de las caspasas -8 y -9 no funcionaron.

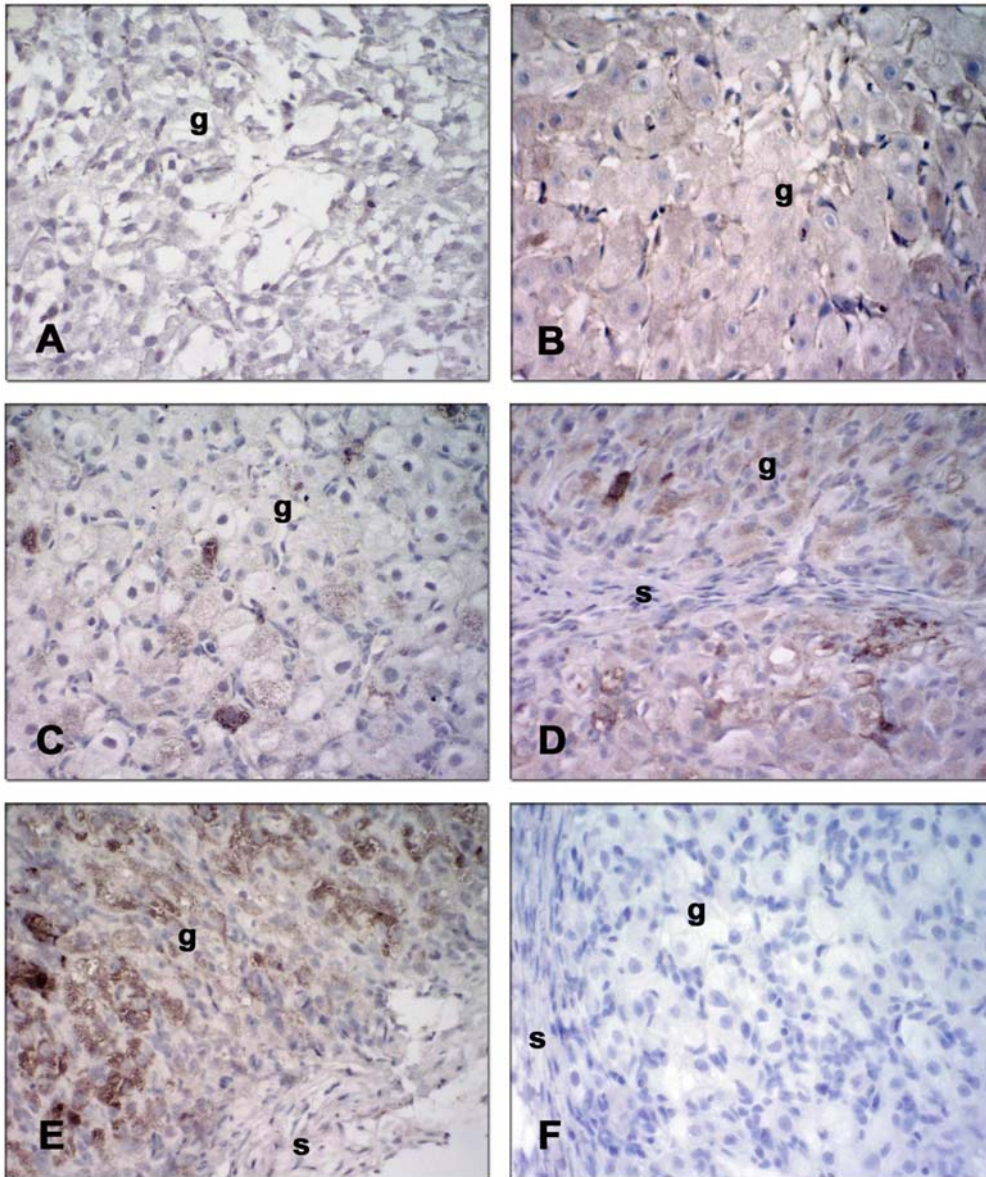


Figura 6. Microfotografía de secciones de CL en los distintos estadios de la fase lútea [temprano (ECL, días 3-5, Panel A), medio (MCL, días 6-8, Panel B), medio-tardío (MLCL, días 10-12, Panel C), tardío (LCL, días 14-16, Panel D) y muy tardío (VLCL, días 17-18, Panel E)], sometidos a una inmunohistoquímica (IHC) para caspasa-2. Las células positivas se identificaron por la presencia de reactividad marrón. La marca se observó en el citoplasma de las células granulosa-luteínicas (g), pero no en las células teca-luteínicas o el estroma (s). El control negativo (incubado sin primer anticuerpo, Panel F) no presentó marca positiva.

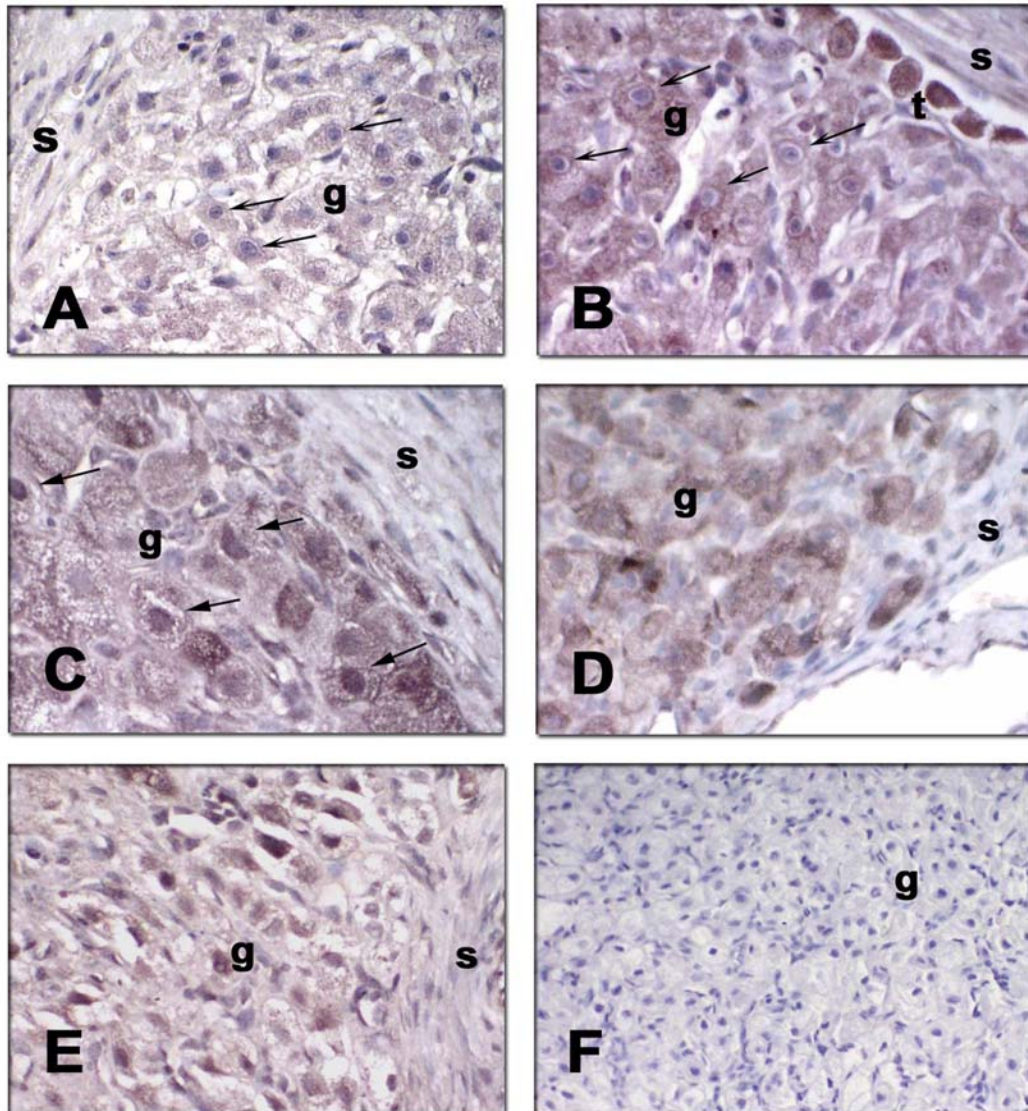


Figura 7. Microfotografía de secciones de CL en los distintos estadios de la fase lútea [temprano (ECL, días 3-5, Panel A), medio (MCL, días 6-8, Panel B), medio-tardío (MLCL, días 10-12, Panel C), tardío (LCL, días 14-16, Panel D) y muy tardío (VLCL, días 17-18, Panel E)], sometidos a una inmunohistoquímica (IHC) para caspasa-3. Las células positivas se identificaron por la presencia de reactividad marrón. La marca se observó en el citoplasma y en el núcleo (flecha) de las células granulosa-luteínicas (g) y teca-luteínicas, pero no en el estroma (s). El control negativo (incubado sin primer anticuerpo, Panel F) no presentó marca positiva.

Estudio de la apoptosis en los distintos estadios del CL en el ciclo menstrual del mono rhesus mediante la técnica de TUNEL

La fragmentación nuclear fue evaluada mediante la técnica de TUNEL como se describió en los materiales y métodos. La marca positiva observada en los distintos estadios incrementó a medida que transcurrió la fase lútea (ver figura 8). Dicha marca provino de las células luteales (granulosa y teca-luteínicas) y de las células endoteliales. Pero no se encontró marca positiva en el estroma ni en el control negativo sin la enzima TdT.

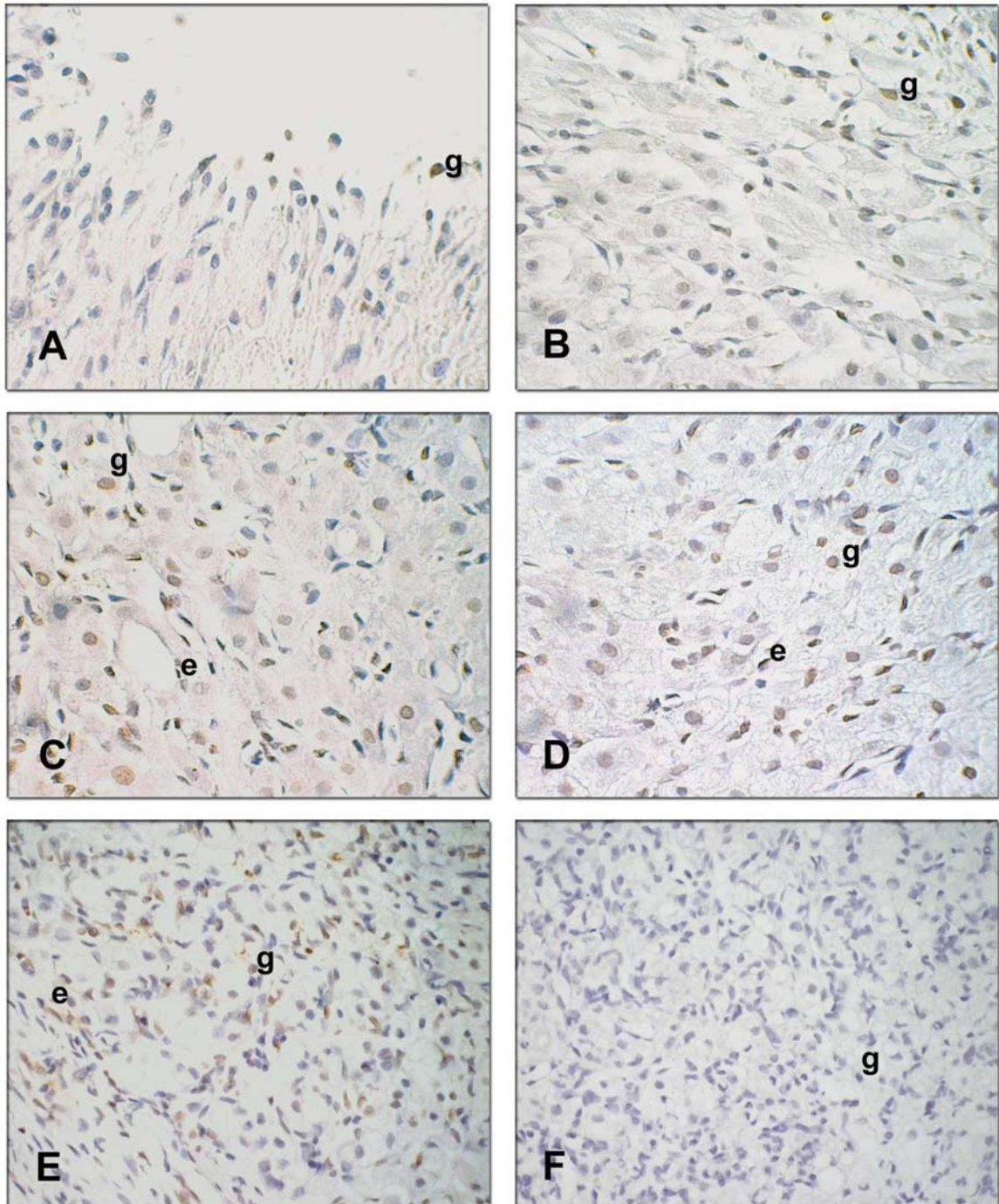


Figura 8. Análisis in situ de la fragmentación de ADN (TUNEL) en secciones de de CL en los distintos estadios de la fase lútea [temprano (ECL, días 3-5, Panel A), medio (MCL, días 6-8, Panel B), medio-tardío (MLCL, días 10-12, Panel C), tardío (LCL, días 14-16, Panel D) y muy tardío (VLCL, días 17-18, Panel E)]. La marca positiva se identificó por la presencia de reactividad marrón. Las letras (g) y (e) indican las células granulosa-luteínicas y endoteliales, respectivamente. No se observó marca positiva en el estroma ni en el control negativo incubado sin la enzima TdT (Panel F).

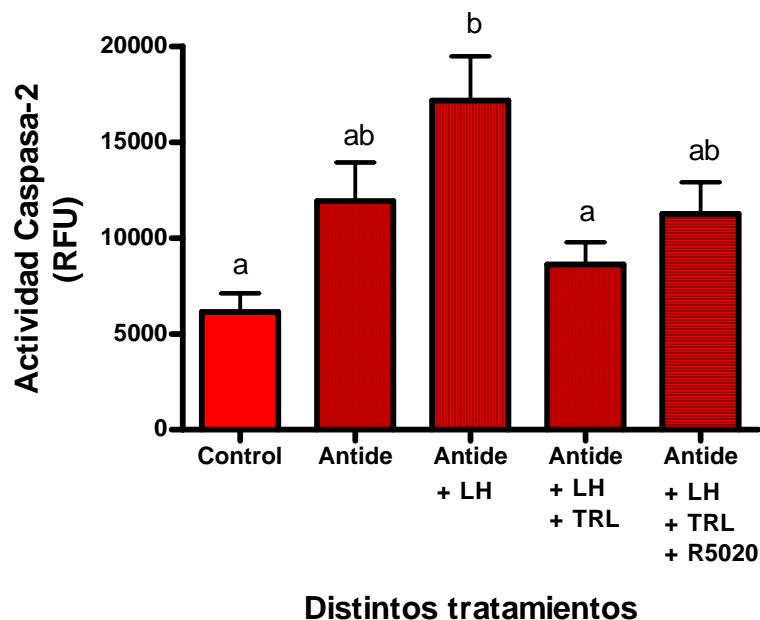
Resultados (Capítulo I, Parte B)

B- Regulación de la actividad de las caspasas-2, -8, -9 y -3 en el CL utilizando un modelo de regulación hormonal de remoción y reemplazo (RCL) en el mono rhesus

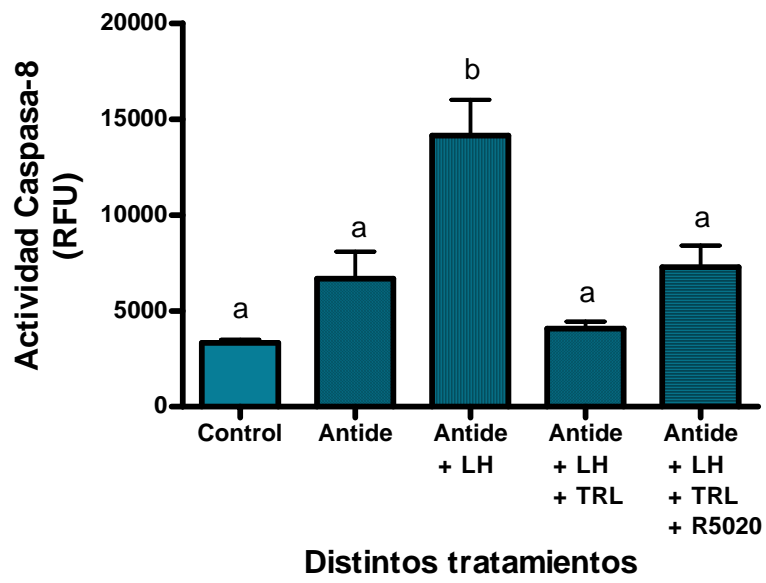
Cuantificación de la actividad de las caspasas-2, -8, -9 y -3 en el CL del mono rhesus en los distintos tratamientos por un método enzimático

El tratamiento *in vivo* con antide no produjo cambios significativos ($p>0,05$) en la actividad de ninguna de las caspasas estudiadas (ver figura 9). Sin embargo, el tratamiento de antide junto a LH produjo un aumento significativo ($p<0,05$) para las caspasas iniciadoras (-2, -8 y -9) y el tratamiento añadiendo TRL fue capaz de revertir dicho aumento. Pero cuando se le agregó R5020 no tuvo ningún efecto. En el caso de la caspasa efectora -3, ninguno de los tratamientos produjo cambios significativos ($p>0,05$).

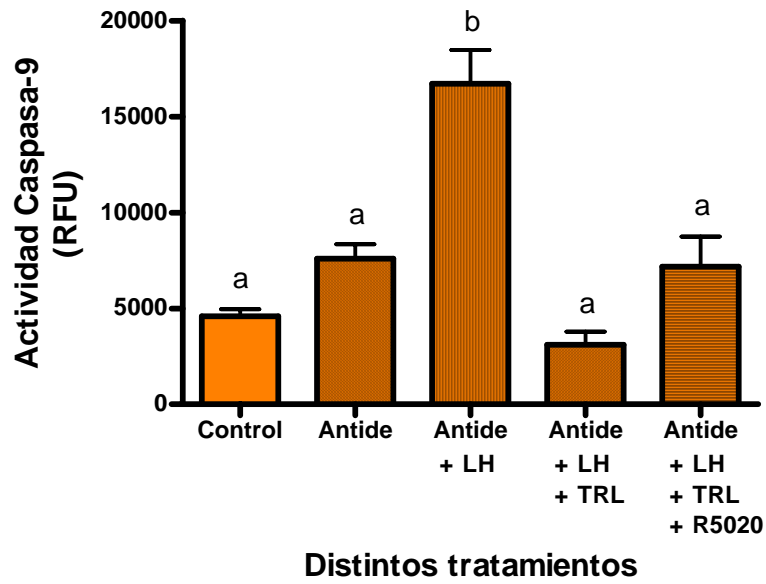
Panel A



Panel B



Panel C



Panel D

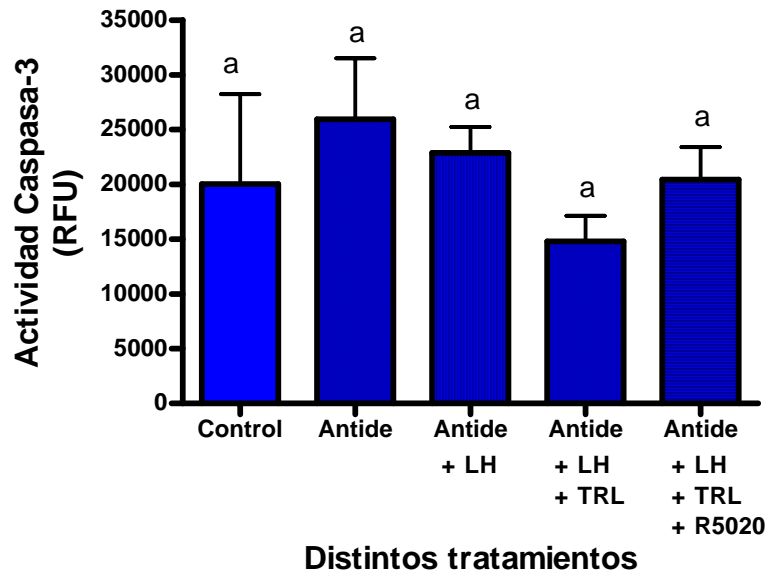


Figura 9. Actividad enzimáticas (promedio \pm SEM) de las caspasas iniciadoras -2 (Panel A), -8 (Panel B) y -9 (Panel C), y la efectora caspasa-3 (Panel D) en los distintos grupos del ciclo menstrual regulado [Control, Antide, LH, Trilostano, R5020]. La actividad fue expresada como unidades relativas de fluorescencia (RFU). Las diferentes letras muestran una diferencia significativa en la actividad de estas caspasas en los distintos estadios del CL ($p < 0,05$, $n = 3-4$).

Discusión (Capítulo I)

En primates, existen controversias acerca del proceso de muerte celular involucrado en la luteólisis. Si bien algunos trabajos demuestran que las células

luteales mueren por el proceso de apoptosis al igual que en otras especies, (190; 219; 586; 665; 729; 770; 788), otros proponen en cambio, una forma diferente de muerte celular programada denominada autofagocitosis (192; 419; 508). En este último tipo de muerte celular, la destrucción del núcleo se encuentra retrasada y el citoplasma es activamente destruido mucho tiempo antes de la observación de cambios nucleares. Además es importante tener en cuenta que, este proceso es independiente de caspasas.

En el presente trabajo, la expresión del ARNm, la inmunodetección y la actividad enzimática detectadas en los distintos estadios del CL, confirmaron la presencia de las caspasas iniciadoras -2, -8 y -9, y la principal efectora -3 a lo largo de la fase lútea durante el ciclo menstrual del mono rhesus. No obstante, los niveles del ARNm de ninguna de las cuatro caspasas estudiadas presentaron cambios significativos en los distintos estadios del CL. Estos resultados sugieren que la regulación de estas proteasas en el CL de primates no sería a nivel de la expresión del ARNm. Sin embargo, las muestras fueron tomadas con intervalos de 3-4 días de manera que no se puede descartar algún posible cambio en aquellos días que no fueron estudiados. Cabe aclarar que, se han reportado pocos trabajos que muestren una variación en las caspasas a nivel del ARNm en el CL, los cuales se observaron utilizando modelos farmacológicos de luteólisis en animales domésticos. En dichos trabajos, se observa un incremento en los niveles del ARNm de las caspasas-1 (bovino) y -3 (ovino) luego del tratamiento con PGF-2 α (547; 553).

Luego de evaluar la expresión del ARNm de las caspasas, se procedió a estudiar la localización celular de las mismas. Para ello, se realizaron IHC en cortes histológicos del CL en los distintos estadios de la fase lútea. Sólo se realizaron IHC de las caspasas-2 y -3 dado que los anticuerpos disponibles contra las caspasas-8 y -9 humanas no funcionaron. Según los datos comerciales de los anticuerpos contra las caspasas-2 y -3, ambos anticuerpos serían capaces de reconocer tanto a la proenzima como a los fragmentos clivados. Existe literatura que lo demuestra para el caso de la caspasa-3 (141; 742). Sin embargo, no ocurre lo mismo para la caspasa-2 y los intentos en detectar los fragmentos clivados por western blot en el laboratorio fallaron, pudiéndose detectar únicamente a la procaspasa. La localización celular de las dos caspasas fue diferente. Se observó expresión de ambas caspasas en las células granulosa-luteínicas y solamente expresión de la caspasa-3 en las células teca-luteínicas. Estos resultados sugieren que probablemente las células granulosa-

luteínicas y las teca-luteínicas posean caminos de iniciación de activación de la cascada de las caspasas. Cabe resaltar que, la inmunolocalización de la caspasa-3 se detectó no sólo en el citoplasma de las células luteales (como en el caso de la caspasa-2) sino también en el núcleo. Asimismo, la marca en citoplasma se encontró en todos los estadios del CL estudiados, mientras que solamente se encontró marca en el núcleo a partir del MLCL. Lo interesante de estos resultados es que la forma inactiva de las caspasas se encuentra localizada en distintos compartimentos celulares que luego de su activación, es traslocada a su sitio de acción (713). En especial, las caspasas efectoras deben ser traslocadas al núcleo donde clivarán a las diversas moléculas blanco, como ser la PARP (Poli ADP-ribosa polimerasa). Por lo tanto, la detección de marca en núcleo podría estar reflejando la activación y traslocación de la caspasa-3 en MLCL. Esto estaría de acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de actividad enzimática, donde justamente se observa el pico de su actividad en este estadio. En el caso de la caspasa-2, se encontró expresión de dicha caspasa sólo en el citoplasma de las células granulosa-luteínicas. La diferencia de localización celular con respecto a la caspasa-3 puede deberse a la imposibilidad del anticuerpo anti caspasa-2 de detectar los fragmentos clivados. O quizás, puede ser que si bien la forma activa de esta caspasa se trasloca al núcleo, su importancia difiere ya que la caspasa-2 es una caspasa iniciadora y su principal función es clivar a otras caspasas iniciadoras y efectoras (localizadas en citoplasma, mitocondria, retículo endoplásmico o golgi), desencadenando así la cascada de activación de las caspasas. El análisis cualitativo de la IHC de caspasa-2 muestra un aumento de expresión (en cuanto a intensidad y número de células marcadas) en el CL en los estadios tardíos de la fase lútea. Mientras que, los resultados de la IHC de caspasa-3 muestran una mayor expresión a partir de MCL, disminuyendo hacia el último estadio (VLCL).

Los niveles de la caspasa-3 activa medidos por ELISA, al igual que la actividad de la misma y de las otras tres caspasas evaluadas, aumentan significativamente en MLCL, estadio en el cual además comienza a ser inmunodetectada la caspasa-3 en núcleo. Cabe resaltar que, en MLCL del mono rhesus (día 10-12 post pico de LH preovulatorio) el CL recién comienza a regresionar, los niveles de progesterona aún se encuentran elevados (> 1 ng/ml) y el peso del CL no ha disminuido (777). Estos resultados sugieren que la activación de las caspasas sería un evento temprano cercano al comienzo de la luteólisis y en primates, podría

ser de importancia para la luteólisis funcional. Aunque, habría que dilucidar si también sería importante en la luteólisis estructural.

Dado que la activación de las caspasas es un evento clave en la apoptosis (713), la presencia de un pico elevado de la actividad de las cuatro caspasas (tres iniciadoras y la principal caspasa efectora) en MLCL sugiere que el proceso de apoptosis ocurriría durante la luteólisis en el ciclo menstrual del mono rhesus. Cabe recordar además que, la autofagocitosis es un proceso independiente de caspasas. En nuestro modelo experimental, para correlacionar la activación de las caspasas con el proceso de apoptosis, se estudiaron los niveles de apoptosis en los distintos estadios del CL en el ciclo menstrual del mono rhesus mediante la técnica de TUNEL. Aunque los diversos enfoques basados en la fragmentación del ADN, como por ser el TUNEL, poseen sus limitaciones (721), se ha demostrado que los resultados obtenidos por TUNEL se correlacionan con otros índices apoptóticos (morfológicos y bioquímicos) en el CL, inclusive en humanos (587; 713; 786).

El análisis inmunohistoquímico de la fragmentación de ADN en el núcleo reveló la presencia de células apoptóticas en el CL a lo largo de la fase lútea del mono rhesus. Observándose un aumento en el número de células con marca positiva a medida que la fase lútea progresó. De manera que, es posible que los niveles bajos de actividad de las caspasas en los estadios tempranos del CL se encuentren asociados a las pocas células apoptóticas detectadas en dichos estadios (316) y que el incremento en la actividad de las caspasas conlleve a un aumento en la muerte celular a medida que la luteólisis avanza. Asimismo, estudios realizados *in vivo* e *in vitro* utilizando un modelo de ratón knock-out para la caspasa-3 demostraron que esta proteasa sería esencial para la regresión estructural del CL. En acuerdo con estos resultados, se demostró además en cultivo que inhibidores de las caspasas-1 y -3 eran capaces de suprimir los fenotipos apoptóticos del CL de conejos (4). Sin embargo, algunos autores basados en la fragmentación del ADN de las células luteales en la fase luteal media en humanos, proponen que la apoptosis no se encontraría limitada a la regresión estructural final del CL (589). Por otro lado, se ha reportado que cambios observados en la actividad de la caspasa-3 en el CL de la preñez de rata no se correlacionaban con el número de células apoptóticas encontradas, sugiriendo que la regresión del CL luego del parto se encontraría asociada a un mecanismo apoptótico independiente de la caspasa-3 (682). Sin embargo, hay que tener en cuenta las diferencias que ocurren entre las especies y los distintos ciclos reproductivos (estral o

menstrual). Algunas especies, como los hamsters, poseen una abrupta desaparición del CL, mientras que otras poseen una desaparición gradual del mismo, por lo tanto diferentes mecanismos de disolución serían posibles. Asimismo, está descrito que las caspasas poseen funciones alternativas, como por ejemplo el control de la proliferación, diferenciación o producción de citoquinas (21; 355). A pesar de los escasos y discordantes antecedentes acerca de las caspasas y la luteólisis, los resultados obtenidos en esta tesis del ciclo menstrual natural del mono rhesus sugieren que la activación de las caspasas en MLCL está influenciando el comienzo o progresión de la luteólisis.

A partir de estos resultados entonces se procedió a evaluar la regulación hormonal de la actividad enzimática de estas caspasas, utilizando un modelo de tratamiento de remoción y reemplazo hormonal, previamente descrito por el laboratorio del Dr. Stouffer (780; 784). El objetivo fue dilucidar, entre otras cosas, si la bajada en los niveles de progesterona era la causa o consecuencia del incremento en la actividad de las cuatro caspasas en MLCL. En trabajos previos del laboratorio del Dr. Stouffer se ha estudiado el efecto del antide (antagonista de GnRH), LH recombinante humana, TRL (inhibidor de la 3β -HSD) y R5020 (progestágeno no metabolizable) en monas adultas. Como ya se mencionó, han demostrado que el antide suprime los niveles bioactivos circulantes de LH y la función luteal, así como también observaron que la administración de LH recombinante reconstituye las funciones de LH (159). En otro trabajo demostraron que el TRL era capaz de inhibir la producción luteal de progesterona y que R5020 era capaz de reconstituir la función de progesterona (155). Por otro lado, existen evidencias que sugieren que la progesterona suprime la actividad de la caspasa-3 (458; 674), la apoptosis (539) y la regresión luteal (163; 779) en el CL de animales que poseen una fase lútea prolongada (animales domésticos y primates, entre otros). Sin embargo, como se explicó anteriormente en MLCL los niveles de progesterona aún son elevados y recién comienzan a disminuir, por lo que los resultados obtenidos acerca de la actividad de las caspasas en el ciclo menstrual del mono rhesus no se correlacionarían con el efecto supresor de la progesterona.

Se pudo observar que el tratamiento con antide no fue capaz de estimular ni de inhibir la actividad de ninguna de las caspasas, mientras que el tratamiento de antide junto con LH recombinante produjo un aumento significativo en la actividad de las caspasas iniciadoras (-2, -8 y -9). A pesar de que en materiales y métodos se explicó

el motivo por el cual este protocolo fue seleccionado, la falta de un efecto en los niveles de actividad de las caspasas luego del tratamiento con un antagonista de GnRH, podría ser debido a una falla en la selección del tiempo correcto de exposición y/o la dosis del antagonista. O quizás como propuso Fraser y colaboradores, los mecanismos y formas de regresión luteal durante el ciclo menstrual natural difieren de los asociados a la luteólisis farmacológica inducida por el tratamiento con prostaglandinas o antagonistas de GnRH (193). Basándonos en un trabajo previo donde se observó un aumento de expresión de las caspasas-2 y -3 luego de la remoción de las gonadotrofinas en folículos preovulatorios de monos (722), hubiéramos esperado que el tratamiento con antide produzca un efecto similar. Y además, que en el caso del grupo antide más LH haya una disminución en la actividad en lugar de un aumento. Respaldao nuestros resultados, existen trabajos que mostraron que el agregado de hormonas tróficas como la LH-CG o quizás sus mensajeros intracelulares (AMPC, por ejemplo) pueden inducir a las caspasas efectoras-3 y -7 en las células de granulosa de folículos preovulatorios (360; 753). Actualmente, no se dispone de muchos trabajos acerca de los mecanismos involucrados en la activación de las caspasas estimulada por las gonadotrofinas en el CL, por lo que sería interesante profundizar estos estudios.

Como consecuencia del tratamiento con el inhibidor de la 3β -HSD, TRL, se observó una supresión del aumento inducido por el LH exógeno; sugiriendo que esta inhibición se encontraría mediada por esteroides producidos localmente. En estudios previos realizados en el laboratorio del Dr. Stouffer utilizando este mismo enfoque de remoción y reemplazo hormonal, pudieron distinguir entre los procesos regulados por LH, aquellos que eran dependientes o mediados al menos en parte por la acción local de progesterona de aquellos procesos independientes de dicha hormona (154; 778; 785). No obstante, el reemplazo con R5020 no fue capaz de revertir la inhibición producida por el TRL. De estos resultados se desprende que el aumento en la actividad de las caspasas por la LH se encontraría mediado por otros esteroides locales, en lugar de la progesterona. Cabe resaltar que, el CL es capaz de sintetizar también andrógenos y estradiol. Se ha demostrado que altos niveles de estrógenos son producidos y secretados por el CL del ciclo menstrual en primates (83). Al mismo tiempo, la presencia del receptor β del estradiol y del receptor de andrógenos fue detectada en el CL de primates (150; 153). De manera que, el estradiol y/o los andrógenos podrían tener un papel local en CL. Como se expuso en la introducción,

Knobil hace muchos años había propuesto que el estradiol era un factor luteolítico endógeno que actuaba de forma local en el CL de primates (320). Asimismo, se demostró que la administración sistémica o local de estradiol era capaz de inducir luteólisis prematura en monos y mujeres. Sin embargo, esta premisa no fue apoyada dada la dificultad de detectar al receptor clásico de estradiol ($ER\alpha$) en el CL de primates. Con la detección del receptor β en el CL de primates, la premisa propuesta por Knobil debería ser reconsiderada y reevaluada.

En conclusión, nuestros resultados indican que varios miembros de la familia de las caspasas (-2, -3, -8 y -9) se encuentran expresados y activos en el CL durante la fase lutea del ciclo menstrual natural del mono rhesus. Asimismo, el aumento transiente en la actividad de las caspasas iniciadoras y la principal caspasa efectora en MLCL (donde los niveles de progesterona aún son elevados), sugiere que las caspasas estarían involucradas en la etapa temprana de la regresión del CL de primates. Por otro lado, la regulación de las caspasas en el CL de primates sería a nivel de la traducción o de la activación enzimática y no a nivel de la transcripción. Por último, los resultados obtenidos del modelo de remoción y reemplazo hormonal sugieren que las gonadotrofinas y esteroides locales, estarían regulando principalmente la activación de la cascada de las caspasas a nivel de las iniciadoras (-2, -8 y -9).

Resultados (Capítulo II, Parte A)

Capítulo II

(Estudios realizados en ratas adultas (*Rattus norvegicus*, cepa Sprague Dawley))

- ✓ Expresión proteica y actividad de las caspasas-2, -8, -9 y -3 en el CL de la rata en el ciclo estral, preñez y post-parto, y luego de la administración *in vivo* de PGF-2 α a ratas preñadas
- ✓ Niveles de apoptosis en el CL de los distintos modelos

A- Expresión y actividad de las caspasas-2, -8, -9 y -3, y su correlación con los niveles de apoptosis en el CL de la rata en el ciclo estral natural (NCL)

Indices estructurales y funcionales del CL (peso, niveles de P₄, P450scc, actividad de la 20 α -HSD) en los distintos estadios del CL en el ciclo estral de la rata

Las diferencias de peso entre los 2 grupos aislados en cada estadio (E y DII) confirmaron la presencia de 2 poblaciones de CLs aisladas bajo criterios de tamaño e irrigación. Los pesos de los distintos CLs del ciclo actual y del anterior, tanto en E como en DII fueron significativamente distintos (CL del ciclo actual vs. CL del ciclo anterior en E: $3,9 \pm 0,4$ vs. $11,3 \pm 0,7$ mg; DII: $12,2 \pm 0,6$ vs. $5,2 \pm 0,4$ mg; $p < 0,05$). En la figura 10 se pueden observar los pesos de las 2 poblaciones de CLs en E y DII ordenados cronológicamente.

Los niveles de progesterona medidos en el ciclo estral de la rata mostraron un aumento significativo ($p < 0,01$) en el CL del ciclo actual en DII comparado con los otros estadios del CL estudiados como ya está descrito (ver figura 11).

Los resultados del western para la proteína P450scc se muestran en la figura 12, pudiéndose observar el gráfico correspondiente al análisis densitométrico normalizado con el control interno (GAPDH). Debajo de dicho gráfico se muestra una foto representativa de la membrana del western para dichas proteínas. En la membrana se puede apreciar una banda de 53 KDa correspondiente a la proteína P450scc y otra de 36 KDa correspondiente a GAPDH. Los resultados normalizados de la proteína P450scc mostraron un aumento significativo ($p < 0,05$) en el CL del ciclo actual en DII.

La actividad de la 20 α -HSD evaluada en los distintos CLs del estral mostró un aumento significativo en su actividad ($p < 0,001$) en el CL del ciclo anterior en E con respecto a los otros estadios del CL estudiados (ver figura 13).

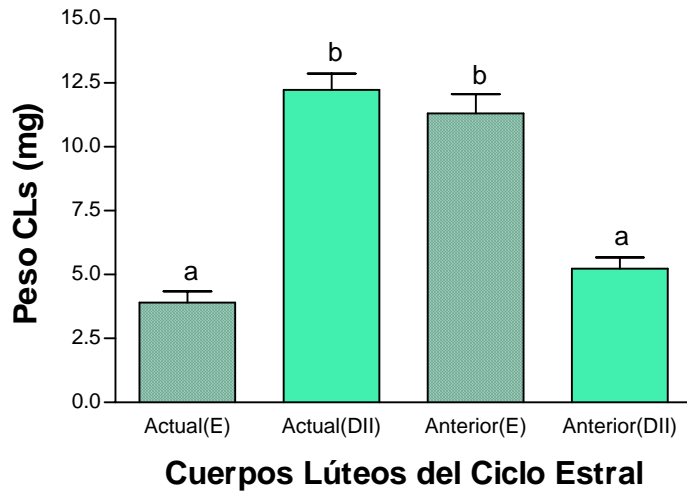


Figura 10. Peso (promedio \pm SEM) de los distintos CLs (población actual y anterior) del ciclo natural de la rata en estro (E) y diestro II (DII). Las distintas letras muestran una diferencia significativa en el peso en los distintos CL ($p < 0,05$, $n = 12-15$ CLs por grupo).

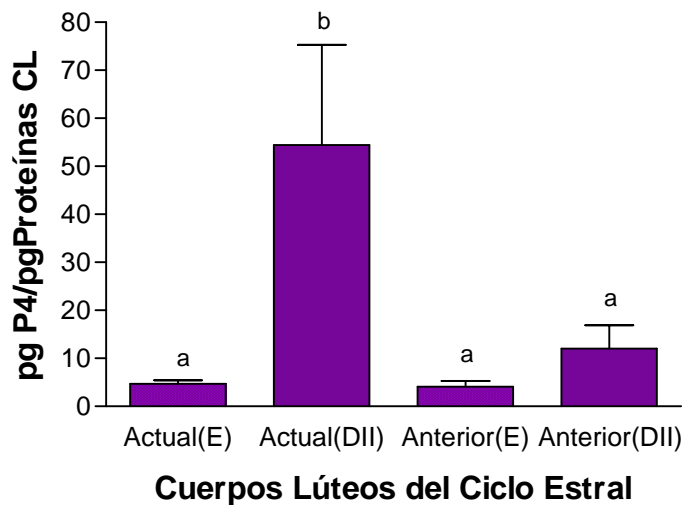


Figura 11. Niveles de progesterona (P_4 ; promedio \pm SEM) de los distintos CLs (población actual y anterior) del ciclo natural de la rata en estro (E) y diestro II (DII). Los valores fueron expresados como pg de P_4 / pg de proteínas del CL. Las distintas letras muestran una diferencia significativa en los niveles de P_4 en los distintos estadios del CL ($p < 0,001$, $n = 3-5$ CLs por grupo).

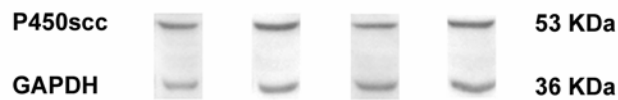
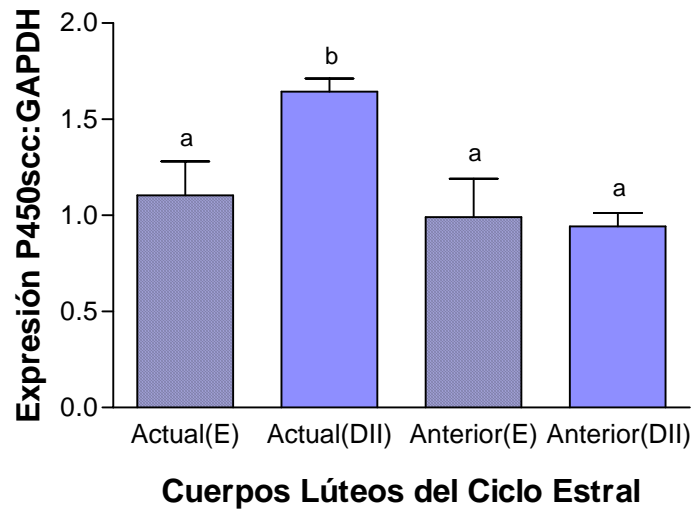


Figura 12. Análisis densitométrico del western blot de la proteína P450scc en los distintos CLs (población actual y anterior) del ciclo natural de la rata en estro (E) y diestro II (DII). Los valores fueron expresados como unidades arbitrarias \pm SEM (n=5-9 CLs/rata; 3-4 ratas/grupo). Las distintas letras muestran una diferencia significativa en la expresión de la proteína P450scc en los distintos estadios del CL ($p < 0,05$). En la parte inferior de la figura se puede observar una membrana ilustrativa con las bandas correspondientes a la P450scc (53KDa) y el control interno GAPDH (36 KDa).

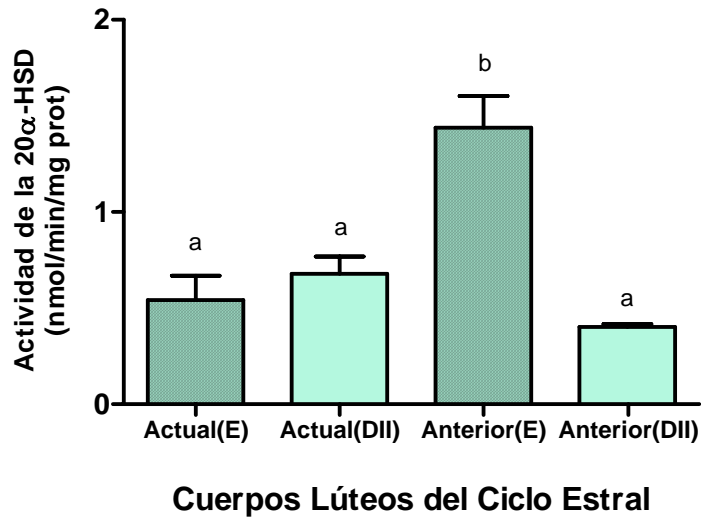
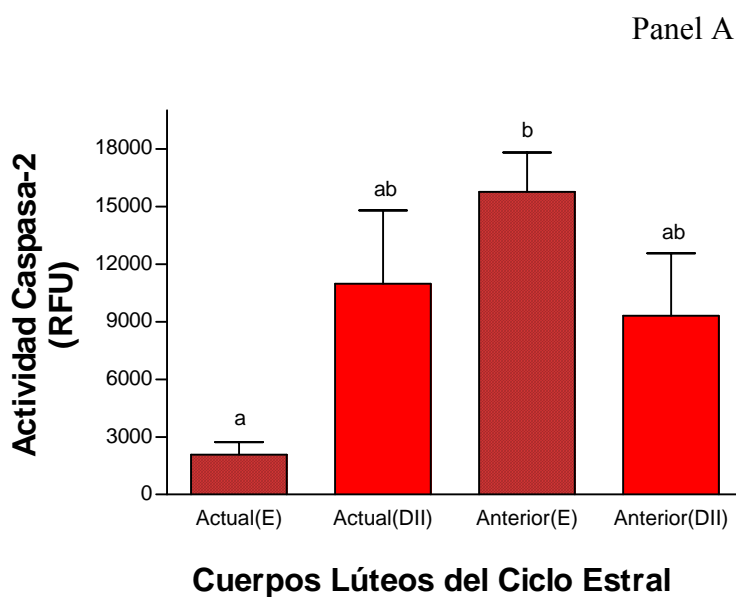


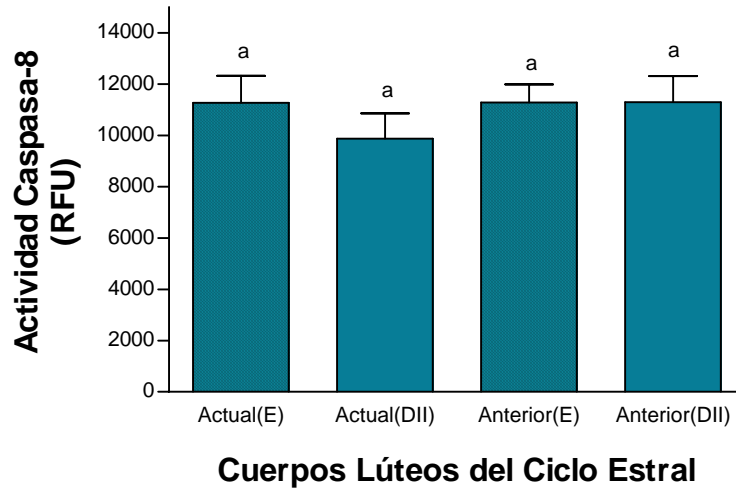
Figura 13. Actividad de la 20α-HSD (promedio ± SEM) en los distintos CLs (población actual y anterior) del ciclo natural de la rata en estro (E) y diestro II (DII). Los valores fueron expresados como nmol/min/mg proteínas del CL. Las distintas letras muestran una diferencia significativa en la actividad de la 20α-HSD en los distintos estadios del CL ($p < 0,001$, $n = 3-5$ CLs por grupo).

Cuantificación de la actividad de las caspasas-2, -8, -9 y -3 en los distintos estadios del CL en el ciclo estral de la rata por un método enzimático

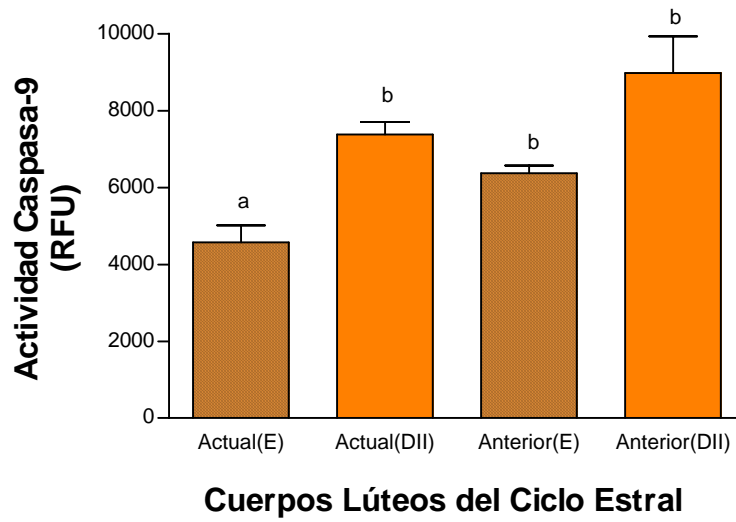
La mayor actividad de la caspasa-2 fue observada en el CL del ciclo anterior en E, mientras que el CL del ciclo actual en E presentó los niveles más bajos (ver panel A, figura 14). En cambio, no se observaron diferencias significativas para la actividad de la caspasa-8 ($p > 0,05$, ver panel B, figura 14). Con respecto a la caspasa-9 se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el CL del ciclo actual en E y el resto de los CL estudiados (ver panel C, figura 14). El patrón de la caspasa efectora -3 fue similar al de la iniciadora -2, observándose un aumento significativo ($p < 0,05$) en el CL del ciclo anterior con respecto al del ciclo actual en E (ver panel D, figura 14).



Panel B



Panel C



Panel D

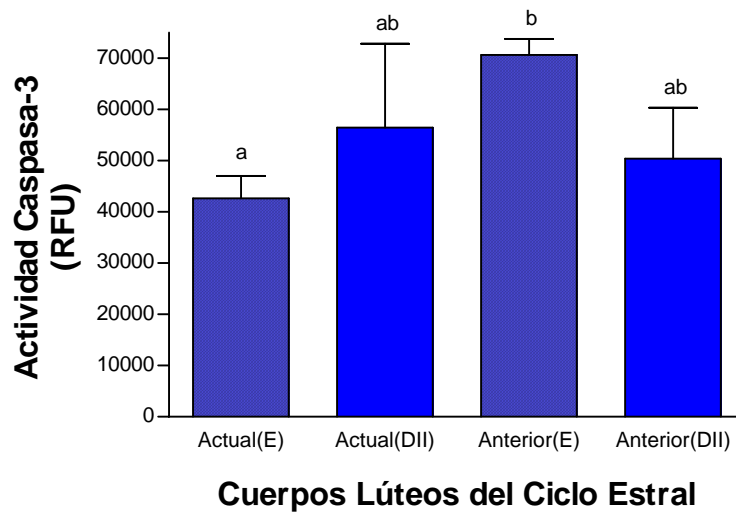


Figura 14. Actividad enzimáticas (promedio \pm SEM) de las caspasas iniciadoras -2 (Panel A), -8 (Panel B) y -9 (Panel C), y la efectora caspasa-3 (Panel D) en los distintos CLs (población actual y anterior) del ciclo natural de la rata en estro (E) y diestro II (DII). La actividad fue expresada como unidades relativas de fluorescencia (RFU). Las diferentes letras muestran una diferencia significativa en la actividad de estas caspasas en los distintos estadios del CL ($p < 0,05$, $n = 3-4$).

Cuantificación de los niveles proteicos de la caspasa-3 y su clivaje en los distintos estadios del CL en el ciclo estral de la rata

En el western blot para la caspasa-3 se pueden observar 2 bandas: una de 36 KDa correspondiente a la procaspasa y otra de 17 KDa correspondiente al fragmento activo clivado (p17) (parte inferior de la figura 15). También en dicha figura se puede observar la banda de 42 KDa correspondiente a β -actina (Control interno). Los resultados normalizados mostraron una diferencia significativa ($p < 0,05$) en los niveles de la procaspasa entre el CL del ciclo anterior en E y el CL del ciclo actual en DII, con respecto al CL del ciclo actual del E y el CL del ciclo anterior en DII (ver gráfico figura 15). Los niveles relativos del fragmento p17 con respecto a la procaspasa, mostraron una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el CL del ciclo actual en DII con respecto a los otros grupos (ver gráfico figura 15).

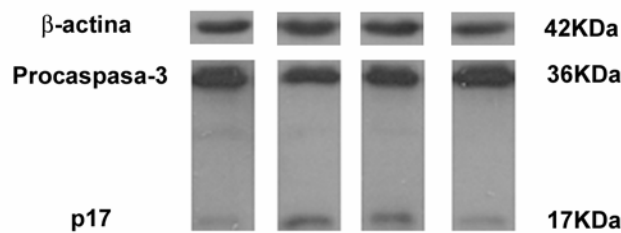
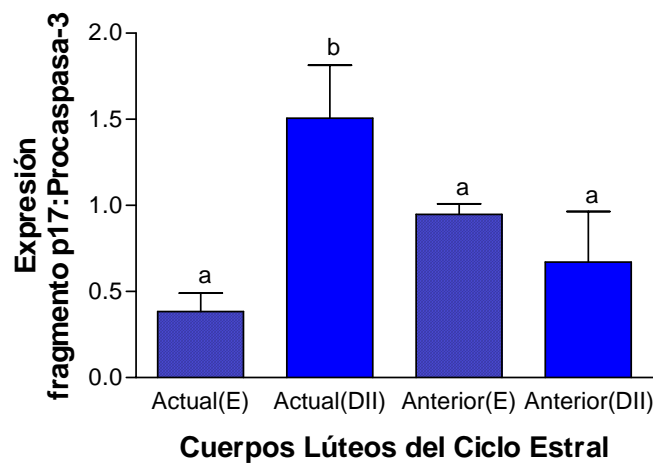
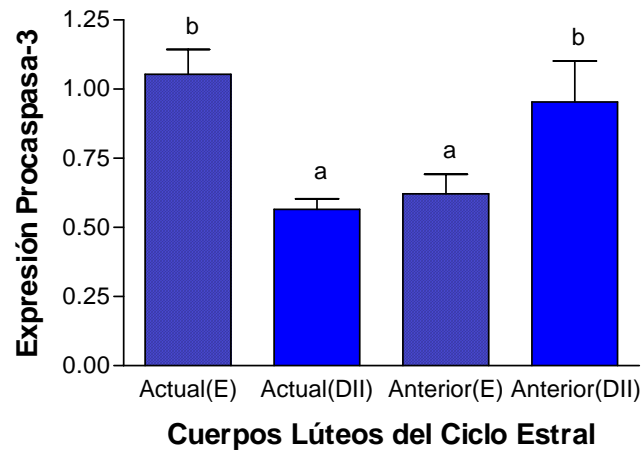


Figura 15. Análisis densitométrico del clivaje de la caspasa-3 mediante western blot en los distintos CLs (población actual y anterior) del ciclo natural de la rata en estro (E) y diestro II (DII). Los valores fueron expresados como unidades arbitrarias \pm SEM (n=5-9 CLs/rata; 3-4 ratas/grupo)). Las distintas letras muestran una diferencia significativa ($p < 0,05$). En la parte inferior de la figura se puede observar una membrana ilustrativa con las bandas correspondientes a la procaspasa-3 (36 KDa), al fragmento activo p17 (17 KDa) y al control interno β -actina (42 KDa).

Expresión proteica y localización de las caspasas-2, -8, -9 y -3 en los distintos estadios del CL en el ciclo estral de la rata

A partir de los cortes de ovarios en E y DII se evaluó por inmunohistoquímica la tinción positiva para las caspasas-2, -8, -9 y -3. En la figura 16 se puede observar la expresión de las 4 caspasas en el CL a lo largo del ciclo estral. La marca específica para la caspasa-2 fue detectada en el citoplasma y núcleo de las células luteales grandes y pequeñas (LL y SL), así como también en las endoteliales (END). En los CLs del ciclo anterior la marca presente es mucho más intensa, tanto en E como en DII. Mientras que, la expresión de las caspasas-8 y -9 muestra pequeños cambios a lo largo del ciclo estral en las células LL y no se observa marca positiva en las células luteales pequeñas ni en las endoteliales. Al igual que la caspasa-2, la principal caspasa efectora (-3) se expresa en las células luteales (LL y SL) y en las endoteliales. Observándose una mayor intensidad en éstas últimas y en las luteales pequeñas. La marca se encontró en el núcleo además de en el citoplasma. Cabe destacar que la traslocación al núcleo es necesaria para que esta caspasa efectora pueda clivar a las proteínas y enzimas nucleares blanco. La marca más abundante fue observada en el CL del ciclo actual en DII.

No se detectó marca positiva en ninguno de los controles negativos ni en el estroma (S).

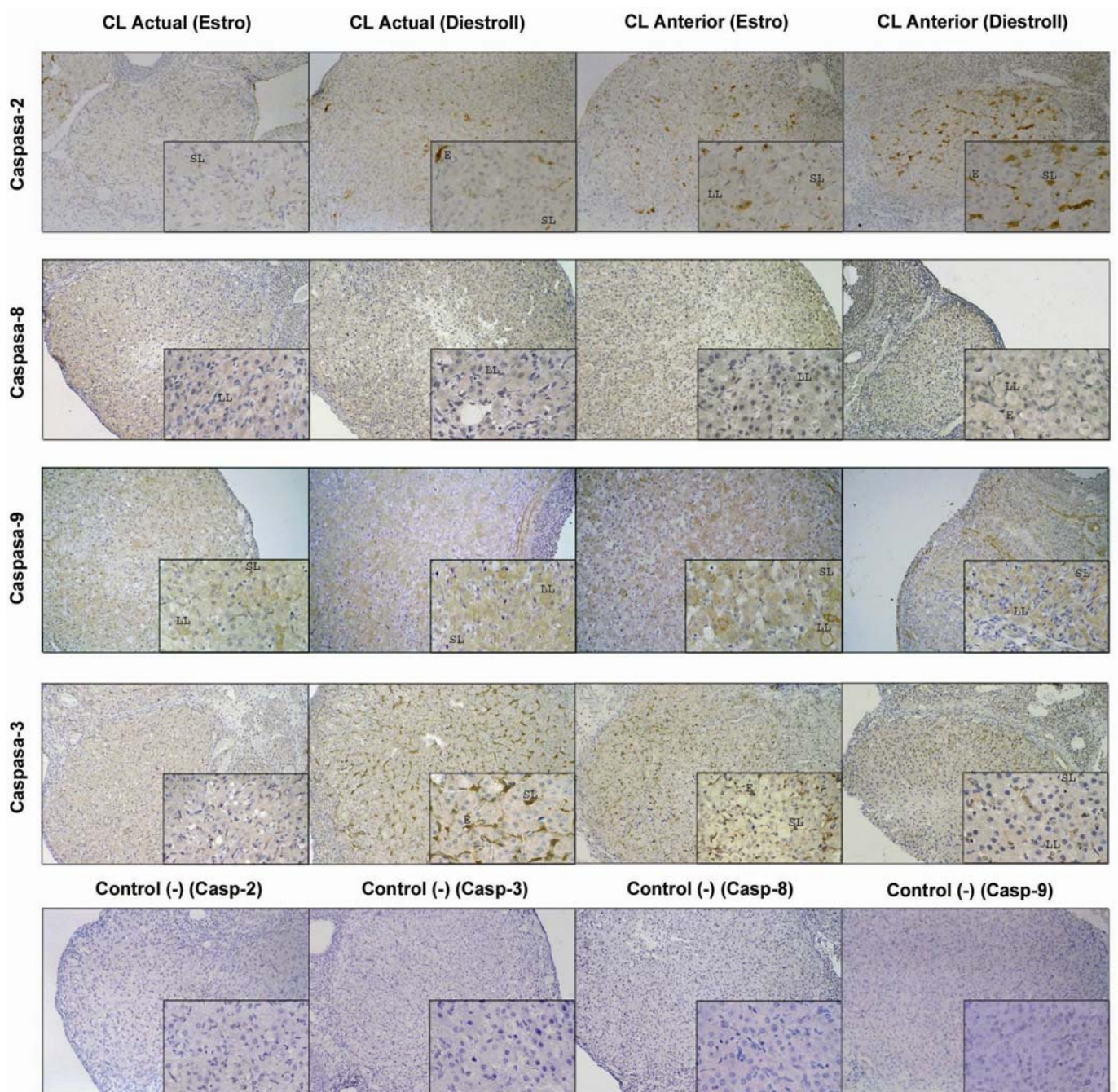


Figura 16. Microfotografía de secciones de CLs (población actual y anterior) del ciclo natural de la rata en estro (E) y diestro II (DII) [Paneles de izquierda a derecha: Actual (E), Actual (DII), Anterior (E), Anterior (DII)], sometidos a una inmunohistoquímica (IHC) para las caspasas-2 (Panel A), -8 (Panel B), -9 (Panel C) y -3 (Panel D). Las células positivas se identificaron por la presencia de reactividad marrón. La marca se observó en el citoplasma y/o en el núcleo de las células luteales grandes (LL), luteales pequeñas (SL) y en las células endoteliales (END), dependiendo de cada una de las caspasas. No se encontró marca en el estroma ni en el control negativo (incubado sin primer anticuerpo, Panel E) en ninguno de los casos.

Evaluación y cuantificación de la apoptosis en los distintos estadios del CL en el ciclo estral de la rata mediante las técnicas de H&E y TUNEL

H&E

Se realizó la evaluación de la apoptosis en los cortes histológicos del ciclo estral teñidos con hematoxilina y eosina (ver figura 17). Como se detalló en los materiales y métodos para la evaluación de la apoptosis sólo se tuvieron en cuenta aquellas células con avanzados signos apoptóticos (como ser múltiples fragmentos nucleares o pequeños núcleos marcados intensamente señalados con flecha). En el análisis histológico se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) en el porcentaje de células apoptóticas en el CL del ciclo anterior en DII (ver panel B, figura 17) con respecto a los demás estadios del CL del ciclo estral.

TUNEL

La fragmentación nuclear, al igual que en los cortes de mono, fue evaluada mediante la técnica de TUNEL. La marca positiva (flecha) fue observada en los distintos estadios del CL e incrementó a medida que la fase lútea transcurre (ver panel A, figura 18). El control negativo sin la enzima TdT no presentó marca. El panel B de la figura 18 muestra el gráfico correspondiente al recuento de las marcas positivas (expresadas como porcentaje de células apoptóticas) en los distintos estadios del CL. Se puede observar el aumento significativo ($p < 0,05$) en los CLs del ciclo anterior tanto en E como en DII, siendo mayor aún en el CL del ciclo anterior en DII.

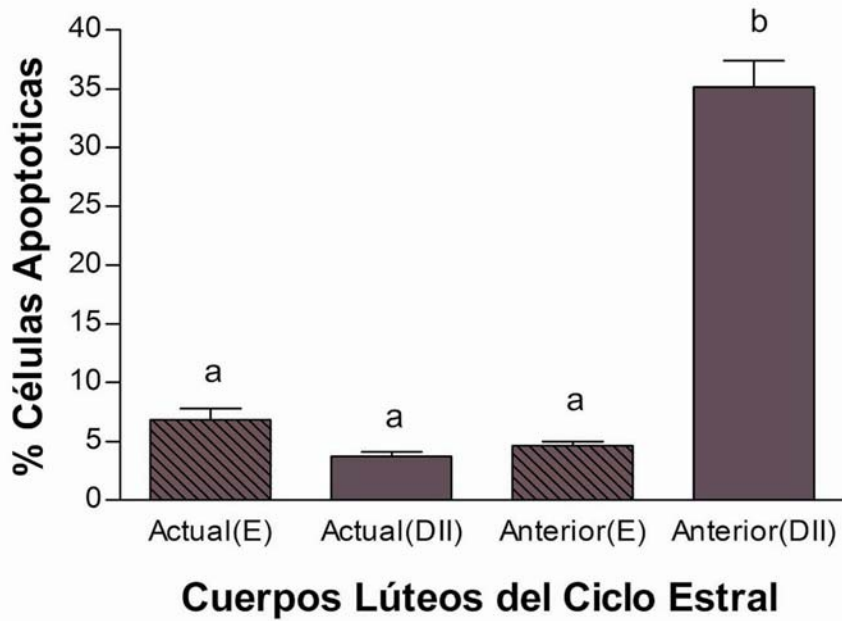
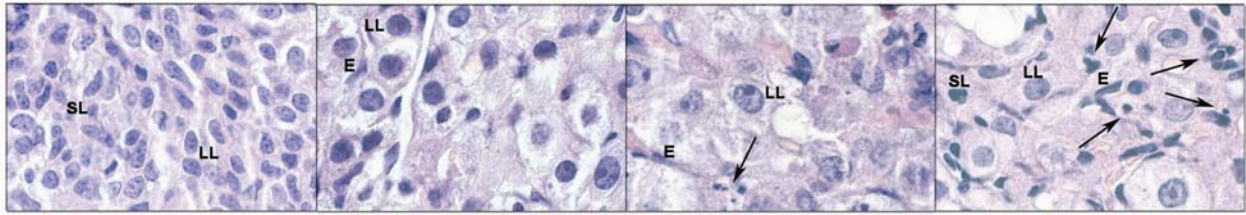


Figura 17. Análisis in situ de la fragmentación de ADN en cortes de ovarios de ratas en el ciclo estral teñidos con H&E. Secciones de CLs (población actual y anterior) del ciclo natural de la rata en estro (E) y diestro II (DII) [Panel A de izquierda a derecha: Actual (E), Actual (DII), Anterior (E), Anterior (DII)]. Las flechas indican las células apoptóticas. El conteo se realizó utilizando el objetivo de 100X del microscopio. Se seleccionaron al azar 3 campos por CL (3 CLs del ciclo actual y 3 del ciclo anterior/ovario, 6-7 ovarios por estadio). Los resultados fueron expresados como el porcentaje de células apoptóticas (promedio \pm SEM; Panel B). Las diferentes letras muestran una diferencia significativa en el porcentaje de células apoptóticas en los distintos estadios del CL ($p < 0,05$).

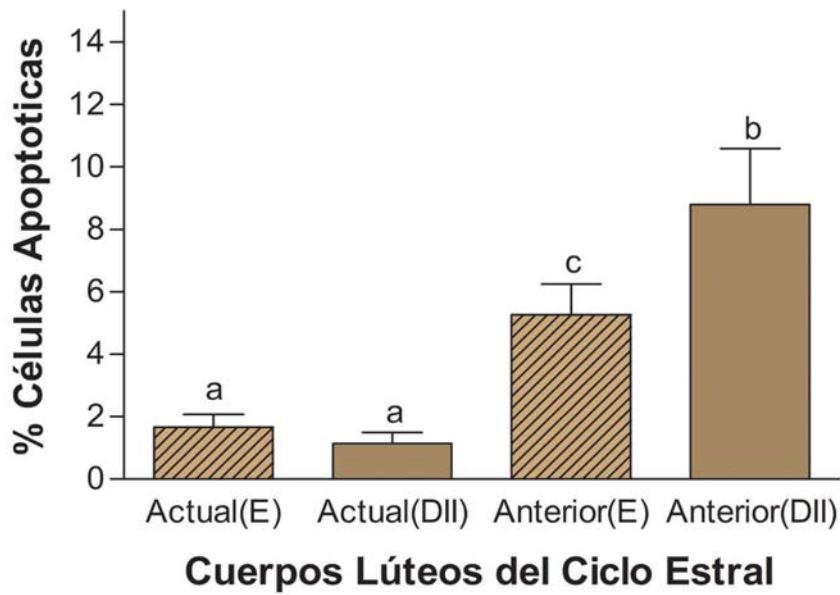
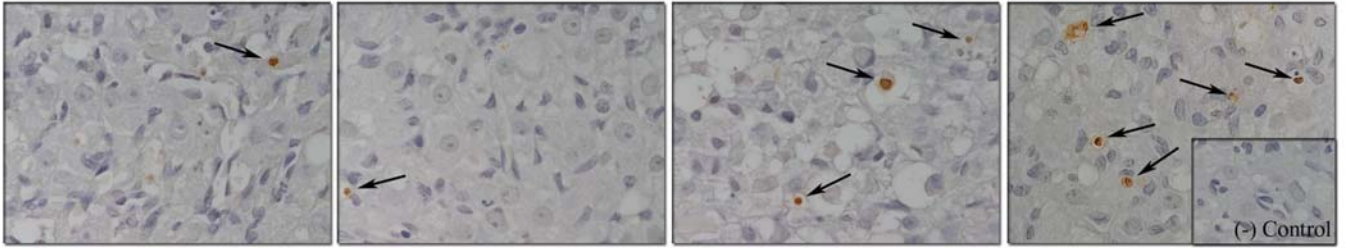


Figura 18. Análisis in situ de la fragmentación de ADN (TUNEL) en secciones de CLs (población actual y anterior) del ciclo natural de la rata en estro (E) y diestro II (DII) [Panel A de izquierda a derecha: Actual (E), Actual (DII), Anterior (E), Anterior (DII)]. La marca positiva (flecha) se identificó por la presencia de reactividad marrón. No se observó marca positiva en el estroma ni en el control negativo incubado sin la enzima. El conteo se realizó utilizando el objetivo de 100X del microscopio. En el caso del ciclo estral se seleccionaron al azar 3 campos por CL (3 CLs del ciclo actual y 3 del ciclo anterior/ovario, 6-7 ovarios por estadio). Los resultados fueron expresados como el porcentaje de células apoptóticas (promedio \pm SEM; Panel B). Las diferentes letras muestran una diferencia significativa en el porcentaje de células apoptóticas en los distintos estadios del CL ($p < 0,05$).

Discusión (Capítulo II, Parte A)

El ciclo estral de la rata dura normalmente unos 4 o 5 días y si la fertilización no ocurre, un nuevo ciclo se inicia y el CL regresiona. Sin embargo, la regresión del CL en ratas y ratones ocurre en varios ciclos, debido a que la luteólisis estructural demora más de uno (23). De manera que en el ovario adulto de una rata o ratón se encuentran varias generaciones de CLs. Por lo tanto, el estudio del CL en el ciclo natural es complicado y el aislamiento del mismo es complejo debido a la coexistencia de distintos CLs (pertenecientes al ciclo actual y al ciclo anterior). Pero como se detalló en la sección de materiales y métodos, para el estudio del CL de la

rata en estro y diestro II del ciclo estral, los diferentes CLs (actual, anterior) fueron identificados y recolectados de acuerdo a criterios de tamaño e irrigación.

En roedores al igual que en otras especies, la apoptosis ha sido relacionada con la regresión luteal (28; 37; 71; 214; 222; 246; 259; 266; 307; 375; 574; 633; 681; 694; 761). Sin embargo, no se ha establecido un rol causal y además no hay trabajos sobre apoptosis realizados en el CL del ciclo estral de la rata. En los últimos años, han aumentado las evidencias que sugieren el papel de las caspasas en la regresión del CL (90; 546; 549; 760). Aunque, como se mencionó en la introducción, son escasos los trabajos publicados en este tema. Rueda y colaboradores observaron que el aumento en los niveles del mRNA de caspasa-1 en CLs de bovinos se correlacionaba con el comienzo de la luteólisis (548). Utilizando un modelo de ratones knock-out, se observó que la actividad de la caspasa-3 era requerida en la regresión morfológica del CL en caso de no producirse la fertilización (89). Teniendo en cuenta estos antecedentes y nuestros resultados obtenidos en primates, decidimos evaluar los cambios de expresión y/o actividad de algunos miembros de la familia de caspasas (-2, -3, -8 y -9) durante la formación y regresión del CL en el ciclo estral de la rata. Asimismo, evaluamos diversos parámetros estructurales y funcionales del CL (peso, niveles de progesterona, niveles de P450scc y actividad de la 20 α -HSD), así como también la apoptosis en el CL (población actual y anterior) del ciclo natural de la rata en estro (E) y diestroII (DII).

Las caspasas-2 y -3 presentaron un pico en su actividad en el CL del ciclo anterior en E. Estos resultados se correlacionan con la luteólisis funcional observada de acuerdo a los índices de la función luteal evaluados en el CL de la rata (bajada en los niveles de progesterona y P450scc, así como también un aumento en la actividad de la 20 α -HSD). Los niveles de progesterona luteal fueron evaluados durante el ciclo estral y los valores máximos fueron alcanzados en el CL del ciclo actual en DII. Dichos resultados están de acuerdo con los valores séricos reportados por Smith y colaboradores (602). Además, la expresión de la P450scc también aumentó significativamente en el mismo estadio del CL, momento en el cual es funcional. Cabe resaltar que, los niveles de progesterona secretados por el CL en roedores no sólo dependen de las cantidades sintetizadas de esta hormona sino también de los niveles de expresión y actividad de la enzima 20 α -HSD, la cual convierte a la progesterona en 20 α -OH-P₄ (metabolito inactivo). De manera que, la 20 α -HSD se encuentra aumentada en el CL que va hacia la luteólisis (336). En nuestros

experimentos, observamos un aumento significativo en la actividad de esta enzima en el CL del ciclo anterior en E, junto con la caída en los niveles de progesterona. Por otro lado, la actividad enzimática de la caspasa-9 presentó un patrón similar a las caspasas-2 y -3. Pero a diferencia de éstas, su actividad aumentó significativamente en un estadio previo (en el CL del ciclo actual en DII) y permaneció elevada en el CL del ciclo anterior en DII. Teniendo en cuenta que esta caspasa está involucrada en el camino mitocondrial de la apoptosis, estos resultados sugerirían un papel importante de la caspasa-9 y del camino mitocondrial en la muerte celular del CL en el ciclo estral. A diferencia de las otras caspasas evaluadas, la caspasa-8 no presentó diferencias significativas entre los distintos estadios del CL estudiados. Estos resultados sumados a los obtenidos en la IHC para esta caspasa (con baja expresión y sin variabilidad en los distintos estadios), se desprende que la caspasa-8 no jugaría un papel importante en la regresión del CL en el ciclo estral de la rata. No obstante, debido a que su expresión y actividad fueron detectadas en el CL de todos los grupos evaluados no se puede descartar una posible acción. Cabe recordar que, las caspasas pueden poseer funciones alternativas distintas de la muerte celular, como ser regulando la proliferación, diferenciación o producción de citoquinas (22; 354).

En cuanto a las discrepancias entre los resultados obtenidos del western blot y el ensayo de actividad enzimática para la caspasa-3, pueden deberse a que la caspasa clivada no es necesariamente activa. El aumento significativo en los niveles del fragmento p17 con respecto a la procaspasa-3 se observó en el CL del ciclo actual en DII en lugar de en el CL del ciclo anterior en E, como se observó para la actividad enzimática. Luego del clivaje, la subunidad grande y la pequeña deben formar un heterodímero. Pero para que esta proteasa se active se debe formar después un tetrámero entre dos heterodímeros, y sólo así la caspasa es activa. Además, el procesamiento y la activación se encuentran reguladas por diferentes factores, como ser inhibidores de la apoptosis (76; 135) y proteínas Hsp (Heat shock proteins) (45).

De acuerdo a los resultados obtenidos en la IHC, se pudo observar que las distintas caspasas estudiadas mostraron un patrón de expresión diferente en el CL del ciclo estral. Las caspasas iniciadoras -8 y -9 presentaron una baja expresión en el citoplasma de las células luteales grandes con leves cambios en los distintos estadios. Mientras que, no se observó expresión de estas dos proteasas en las células luteales pequeñas, ni en las células endoteliales. En cuanto a la caspasa iniciadora -2, se observó un aumento en su expresión a medida que la fase lútea progresaba. La marca

positiva fue detectada tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células luteales (grandes y pequeñas) y en las células endoteliales. Sin embargo, se detectó una mayor intensidad de marca en las células endoteliales y en las luteales pequeñas. Estos tipos celulares pueden poseer distintos mecanismos de regulación de muerte celular respecto a las células luteales grandes y la elevada expresión de la caspasa-2 en las células endoteliales, sugiere un papel importante de esta caspasa en dichas células. Asimismo, se ha demostrado la presencia de apoptosis en las células endoteliales y ha sido relacionada con el camino de TNF- α (200; 506). Por otro lado, se sabe que durante la luteólisis los macrófagos son atraídos e infiltrados en el CL, incrementando la producción local de citoquinas, como ser el TNF- α (74). De manera que, el incremento local de citoquinas puede desencadenar la activación del camino de los receptores de muerte y la caspasa-2 en las células endoteliales del CL. No obstante, sería necesario e interesante realizar experimentos que puedan demostrar esta teoría. Por otro lado, a pesar de que la caspasa-2 fue una de las primeras caspasas identificadas en mamíferos (330; 739), poco se conoce acerca de esta proteasa. Algunos autores la relacionan con el camino de los receptores de muerte (13; 147), mientras que otros con el camino mitocondrial (261; 527). Asimismo, parecería que la caspasa-2 podría actuar tanto de manera positiva como negativa en el desencadenamiento de la apoptosis dependiendo del estadio del desarrollo y tipo celular. Esto se infiere de los resultados obtenidos por Bergeron y colaboradores utilizando un modelo de ratón knock-out para la caspasa-2, donde se observó un exceso en el número de las células germinales en los ovarios de estos ratones y a su vez un aumento en la muerte celular de las neuronas motoras (50). Respecto a la caspasa-3, la marca positiva se observó también en el núcleo y en el citoplasma de las células luteales y endoteliales. Asimismo, una mayor intensidad de marca fue observada en las células endoteliales y luteales pequeñas. Es interesante remarcar, que la marca para la caspasa-3 en el núcleo apareció en el CL del ciclo actual en DII (previo al aumento significativo en su actividad) y permaneció en el CL del ciclo anterior en E y DII. Como ya se mencionó, la forma inactiva de las caspasas (en especial las caspasas efectoras) se encuentra localizada en distintos compartimentos subcelulares que luego de su activación, es traslocada a su sitio de acción (498; 669; 713; 795). Por lo tanto, la detección de marca en núcleo podría estar reflejando la activación de la caspasa-3 y su traslocación al sitio de acción. Las discrepancias en cuanto a localización celular en los resultados obtenidos para las distintas caspasas

puede ser debido a la imposibilidad de algún/os anticuerpo/s de detectar los fragmentos clivados, como se propuso en el capítulo I.

El análisis de la fragmentación del ADN en el CL durante el ciclo estral de la rata por TUNEL reveló un aumento significativo en el número de células apoptóticas en el CL del ciclo anterior en E y DII. El aumento en el número de células apoptóticas se observa a medida que la luteólisis progresa y dicho aumento ocurre luego del incremento significativo en la actividad de las caspasas -2, -3 y -9. Por otro lado, la disminución en el peso del CL coincide con la luteólisis estructural y con el aumento en la fragmentación del ADN de las células luteales. No obstante, todos los estadios del CL evaluados presentaron algunas células apoptóticas así como también, actividad de las cuatro caspasas (-2, -3, -8 y -9). La detección de células apoptóticas en el CL funcional ha sido reportada también por otros autores (137; 588), e incluso nosotros lo hemos descrito en el CL del mono rhesus a lo largo de la fase lútea. Los resultados obtenidos por H&E fueron similares a los obtenidos por la técnica de TUNEL, siendo el porcentaje de células apoptóticas mayor en el CL del ciclo anterior en DII con respecto a los demás estadios evaluados. Sin embargo, con esta técnica obtuvimos un mayor número de células apoptóticas en todos los cortes. Probablemente, esto se deba a que aunque para la evaluación de la apoptosis sólo se tuvieron en cuenta aquellas células con avanzados signos apoptóticos, dicho análisis histológico posee un mayor margen de error que el TUNEL. Asimismo, esta última técnica es más específica.

En conclusión, hemos observado una expresión y/o actividad dinámica en las caspasas iniciadoras (-2, -8 y -9) y la principal efectora (-3) durante la formación y regresión del CL del ciclo estral en la rata. La actividad de las caspasas-2, -3 y -9 aumenta en el CL del ciclo anterior en E durante la luteólisis funcional. Posteriormente, en el CL del ciclo anterior en DII, el número de células apoptóticas aumenta y el peso disminuye. Estos resultados indicarían que las caspasas iniciadoras (-2 y -9) y la efectora (-3) jugarían un papel importante en la etapa temprana de la regresión del CL del ciclo estral en la rata. Mientras que, no se observaron cambios en la actividad de la caspasa-8.

Resultados (Capítulo II, Parte B)

B- Expresión y actividad de las caspasas-2, -8, -9 y -3, y su correlación con los niveles de apoptosis en el CL de la rata en la preñez y post-parto

Indices estructurales y funcionales del CL (niveles de P₄, P450scc, actividad de la 20 α -HSD)

Los niveles de progesterona fueron medidos en los distintos tiempos de gestación (días 7, 17, 19 y 21) y post-parto (días 1 y 4 PP), ver figura 19. Pudiéndose observar la caída de los niveles de progesterona en el día 21 de gestación (Día 7: 157,8 \pm 10,7 Vs. Día 21: 49,1 \pm 6,7; pg P₄/ μ g proteína, p<0,01), según lo esperado.

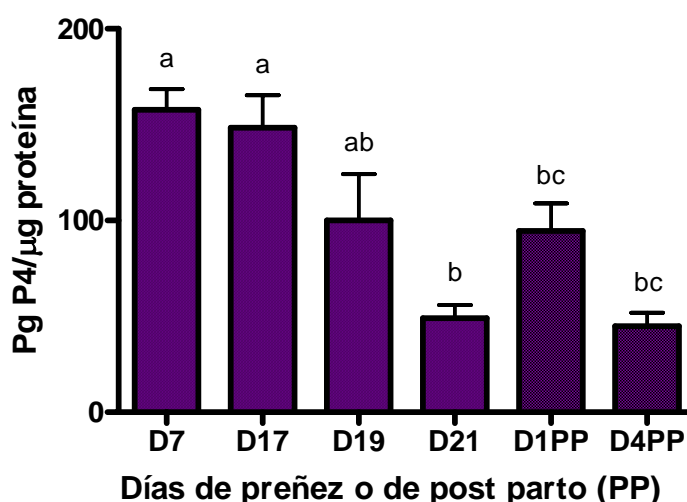


Figura 19. Niveles de progesterona (P₄; promedio \pm SEM) de los distintos CLs de ratas preñadas a distintos tiempos de gestación (días 7, 17, 19 y 21) y distintos tiempos post-parto (días 1 y 4 PP). Los valores fueron expresados como pg de P₄/ μ g de proteínas del CL. Las distintas letras muestran una diferencia significativa en los niveles de P₄ en los distintos tiempos de gestación y post-parto (p<0,05; n=3-5 CLs por grupo).

Otro parámetro estudiado a lo largo de la preñez y post-parto fue la expresión de la proteína P450scc mediante western blot (figura 20). Obteniéndose la máxima expresión de dicha proteína en el día 7 de gestación (Día 7: $3,1 \pm 0,5$ vs. Día 21: $1,1 \pm 0,1$; $p < 0,01$). En la parte inferior de la figura 20 se puede observar una membrana representativa con la presencia de una banda de 53 KDa correspondiente a la P450scc y otra de 42 KDa correspondiente al control interno β -actina.

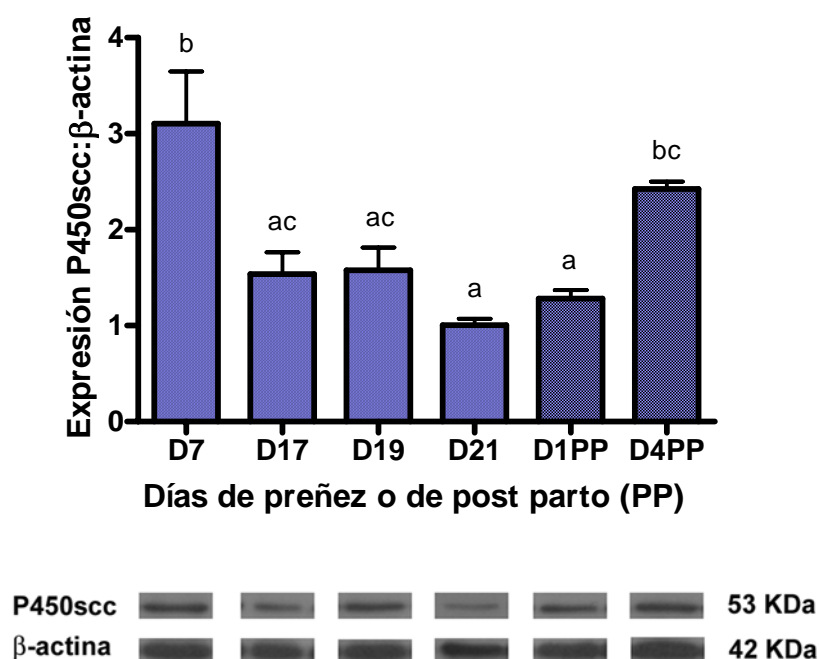


Figura 20. Análisis densitométrico del western blot de la proteína P450scc en los distintos CLs de ratas preñadas a distintos tiempos de gestación (días 7, 17, 19 y 21) y distintos tiempos post-parto (días 1 y 4 PP). Los valores fueron expresados como unidades arbitrarias \pm SEM ($n=5-9$ CLs/rata; 3-4 ratas/grupo). Las distintas letras muestran una diferencia significativa en la expresión de la proteína P450scc en los distintos tiempos de gestación y post-parto ($p < 0,05$). En la parte inferior de la figura se puede observar una membrana ilustrativa con las bandas correspondientes a la P450scc (53 KDa) y el control interno β -actina (42 KDa).

En cuanto a la actividad de la 20α -HSD (ver figura 21), se observaron niveles muy bajos durante la preñez seguidos de un aumento significativo ($p < 0,01$) en el día 1 PP.

Dicho aumento disminuyó un poco en el día 4 PP pero manteniéndose elevado con respecto a la preñez.

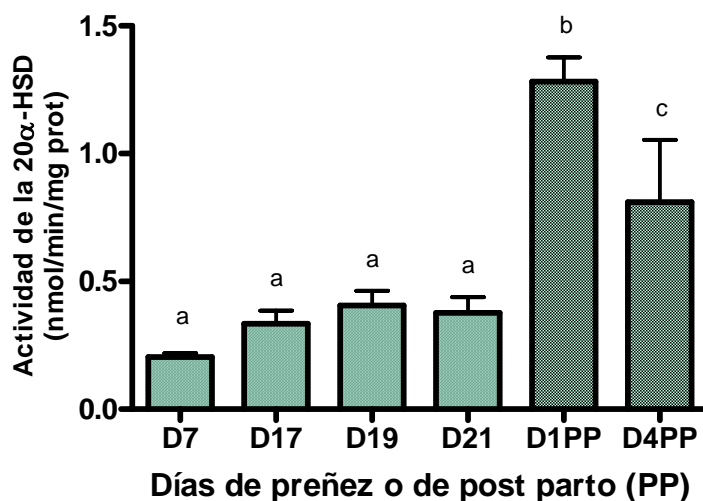
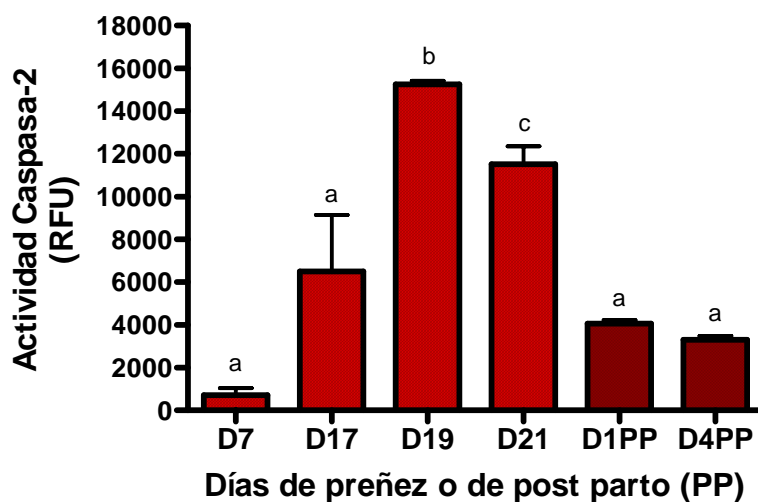


Figura 21. Actividad de la 20α-HSD (promedio ± SEM) de los distintos CLs de ratas preñadas a distintos tiempos de gestación (días 7, 17, 19 y 21) y distintos tiempos post-parto (días 1 y 4 PP). Los valores fueron expresados como nmol/min/mg proteínas del CL. Las distintas letras muestran una diferencia significativa en la actividad de la 20α-HSD en los distintos tiempos de gestación y post-parto ($p < 0,01$; $n = 3-5$ CLs por grupo).

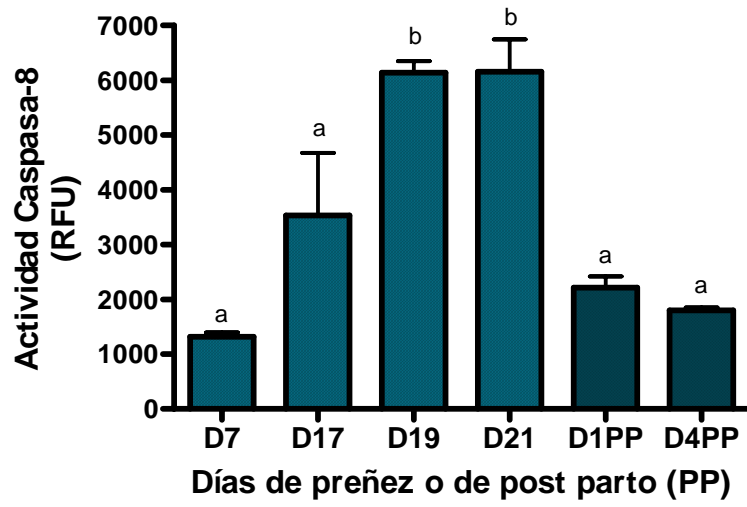
Cuantificación de la actividad de las caspasas-2, -8, -9 y -3 en el CL de ratas preñadas a distintos tiempos de gestación (días 7, 17, 19 y 21) y distintos tiempos post-parto (días 1 y 4 PP) por un método enzimático

Luego de evaluar índices estructurales y funcionales del CL, procedimos a evaluar la actividad de nuestras proteínas de interés, las caspasas. Los ensayos de actividad enzimática tanto para las caspasas iniciadoras (-2, -8 y -9) como la principal efectora (-3) mostraron un patrón similar durante la preñez y el post-parto. Detectándose las mayores unidades relativas de fluorescencia (RFU) en los días 19 y 21 de gestación ($p < 0,05$; ver figura 22).

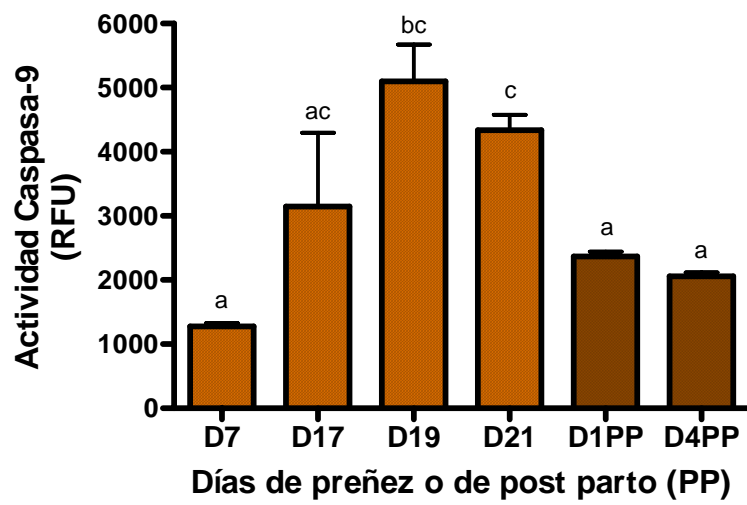
Panel A



Panel B



Panel C



Panel D

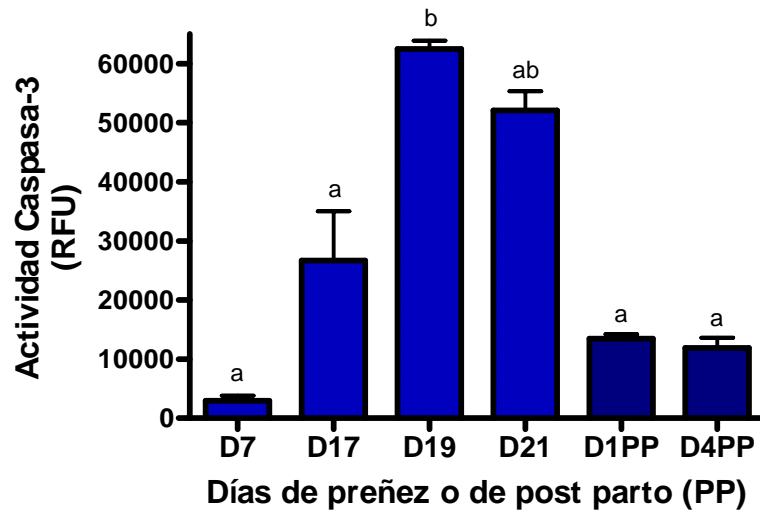


Figura 22. Actividad enzimáticas (promedio \pm SEM) de las caspasas iniciadoras -2 (Panel A), -8 (Panel B) y -9 (Panel C), y la efectora caspasa-3 (Panel D) en el CL de ratas preñadas a distintos tiempos de gestación (días 7, 17, 19 y 21) y distintos tiempos post-parto (días 1 y 4 PP). La actividad fue expresada como unidades relativas de fluorescencia (RFU). Las diferentes letras muestran una diferencia significativa en la actividad de estas caspasas en los distintos tiempos de gestación y post-parto ($p < 0,05$, $n = 3-4$).

Cuantificación de los niveles proteicos de la caspasa-3 y su clivaje en el CL de ratas preñadas a distintos tiempos de gestación (días 7, 17, 19 y 21) y distintos tiempos post-parto (días 1 y 4 PP)

El procesamiento de la caspasa-3 se puede observar mediante un western blot. En la parte inferior de la figura 23, se muestra una membrana ilustrativa donde se pueden visualizar diferentes bandas. La banda de 42 KDa correspondiente a β -actina (Control interno). Además, se observan las siguientes bandas: la que le sigue en PM de 36 KDa correspondiente a la procaspasa, varias bandas correspondientes a fragmentos inactivos del procesamiento proteolítico, una banda de 20 KDa correspondiente a un fragmento inactivo (p20) y otra de 17 KDa correspondiente al fragmento activo clivado (p17). Los niveles proteicos de la procaspasa-3 normalizados no mostraron una diferencia significativa ($p>0,05$) a lo largo de la preñez ni luego en el post-parto. Mientras que, se observó un aumento significativo ($p<0,05$) en los niveles del fragmento p17 con respecto a la procaspasa en los días 19 y 21. Los niveles relativizados del fragmento p20 no mostraron una diferencia significativa ($p>0,05$) aunque presentaron un patrón similar al del fragmento p17 (dato no mostrado).

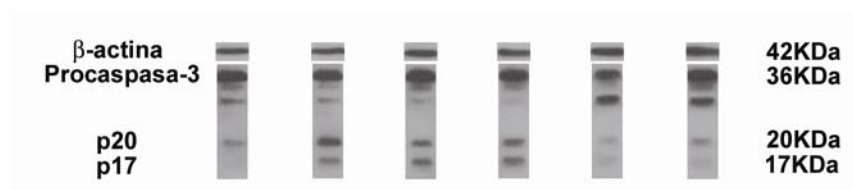
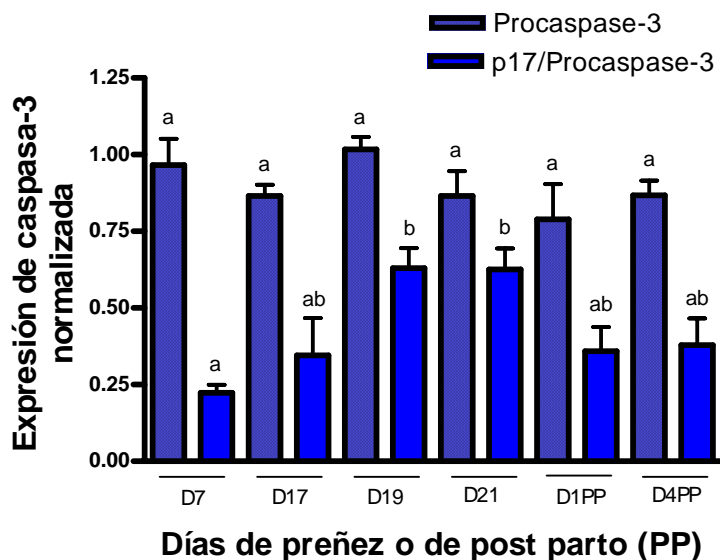


Figura 23. Análisis densitométrico del clivaje de la caspasa-3 mediante western blot en los distintos CLs de ratas preñadas a distintos tiempos de gestación (días 7, 17, 19 y 21) y distintos tiempos post-parto (días 1 y 4 PP). Los valores fueron expresados como unidades arbitrarias \pm SEM ($n=5-9$ CLs/rata; 3-4 ratas/grupo). Las distintas letras muestran una diferencia significativa en los distintos tiempos de gestación y post-parto ($p<0,05$). En la parte inferior de la figura se puede observar una membrana ilustrativa con las bandas correspondientes a la procaspasa-3 (36 KDa), al fragmento p20 (20 KDa), al fragmento activo p17 (17 KDa) y al control interno β -actina (42 KDa).

Expresión proteica y localización de las caspasas-2, -8, -9 y -3 en el CL de ratas preñadas a distintos tiempos de gestación (días 7, 17, 19 y 21) y distintos tiempos post-parto (días 1 y 4 PP)

La expresión de las caspasas-2, -8, -9 y -3 en el CL a distintos tiempos de gestación (días 7, 17, 19 y 21) y distintos tiempos post-parto (días 1 y 4 PP) se evaluó al igual que en el ciclo estral mediante inmunohistoquímica (ver figura 24). Cabe destacar que la marca positiva para cada una de las caspasas presentó un patrón similar en cuanto a sublocalización celular. Habiéndose detectado marca para las caspasas-2 y -3 en el citoplasma y núcleo de las células luteales (LL y SL) y células endoteliales. En el caso de las iniciadoras -8 y -9 la marca se encontró solo en las células luteales. Los controles negativos no presentaron marca, al igual que ninguna de las células estromales, en las diferentes IHC. En el caso de las caspasas iniciadoras, no se observaron cambios notorios en sus expresiones en el transcurso de la gestación. Luego, en el post-parto se observa una disminución en la expresión de las 3 caspasas iniciadoras en el día 1 seguidas de un incremento en el día 4 PP. Con respecto a la caspasa efectora, una mayor intensidad de marca fue observada en las células endoteliales y en las células luteales pequeñas. La marca específica para la caspasa-3 fue más abundante en los días 7, 17 y 19 de gestación, seguidos de una disminución en el día 21. Luego del parto, los niveles de expresión permanecieron bajos (día 1PP) hasta el día 4 PP donde se observó un aumento de expresión.

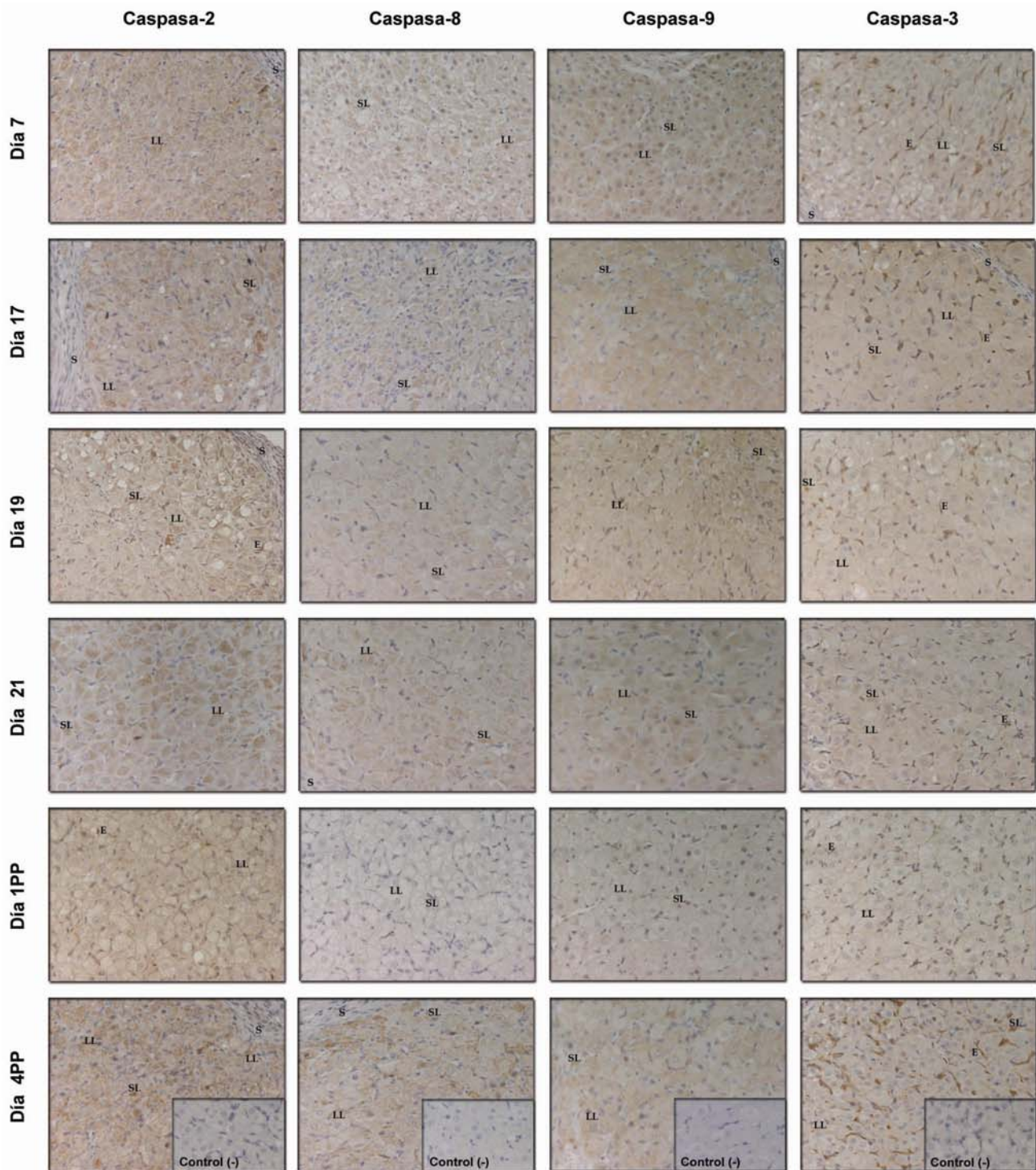


Figura 24. Microfotografía de secciones de CLs de ratas preñadas a distintos tiempos de gestación (días 7, 17, 19 y 21) y distintos tiempos post-parto (días 1 y 4 PP), sometidos a una inmunohistoquímica (IHC) para las caspasas-2, -8, -9 y -3. Las células positivas se identificaron por la presencia de reactividad marrón. La marca se observó en el citoplasma y/o en el núcleo de las células luteales grandes (LL), luteales pequeñas (SL) y en las células endoteliales (E), de cada una de las caspasas. No se encontró marca en el estroma ni en el control negativo (incubado sin primer anticuerpo) en ninguno de los casos.

Evaluación y cuantificación de la apoptosis en el CL de ratas preñadas a distintos tiempos de gestación (días 7, 17, 19 y 21) y distintos tiempos post-parto (días 1 y 4 PP) mediante la técnica de TUNEL

La apoptosis fue evaluada, al igual que en el ciclo estral, mediante la técnica de TUNEL. En la parte superior de la figura 25 se pueden observar distintos cortes histológicos de CLs correspondientes a los distintos tiempos de gestación y de post-parto, sometidos a la técnica de TUNEL. Las marcas positivas se observan de color marrón (flecha). En el transcurso de la gestación se observaron muy pocas células marcadas positivamente (< al 2 %). De la cuantificación de las marcas observadas durante la preñez y el post-parto se observó un aumento en el porcentaje de células apoptóticas luego del parto (ver gráfico figura 25). Siendo un aumento significativo ($p < 0,05$) en el día 4PP con respecto todos los tiempos de gestación evaluados. Mientras que, el aumento observado en el día 1PP fue sólo significativo con respecto al día 7 de preñez ($p < 0,05$).

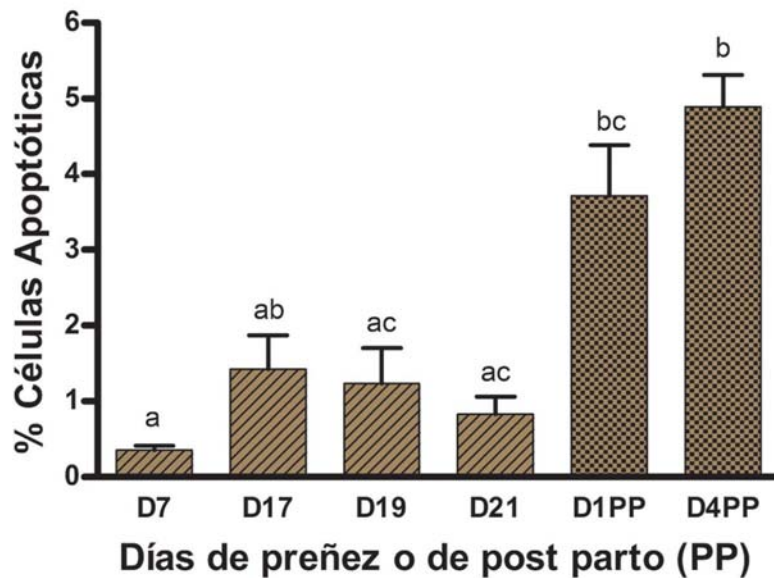
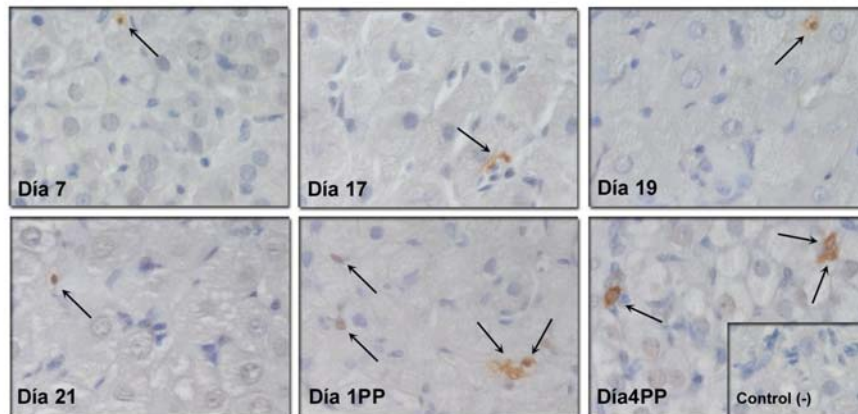


Figura 25. Análisis in situ de la fragmentación de ADN (TUNEL) en secciones de CLs de ratas preñadas a distintos tiempos de gestación (días 7, 17, 19 y 21) y distintos tiempos post-parto (días 1 y 4 PP). La marca positiva (flecha) se identificó por la presencia de reactividad marrón. No se observó marca positiva en el estroma ni en el control negativo incubado sin la enzima. El conteo se realizó utilizando el objetivo de 100X del microscopio. Se seleccionaron al azar 3 campos por CL (3 CLs por sección/ovario, 3-4 ovarios por grupo). Los resultados fueron expresados como el porcentaje de células apoptóticas (promedio \pm SEM; Panel B). Las diferentes letras muestran una diferencia significativa en el porcentaje de células apoptóticas en los distintos estadios del CL ($p < 0,05$).

Discusión (Capítulo II, Parte B)

Luego de estudiar los distintos miembros de la familia de caspasas en el CL del ciclo natural en primates (menstrual) y ratas (estral), se procedió a evaluar los mismos parámetros en el CL de la preñez y del post parto en la rata. Cabe recordar que, en la preñez de la rata el CL debe ser mantenido funcional hasta poco antes del parto. Un estricto control de la secreción y acción de las hormonas ováricas es fundamental durante la preñez. La concentración plasmática de progesterona alcanza un máximo alrededor del día 16 de la gestación y cae precipitadamente durante los últimos días (luego del día 18), antes del parto. Esta caída de los niveles de progesterona es indispensable para que el parto ocurra. De manera esperada, en nuestros animales los niveles de progesterona luteales comenzaron a disminuir en el día 19 de gestación, siendo significativamente menores en el día 21. Mientras que, los niveles máximos de expresión de la P450scc en el CL de rata se observaron en el día 7 de gestación, seguidos de una disminución en los subsecuentes estadios. Sorprendentemente, en el CL proveniente de la preñez (día 4 post parto) se observó un aumento significativo en los niveles de expresión de la P450scc. Aunque en nuestros experimentos, hemos removido las crías luego del parto para prevenir el pico de PRL en las madres provocado por el succionamiento de las crías, no puede descartarse un posible incremento en los niveles de PRL ya que las crías no fueron retiradas hasta que no se produjera el nacimiento de todas ellas. De manera que, quizás alguna cría pudo haber succionado leche. Goyeneche y colaboradores han demostrado que el CL de la preñez es estimulado por la PRL y que la apoptosis de las células luteales es retrasada en los animales que permanecen con la cría debido a los altos niveles de PRL provocados por el succionamiento (255). Por lo tanto, el posible incremento en los niveles de PRL podría explicar el aumento de expresión de la P450scc ya que se ha publicado que la PRL estimula la expresión de P450scc (276; 289). El mantenimiento del CL de la preñez en la rata involucra la interacción entre varios factores tróficos. Entre los más importantes se encuentra la PRL (o las proteínas PRL-like). Sin embargo, cabe resaltar que los niveles de progesterona luteales no aumentaron significativamente luego del parto. Por otro lado, hemos observado un número pequeño de células (menos del 10 %) muriendo por apoptosis en el CL de la preñez luego del parto. No obstante, el resto de las células son aún viables y quizás probablemente aún sean funcionales. Se ha demostrado además, que en el CL del ciclo estral en la rata la regresión del mismo demora más de un ciclo y las células luteales mantienen cierto nivel de funcionalidad (producción de esteroides)

durante las subsiguientes fases lúteas (210; 212). Asimismo, resultados similares fueron obtenidos en otras especies (103). Por lo tanto, las células remanentes del CL de la preñez luego del parto podrían tener cierta funcionalidad, explicando los altos niveles de expresión de la P450scc y los niveles de progesterona luteales observados. Asimismo, se sabe que la actividad y/o expresión de la 20 α -HSD durante la preñez de la rata es muy baja y aumenta significativamente poco después del parto, junto con la disminución de progesterona (15; 18; 338; 743; 800). De acuerdo con la bibliografía, la actividad de la 20 α -HSD evaluada en el CL de nuestras ratas a distintos tiempos de gestación fue muy baja y aumentó significativamente luego del parto.

En cuanto a la expresión de las caspasas-2, -3, -8 y -9, la misma fue observada por IHC en el CL de ratas preñadas a distintos tiempos de gestación (días 7, 17, 19 y 21) y a distintos tiempos post parto (días 1 y 4 PP). No obstante, el patrón de expresión y localización de las distintas caspasas variaron. En el caso de las caspasas iniciadoras, no se observaron cambios notorios en sus expresiones en el transcurso de la gestación. Mientras que, para la caspasa efectora -3 se observó un aumento en su expresión en los días 7, 17 y 19 de gestación. Luego, en el post-parto se observa una disminución en la expresión de las cuatro caspasas estudiadas en el D 1PP seguidas de un incremento en el D4 PP. Este incremento observado en el CL de la preñez en el D4 PP, no se correlaciona con un incremento en la expresión de la caspasa-3 total/clivada cuantificado por western blot. Desconocemos el motivo de esta discrepancia pero quizás se encuentre relacionado a problemas técnicos (aspecto cualitativo de la IHC, diferencias en la interacción del anticuerpo en la forma desnaturalizada (western blot) versus estructura tridimensional (IHC), y de reconocimiento de la proenzima versus fragmentos), o quizás se deba a diferencias en la regulación proteica versus actividad enzimática. Tampoco este incremento observado en el D4 PP para las cuatro caspasas, se correlaciona con un aumento en su actividad. Por otro lado, los resultados de localización de las diferentes caspasas son similares a los encontrados en el CL del ciclo estral. La expresión de las caspasas-2 y -3 se encontró en el citoplasma y núcleo de las células luteales (grandes y pequeñas), como también en las células endoteliales. Mientras que, la expresión de las caspasas-8 y -9 sólo fue observada en las células luteales. El hecho de que las células endoteliales sólo expresen a la caspasa iniciadora -2 y no a la -8 ni -9, estaría sugiriendo un mecanismo de regulación diferente en este tipo celular. Como ya hemos mencionado, se ha detectado la presencia de apoptosis

en las células endoteliales y sugerido que su activación sería a través de TNF- α (201; 504). Cabe resaltar que, esta proteasa además de estar relacionada con el camino de los receptores de muerte (14; 146) se encuentra relacionada con el camino mitocondrial (262; 526). Además, esta caspasa puede actuar tanto de manera positiva como negativa en el desencadenamiento de la apoptosis dependiendo del estadio de desarrollo y tipo celular.

A diferencia de los resultados obtenidos para la expresión de las caspasas, se observó un patrón similar para la actividad de las cuatro caspasas evaluadas en el CL de la preñez y post parto. Observándose la máxima actividad enzimática en el CL entre los días 19 y 21 de gestación. De manera similar, Takiguchi y colaboradores demostraron un aumento significativo en la actividad de la caspasa-3 en el CL del día 21 de gestación (680). Asimismo, de acuerdo a los resultados obtenidos por western blot se observó un aumento significativo en los niveles del fragmento p17 de la caspasa-3 con respecto a la procaspasa en los días 19 y 21. Siendo este aumento en los niveles del fragmento clivado de la caspasa efectora, coincidente con el incremento en la actividad de la misma observado en el CL de preñez. Mientras que, no se observaron diferencias significativas en los niveles proteicos de la procaspasa-3 normalizados a lo largo de la gestación ni luego del parto en el CL de la preñez. El aumento en la actividad de las caspasas (-2, -3, -8 y -9) y del fragmento activo de la caspasa-3 fue previo o coincidente con la disminución en los niveles luteales de la progesterona y de la P450_{scc}. De manera que, la activación temprana de las caspasas preceda y quizás provoque la caída en los niveles de progesterona. Resultados similares hemos encontrados en el CL del ciclo menstrual natural del mono rhesus. Donde el pico de actividad de las caspasas fue observado en MLCL. En dicho estadio los niveles de progesterona aún son elevados y el CL recién comienza a regresionar (776). Sin embargo, estos resultados no estarían de acuerdo con diferentes evidencias que sugieren un efecto supresor de la progesterona sobre la actividad de la caspasa-3 (457; 675).

El aumento significativo en el número de células apoptóticas luego del parto (D1 y D4 PP) se encuentra desfasado respecto al pico de la actividad de las caspasas evaluadas. Estos resultados sugerirían la presencia de un camino apoptótico independiente de las caspasas en la regresión estructural del CL post parto. Cabe resaltar que, esta idea ha sido previamente propuesta por otros autores para el CL de la rata (1; 683). No obstante, este mecanismo estaría ocurriendo de manera simultánea

con mecanismos dependientes de caspasas, ya que la expresión y actividad de las cuatro caspasas estudiadas fueron claramente observadas en el CL de preñez en la rata, tanto en el D1 PP como en el D4 PP. Por otro lado, el hecho de que el CL esté compuesto por una población heterogénea de células y que menos del 10 % de éstas esten sufriendo apoptosis no descarta la posibilidad de que distintos tipos de muerte celular estén ocurriendo/coexistiendo.

En conclusión, nuestros resultados demuestran la expresión y actividad de las caspasas (-2, -3, -8 y -9) en el CL de ratas preñadas a distintos tiempos de gestación (días 7, 17, 19 y 21) y a distintos tiempos post parto (días 1 y 4 PP). Asimismo, se observó un aumento transiente en la actividad de las caspasas iniciadoras y la principal caspasa efectora en el CL de preñez en los días 19 y/o 21 de gestación. Este aumento en la actividad de las caspasas y el incremento en el fragmento activo de la caspasa-3 fue previo o coincidente con la disminución en los niveles luteales de la progesterona y de la P450sc. La temprana activación de las caspasas sugiere que las mismas podrían estar involucradas en la etapa temprana de la regresión funcional del CL (al final de la preñez) en la rata. Por otro lado, dado que la actividad de las tres caspasas iniciadoras evaluadas aumentan significativamente, ambos caminos apoptóticos (camino mitocondrial y camino de receptores de muerte) se encontrarían involucrados. Además, se observaron diferencias en cuanto a expresión y actividad de las caspasas en el CL de ratas preñadas a distintos tiempos de gestación y a distintos tiempos post parto. Por otro lado, debido a que el aumento significativo en el número de células apoptóticas (y el incremento en la actividad de la 20α -HSD) luego del parto se encuentra desfasado respecto al pico de la actividad de las caspasas, la presencia de un camino apoptótico independiente de las caspasas podría estar involucrado en la regresión estructural del CL de la preñez luego del parto en la rata.

Resultados (Capítulo II, Parte C)

C-Expresión y actividad de las caspasas-2, -8, -9 y -3, y su correlación con los niveles de apoptosis en el CL de la rata luego de la administración *in vivo* durante la preñez del factor luteolítico fisiológico en roedores (PGF-2 α)

Indices estructurales y funcionales del CL (niveles de P₄, P450scc, actividad de la 20 α -HSD)

El tratamiento *in vivo* con PGF-2 α a ratas en el día 14 de preñez produjo una disminución significativa ($p < 0,05$) en el contenido de progesterona a las 24 horas post-inyección (ver figura 26). Luego a las 36 horas vuelve a aumentar aunque no significativamente.

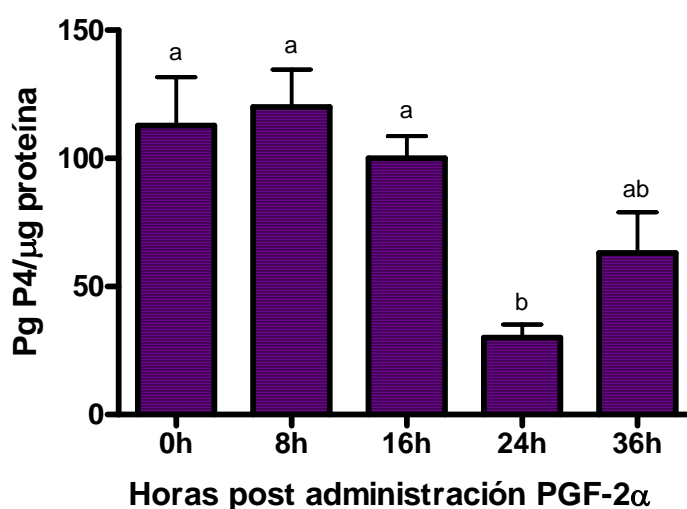


Figura 26. Niveles de progesterona (P₄; promedio \pm SEM) en los distintos CLs de ratas preñadas (Día 14) a distintos tiempos post-inyección (0, 8, 16, 24 y 36 horas) de PGF-2 α . Los valores fueron expresados como pg de P₄/ μ g de proteínas del CL. Las distintas letras muestran una diferencia significativa en los niveles de P₄ a distintos tiempos post-inyección ($p < 0,05$; $n = 3-5$ CLs por grupo).

En la figura 27 se puede observar una membrana representativa del western para la proteína P450scc a los distintos tiempos del tratamiento con PGF-2 α , y su correspondiente gráfico del análisis densitométrico normalizado con β -actina (control

interno). En la membrana se puede apreciar una banda de 53 KDa correspondiente a la proteína P450scc y otra de 42 KDa correspondiente al control interno. Los resultados normalizados de la proteína P450scc mostraron un aumento significativo ($p < 0.05$) a las 16 horas post tratamiento con PGF-2 α .

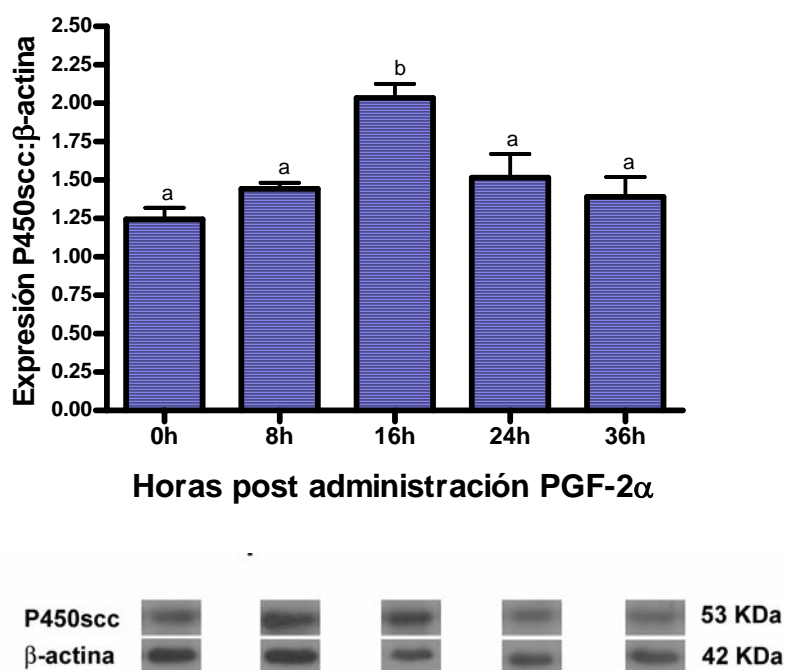


Figura 27. Análisis densitométrico del western blot de la proteína P450scc en los distintos CLs de ratas preñadas (Día 14) a distintos tiempos post-inyección (0, 8, 16, 24 y 36 horas) de PGF-2 α . Los valores fueron expresados como unidades arbitrarias \pm SEM ($n=5-9$ CLs/rata; 3-4 ratas/grupo). Las distintas letras muestran una diferencia significativa en los niveles de la proteína P450scc a distintos tiempos post-inyección ($p < 0,05$). En la parte inferior de la figura se puede observar una membrana ilustrativa con las bandas correspondientes a la P450scc (53 KDa) y el control interno β -actina (42 KDa).

No se observaron diferencias significativas en la actividad de la 20 α -HSD, a ninguno de los tiempos post-inyección de PGF-2 α evaluados ($p > 0,05$, ver figura 28).

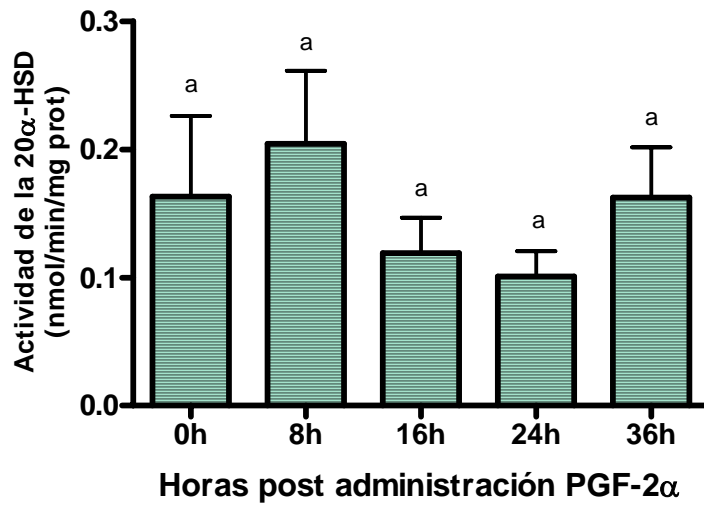
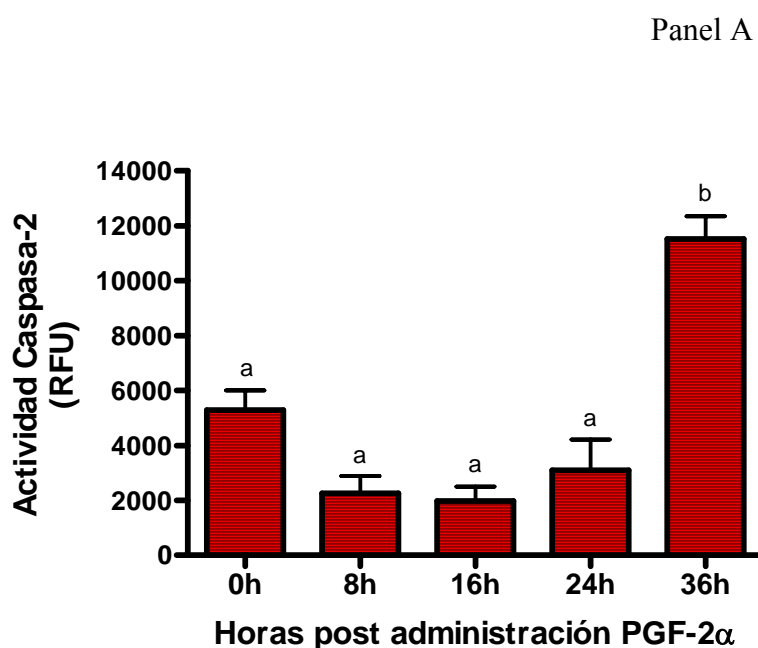


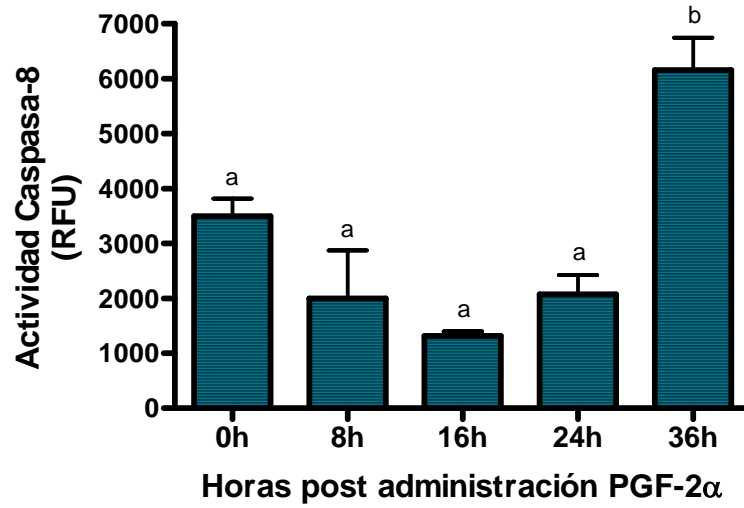
Figura 28. Actividad de la 20 α -HSD (promedio \pm SEM) en los distintos CLs de ratas preñadas (Día 14) a distintos tiempos post-inyección (0, 8, 16, 24 y 36 horas) de PGF-2 α . Los valores fueron expresados como nmol/min/mg proteínas del CL. No se observaron diferencias significativas en la actividad de la 20 α -HSD a distintos tiempos post-inyección ($p > 0,05$; $n = 3-5$ CLs por grupo).

Cuantificación de la actividad de las caspasas-2, -8, -9 y -3 en el CL de ratas preñadas (Día 14) a distintos tiempos post-inyección (0, 8, 16, 24 y 36 horas) de PGF-2 α por un método enzimático

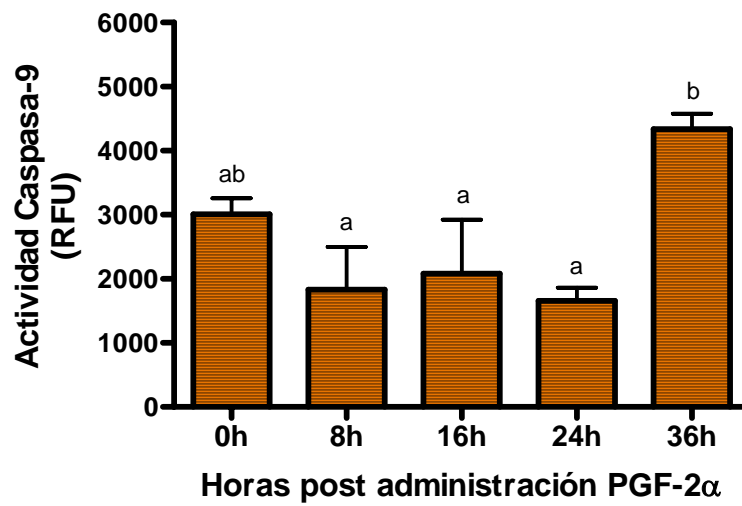
Luego de evaluar el efecto *in vivo* de la PGF-2 α sobre los niveles de progesterona y P450scc en el CL, se procedió a evaluar la actividad de las 4 caspasas a distintos tiempos luego de su administración. Las caspasas iniciadoras-2 y -8 presentaron el mismo patrón, con un aumento significativo ($p < 0,05$) a las 36 horas post inyección (ver panel A y B de la figura 29). En el caso de la caspasa iniciadora -9 también se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) a las 36 horas pero con respecto a los grupos 8, 16 y 24 horas (ver panel C, figura 29). En cuanto a la caspasa-3 (ver panel D, figura 29), también se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) a las 36 horas. Sin embargo, para esta caspasa se observó además una disminución significativa ($p < 0,05$) en su actividad a las 16 horas.



Panel B



Panel C



Panel D

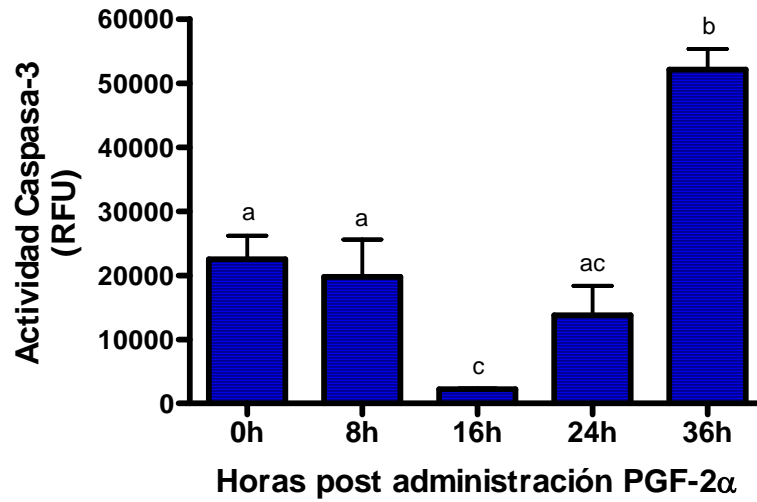


Figura 29. Actividad enzimática (promedio \pm SEM) de las caspasas iniciadoras -2 (Panel A), -8 (Panel B) y -9 (Panel C), y la efectora caspasa-3 (Panel D) en el CL de ratas preñadas (Día 14) a distintos tiempos post-inyección (0, 8, 16, 24 y 36 horas) de PGF-2 α . La actividad fue expresada como unidades relativas de fluorescencia (RFU). Las diferentes letras muestran una diferencia significativa en la actividad de estas caspasas a distintos tiempos post-inyección ($p < 0,05$, $n = 3-4$).

Cuantificación de los niveles proteicos de la caspasa-3 y su clivaje en el CL de ratas preñadas (Día 14) a distintos tiempos post-inyección (0, 8, 16, 24 y 36 horas) de PGF-2 α

Con el fin de continuar la evaluación del efecto de la administración exógena de PGF-2 α , se realizó el western blot para la principal caspasa efectora (-3). Como se observó en los otros modelos experimentales, el procesamiento de la caspasa-3 se puede visualizar junto con su expresión mediante un western blot. En la parte inferior de la figura 30, se muestra una membrana representativa donde se pueden observar distintas bandas. La banda de 36 KDa correspondiente a la procaspasa, varias bandas correspondientes a fragmentos inactivos del procesamiento proteolítico (entre 36 y 20 Kda), una banda de 20 KDa correspondiente a un fragmento inactivo (p20) y otra de 17 KDa correspondiente al fragmento activo clivado (p17). Además, se muestra la banda de 42 KDa correspondiente al control interno (β -actina). Los resultados normalizados de la procaspasa mostraron una disminución significativa ($p < 0,05$) a las 36 horas post inyección de PGF-2 α . Sin embargo, se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) en los niveles de los fragmentos p20 (dato no mostrado) y p17 con respecto a la procaspasa (ver gráfico, figura 30).

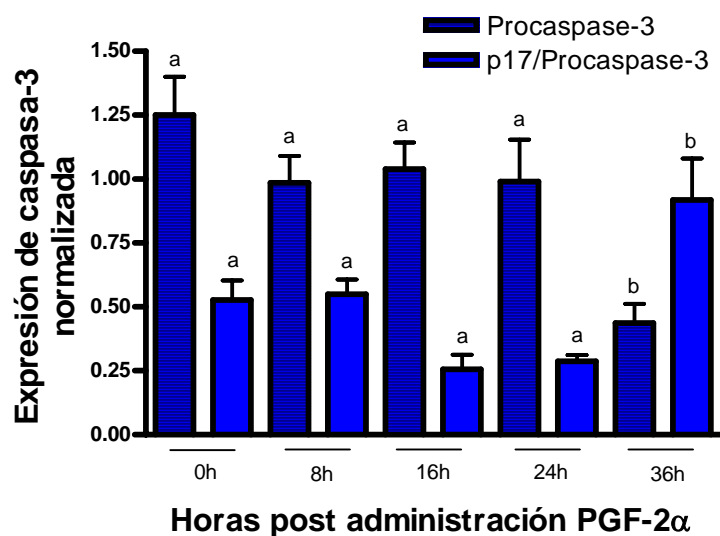


Figura 30. Análisis densitométrico del clivaje de la caspasa-3 mediante western blot en los distintos CLs de ratas preñadas (Día 14) a distintos tiempos post-inyección (0, 8, 16, 24 y 36 horas) de PGF-2 α . Los valores fueron expresados como unidades arbitrarias \pm SEM (n=5-9 CLs/rata; 3-4 ratas/grupo). Las distintas letras muestran una diferencia significativa a distintos tiempos post-inyección (p<0,05). En la parte inferior de la figura se puede observar una membrana ilustrativa con las bandas correspondientes a la procaspasa-3 (36 KDa), al fragmento p20 (20 KDa), al fragmento activo p17 (17 KDa) y al control interno β -actina (42 KDa).

Expresión proteica y localización de las caspasas-2, -8, -9 y -3 en el CL de ratas preñadas (Día 14) a distintos tiempos post-inyección (0, 8, 16, 24 y 36 horas) de PGF-2 α

Cabe destacar que la expresión de las caspasas-2, -8, -9 y -3 en el CL a distintos tiempos post inyección de PGF-2 α (ver figura 31) sigue un patrón similar en cuanto a tipo y localización celular del encontrado a lo largo de la preñez. Por otro lado, no se observaron cambios aparentes en la expresión de ninguna de las caspasas iniciadoras estudiadas. No obstante, en el caso de la caspasa-3 se observó una leve disminución en la marca a las 24 horas seguido de un aumento a las 36 horas post administración de PGF-2 α .

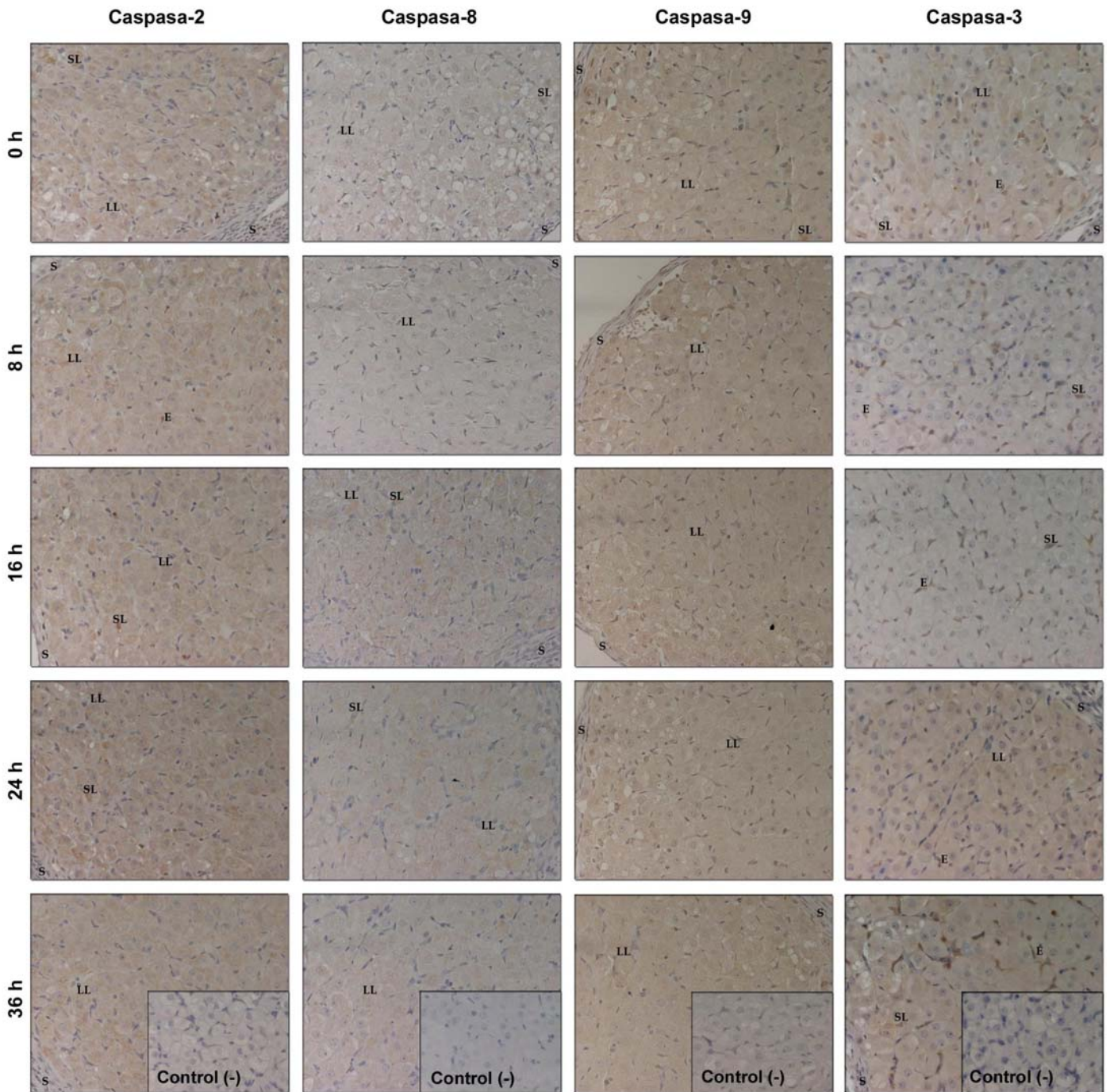


Figura 31. Microfotografía de secciones de CLs de ratas preñadas (Día 14) a distintos tiempos post-inyección (0, 8, 16, 24 y 36 horas) de $\text{PGF-2}\alpha$, sometidos a una inmunohistoquímica (IHC) para las caspasas-2, -8, -9 y -3. Las células positivas se identificaron por la presencia de reactividad marrón. La marca se observó en el citoplasma y/o en el núcleo de las células luteales grandes (LL), luteales pequeñas (SL) y en las células endoteliales (E), dependiendo de cada una de las caspasas. No se encontró marca en el estroma ni en el control negativo (incubado sin primer anticuerpo) en ninguno de los casos.

Evaluación y cuantificación de la apoptosis en el CL de ratas preñadas (Día 14) a distintos tiempos post-inyección (0, 8, 16, 24 y 36 horas) de PGF-2 α mediante la técnica de TUNEL

El porcentaje de células apoptóticas en los distintos tiempos post inyección de PGF-2 α fue muy pequeño (menor al 2%) y no se observaron diferencias significativas luego del tratamiento (datos no mostrados). El bajo número de células apoptóticas se encuentra de acuerdo a los resultados del TUNEL que describimos para el modelo de preñez. Por otro lado, dado que el aumento significativo de las caspasas se observa recién a las 36 horas, es probable que el aumento en el número de células apoptóticas se visualice luego de las 36 horas de la administración de PGF-2 α .

Discusión (Capítulo II, Parte C)

Como última parte de la tesis, decidimos estudiar el papel del factor luteolítico fisiológico en roedores (PGF-2- α), estudiando a distintos tiempos el efecto de la

administración de esta hormona en el día 14 de gestación en la regulación de la expresión y actividad de las caspasas mencionadas. Asimismo, evaluamos los índices estructurales y funcionales del CL (niveles de P₄, niveles de P450_{scc} y actividad de la 20 α -HSD); así como también la apoptosis mediante TUNEL a los distintos tiempos post administración de PGF-2- α .

El tratamiento *in vivo* con PGF-2 α a ratas en el día 14 de preñez produjo un aumento significativo en la actividad de las caspasas recién a las 36 horas post tratamiento. En el caso de las caspasas iniciadoras -2 y -8, se observó un patrón similar con un aumento significativo a las 36 horas post inyección. Mientras que, la caspasa iniciadora -9 también presentó un aumento significativo a las 36 horas pero con respecto a los grupos 8, 16 y 24 horas. Por último, la caspasa efectora además de presentar un aumento significativo a las 36 horas, ésta presentó una disminución significativa en su actividad a las 16 horas. Desconocemos el motivo de esta disminución pero la misma coincide con un aumento significativo en los niveles de la P450_{scc}. Por otro lado, el análisis de los resultados del western blot para la caspasa-3 estuvo de acuerdo con los resultados obtenidos para la actividad enzimática de la misma. Se observó un aumento significativo en los niveles de los fragmentos clivados p20 y p17 (fragmento clivado activo) con respecto a la procaspasa, a las 36 horas post inyección de PGF-2 α . De manera opuesta, la procaspasa presentó una disminución en su expresión a las 36 horas post tratamiento. Asimismo, se ha reportado que luego de la administración de PGF-2 α se produjo un aumento en la expresión del ARNm y en la actividad de la caspasa-3 en el CL de ovinos (545). Por otro lado, un trabajo reciente utilizando un modelo de ratas pseudopreñadas, manifestó la importancia de las caspasas-3 y -8 en la apoptosis luteal luego del tratamiento con PGF-2 α (759). El tardío incremento en la actividad de las caspasas y en el clivaje de la caspasa efectora obtenidos en esta tesis, quizás se deba a un efecto indirecto de la PGF-2 α dado que esta hormona actúa a través de su interacción con su receptor y posterior activación del camino de la PKC. El cual es un camino de transducción de señal rápido. No obstante, también se sabe que que la PGF-2 α estimula la expresión proteica y del ARNm de la 20 α -HSD (616; 651), e inhibe la expresión del ARNm y la actividad de la 3 β -HSD (396; 702). Asimismo, la PGF-2 α en la rata puede reducir el transporte de colesterol, disminuyendo la expresión de SCP-2 y de StAR (121; 428; 566). Recientemente, a partir de un trabajo donde se observó una supresión de la P450_{arom} luteal al final de la preñez por la PGF-2 α (614), se sugirió que en roedores la PGF-2 α

podría reducir la síntesis de progesterona suprimiendo la producción de estradiol por el CL.

De acuerdo a lo esperado, los niveles luteales de progesterona disminuyeron luego del tratamiento con PGF-2 α . Esta disminución se observó a las 24 horas post inyección, seguida de un aparente aumento aunque no significativo. La razón por la cual se produjo una disminución en los niveles de progesterona podría deberse a una estimulación de la 20 α -HSD, inhibición en la expresión de la 3 β -HSD, o ambas. Sin embargo, cuando evaluamos la actividad enzimática de la 20 α -HSD, no observamos diferencias significativas en la actividad de la misma a ninguno de los tiempos post inyección evaluados. De manera que, en nuestro modelo la administración de PGF-2 α afectaría en mayor medida a la 3 β -HSD, a la P450arom o al transporte de colesterol. Estos resultados indicarían que como consecuencia del tratamiento con PGF-2 α en el día 14 de gestación, se produce una disminución en los niveles de progesterona y esta disminución podría ser la responsable del aumento significativo en la actividad de las cuatro caspasas evaluadas. Estos resultados estarían de acuerdo con los trabajos publicados que sugieren un efecto protector de la progesterona en el CL. No obstante, estas evidencias corresponden principalmente a animales que poseen una fase lútea prolongada (animales domésticos y primates, entre otros), y sugieren que esta hormona es capaz de suprimir la actividad de la caspasa-3 (460; 673), la apoptosis (540) y la regresión luteal (162; 783). Estos resultados obtenidos en el modelo de PGF-2 α difieren de los obtenidos en el modelo de preñez y en el modelo del ciclo natural, tanto en ratas como en monos. Sugiriendo, que la administración exógena con PGF-2 α no necesariamente mimetiza la luteólisis fisiológica. Estas diferencias pueden deberse al tiempo y/o dosis seleccionadas, o quizás a la imposibilidad de secreción de la PGF-2 α en forma pulsátil.

El análisis de la IHC de las caspasas-2, -8, -9 y -3 en el CL a distintos tiempos post inyección de PGF-2 α , reveló que no se detectaron cambios aparentes en la expresión de ninguna de las caspasas iniciadoras estudiadas. Mientras que, la caspasa-3 presentó una leve disminución en su marca a las 24 horas seguido de un aumento a las 36 horas post administración de PGF-2 α . Pareciera que la PGF-2 α no estimularía la expresión de las caspasas, sobre todo de las iniciadoras, sino que podría actuar a nivel de activación, ya sea de manera directa o indirecta. Cabe destacar que, la expresión de las cuatro caspasas en el CL a distintos tiempos post inyección de PGF-

2 α sigue un patrón similar en cuanto a tipo y localización celular del encontrado a lo largo de la preñez.

La PGF-2 α es considerada el principal factor luteolítico fisiológico en roedores. No obstante, su papel principal es la luteólisis funcional y su participación en la luteólisis estructural no se conoce con certeza (132; 386). En cambio, la PRL ha sido relacionada con la luteólisis estructural en varios trabajos publicados (70; 216; 332; 374; 462). Sin embargo, hacia el final de la preñez el CL de la preñez pierde su capacidad de responder a la PRL y la expresión de sus receptores disminuye (698). Pero luego del parto la expresión de sus receptores incrementa nuevamente y el CL es capaz de responder a la PRL pudiendo así desencadenar la regresión estructural del CL. A pesar de que la PRL ha sido relacionada con la luteólisis estructural, se cree que la PGF-2 α podría tener un efecto indirecto en la involución del CL. Sin embargo, se ha observado que la PGF-2 α modula la regulación de diversos genes que podrían estar relacionados con la luteólisis estructural (132; 390). Por otro lado, la PGF-2 α puede regular componentes de la cascada apoptótica. Entre ellos, incrementa la expresión y/o actividad de distintas caspasas en diferentes especies (554; 758), incrementa la bioactividad o biodisponibilidad de citoquinas como FasL (95) y aumenta los niveles de FasL, Bax (757).

Lamentablemente, el porcentaje de células apoptóticas en el CL a distintos tiempos post inyección de PGF-2 α fue muy pequeño (menor al 2%) y no se pudieron observar diferencias significativas luego del tratamiento. No obstante, el bajo número de células apoptóticas estaría de acuerdo con los resultados obtenidos en el modelo de preñez. Dado que el aumento significativo en la actividad de las caspasas estudiadas fue observado recién a las 36 horas post tratamiento, es probable que el aumento en el número de células apoptóticas no pudiera observarse debido a que la activación de las caspasas es un evento previo al clivaje del ADN. De manera que, debería evaluarse este parámetro en un tiempo posterior a las 36 horas post tratamiento.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este modelo, se obtuvieron las siguientes conclusiones del tratamiento *in vivo* con PGF-2 α a ratas en el día 14 de preñez: (1) Disminuye los niveles luteales de progesterona a las 24 horas post inyección y esta disminución podría ser la responsable del aumento significativo en la actividad de las cuatro caspasas evaluadas a las 36 horas post tratamiento; (2) Aumenta los niveles de los fragmentos clivados p20 y p17 con respecto a la procaspasa y los niveles de la procaspasa disminuyen, a las 36 horas post inyección;

(3) Dado que la actividad de las tres caspasas iniciadoras evaluadas y de la principal caspasa efectora aumentan significativamente a las 36 horas post tratamiento, ambos caminos apoptóticos (camino mitocondrial y camino de receptores de muerte) se encontrarían involucrados; (4) Disminuye la expresión de la caspasa-3 a las 24 horas e incrementa su expresión a las 36 horas post inyección, mientras que no afecta la expresión de las caspasas-2, -8 y -9; (5) El control en la expresión de las caspasas luego del tratamiento con PGF-2 α puede diferir respecto al de su actividad; (6) No fue capaz de producir cambios notorios en el porcentaje de células apoptóticas en el CL de la preñez a los distintos tiempos post inyección evaluados; (7) La administración exógena con PGF-2 α no necesariamente mimetiza la luteólisis fisiológica.

Conclusiones

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta tesis, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- Varios miembros de la familia de las caspasas (-2, -8, -9 y -3) se encuentran expresados y activos en el CL durante la fase lútea del ciclo menstrual natural del mono rhesus, y del ciclo estral y la preñez de la rata.
- Las caspasas (-2, -8, -9 y -3) estarían involucradas en la etapa temprana de la luteólisis funcional del CL en el ciclo menstrual del mono rhesus, y en el ciclo estral y la preñez de la rata.
- La regulación de las caspasas en el CL de primates sería a nivel de la traducción o de la activación enzimática y no a nivel de la transcripción.
- El aumento transiente en la actividad de las caspasas ocurre en el CL cuando los niveles de progesterona aún son elevados.
- Ambos caminos apoptóticos (camino mitocondrial y de los receptores de muerte) se encontrarían involucrados en la luteólisis.
- El control en la expresión de las caspasas difiere respecto al de su actividad.
- Hay un aumento significativo en el número de células apoptóticas en la etapa tardía del CL en primates, en el CL del ciclo anterior en DII y en el CL de la preñez luego del parto.
- La administración exógena de PGF-2 α aumenta la actividad de las caspasas a las 36 horas post inyección, observándose que no necesariamente mimetiza la luteólisis fisiológica.

Conclusión General

La activación temprana de las caspasas en el ciclo menstrual del mono rhesus, y en el ciclo estral y la preñez de la rata, sugiere que las mismas estarían involucradas en la etapa temprana de la regresión funcional del cuerpo lúteo

Bibliografía

1. Abdo M, Hisheh S and Dharmarajan A. Role of tumor necrosis factor-alpha and the modulating effect of the caspases in rat corpus luteum apoptosis. *Biol Reprod* 68: 1241-1248, 2003.
2. Abdo M, Hisheh S and Dharmarajan A. Role of tumor necrosis factor-alpha and the modulating effect of the caspases in rat corpus luteum apoptosis. *Biol Reprod* 68: 1241-1248, 2003.
3. Abdo M, Hisheh S and Dharmarajan A. Role of tumor necrosis factor-alpha and the modulating effect of the caspases in rat corpus luteum apoptosis. *Biol Reprod* 68: 1241-1248, 2003.
4. Abdo MA, Richards A, Atiya N, Singh B, Parkinson S, Hisheh S and Dharmarajan AM. Inhibitors of caspase homologues suppress an apoptotic phenotype in cultured rabbit corpora lutea. *Reprod Fertil Dev* 13: 395-403, 2001.
5. Abdo MA, Richards A, Atiya N, Singh B, Parkinson S, Hisheh S and Dharmarajan AM. Inhibitors of caspase homologues suppress an apoptotic phenotype in cultured rabbit corpora lutea. *Reprod Fertil Dev* 13: 395-403, 2001.
6. Abe K, Kurakin A, Mohseni-Maybodi M, Kay B and Khosravi-Far R. The complexity of TNF-related apoptosis-inducing ligand. *Ann N Y Acad Sci* 926: 52-63, 2000.
7. Acosta TJ, Yoshizawa N, Ohtani M and Miyamoto A. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F(2 alpha) injection in the cow. *Biol Reprod* 66: 651-658, 2002.
8. Adashi EY. The potential relevance of cytokines to ovarian physiology: the emerging role of resident ovarian cells of the white blood cell series. *Endocr Rev* 11: 454-464, 1990.
9. Adashi EY, Resnick CE, D'Ercole AJ, Svoboda ME and Van Wyk JJ. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocr Rev* 6: 400-420, 1985.
10. Adashi EY, Resnick CE, Packman JN, Hurwitz A and Payne DW. Cytokine-mediated regulation of ovarian function: tumor necrosis factor alpha inhibits gonadotropin-supported progesterone accumulation by differentiating and luteinized murine granulosa cells. *Am J Obstet Gynecol* 162: 889-896, 1990.
11. Adashi EY, Resnick CE, Packman JN, Hurwitz A and Payne DW. Cytokine-mediated regulation of ovarian function: tumor necrosis factor alpha inhibits gonadotropin-supported progesterone accumulation by differentiating and luteinized murine granulosa cells. *Am J Obstet Gynecol* 162: 889-896, 1990.
12. Adashi EY, Resnick CE, Rosenfeld RG, Powell DR, Koistinen R, Rutanen EM and Seppala M. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-1 is an antagonodotropin: evidence that optimal follicle-stimulating hormone action in ovarian granulosa cells is contingent upon amplification by endogenously-derived IGFs. *Adv Exp Med Biol* 343: 377-385, 1993.
13. Ahmad M, Srinivasula SM, Wang L, Talanian RV, Litwack G, Fernandes-Alnemri T and Alnemri ES. CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP. *Cancer Res* 57: 615-619, 1997.
14. Ahmad M, Srinivasula SM, Wang L, Talanian RV, Litwack G, Fernandes-Alnemri T and Alnemri ES. CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP. *Cancer Res* 57: 615-619, 1997.
15. Albarracin CT and Gibori G. Prolactin action on luteal protein expression in the corpus luteum. *Endocrinology* 129: 1821-1830, 1991.
16. Albarracin CT and Gibori G. Prolactin action on luteal protein expression in the corpus luteum. *Endocrinology* 129: 1821-1830, 1991.
17. Albarracin CT and Gibori G. Prolactin action on luteal protein expression in the corpus luteum. *Endocrinology* 129: 1821-1830, 1991.

18. Albarracin CT, Parmer TG, Duan WR, Nelson SE and Gibori G. Identification of a major prolactin-regulated protein as 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase: coordinate regulation of its activity, protein content, and messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 134: 2453-2460, 1994.
19. Albarracin CT, Parmer TG, Duan WR, Nelson SE and Gibori G. Identification of a major prolactin-regulated protein as 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase: coordinate regulation of its activity, protein content, and messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 134: 2453-2460, 1994.
20. Albarracin CT, Parmer TG, Duan WR, Nelson SE and Gibori G. Identification of a major prolactin-regulated protein as 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase: coordinate regulation of its activity, protein content, and messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 134: 2453-2460, 1994.
21. Algeciras-Schimmich A, Barnhart BC and Peter ME. Apoptosis-independent functions of killer caspases. *Curr Opin Cell Biol* 14: 721-726, 2002.
22. Algeciras-Schimmich A, Barnhart BC and Peter ME. Apoptosis-independent functions of killer caspases. *Curr Opin Cell Biol* 14: 721-726, 2002.
23. Allen E. The oestrous cycle of the mouse. *Am J Anat* 30: 297, 1922.
24. Allen WM and Wintersteiner O. Crystalline progesterin. *Science* 80: 190-191, 1934.
25. Alliston TN, Gonzalez-Robayna IJ, Buse P, Firestone GL and Richards JS. Expression and localization of serum/glucocorticoid-induced kinase in the rat ovary: relation to follicular growth and differentiation. *Endocrinology* 141: 385-395, 2000.
26. Amber IJ, Hibbs JB, Jr., Taintor RR and Vavrin Z. Cytokines induce an L-arginine-dependent effector system in nonmacrophage cells. *J Leukoc Biol* 44: 58-65, 1988.
27. Amsterdam A, Rotmensch S and Ben Ze'ev A. Coordinated regulation of morphological and biochemical differentiation in a steroidogenic cell: the granulosa cell model. *Trends Biochem Sci* 14: 377-382, 1989.
28. Andreu C, Parborell F, Vanzulli S, Chemes H and Tesone M. Regulation of follicular luteinization by a gonadotropin-releasing hormone agonist: relationship between steroidogenesis and apoptosis. *Mol Reprod Dev* 51: 287-294, 1998.
29. Andreu C, Parborell F, Vanzulli S, Chemes H and Tesone M. Regulation of follicular luteinization by a gonadotropin-releasing hormone agonist: relationship between steroidogenesis and apoptosis. *Mol Reprod Dev* 51: 287-294, 1998.
30. Andrieu-Abadie N and Levade T. Sphingomyelin hydrolysis during apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1585: 126-134, 2002.
31. Armstrong DT, Miller LV and Knudsen KA. Regulation of lipid metabolism and progesterone production in rat corpora lutea and ovarian interstitial elements by prolactin and luteinizing hormone. *Endocrinology* 85: 393-401, 1969.
32. Asdell S and Hammond J. The effects of prolonging the life of the corpus luteum in the rabbit by hysterectomy. *Am J Physiol* 103: 600-605, 1933.
33. Aten RF, Kolodecik TR, Rossi MJ, Debusscher C and Behrman HR. Prostaglandin f2alpha treatment in vivo, but not in vitro, stimulates protein kinase C-activated superoxide production by nonsteroidogenic cells of the rat corpus luteum. *Biol Reprod* 59: 1069-1076, 1998.
34. Aten RF, Kolodecik TR, Rossi MJ, Debusscher C and Behrman HR. Prostaglandin f2alpha treatment in vivo, but not in vitro, stimulates protein kinase C-activated superoxide production by nonsteroidogenic cells of the rat corpus luteum. *Biol Reprod* 59: 1069-1076, 1998.
35. Azhar S, Khan I, Chen YD, Reaven GM and Gibori G. Regulation of luteal cell 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity by estradiol. *Biol Reprod* 32: 333-341, 1985.

36. Azhar S, Tsai L, Medicherla S, Chandrasekher Y, Giudice L and Reaven E. Human granulosa cells use high density lipoprotein cholesterol for steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 983-991, 1998.
37. Bacci ML, Barazzoni AM, Forni M and Costerbosa GL. In situ detection of apoptosis in regressing corpus luteum of pregnant sow: evidence of an early presence of DNA fragmentation. *Domest Anim Endocrinol* 13: 361-372, 1996.
38. Bacci ML, Barazzoni AM, Forni M and Costerbosa GL. In situ detection of apoptosis in regressing corpus luteum of pregnant sow: evidence of an early presence of DNA fragmentation. *Domest Anim Endocrinol* 13: 361-372, 1996.
39. Baffy G, Miyashita T, Williamson JR and 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.
40. Bagavandoss P. Differential distribution of gelatinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the rat ovary. *J Endocrinol* 158: 221-228, 1998.
41. Bagavandoss P, Kunkel SL, Wiggins RC and Keyes PL. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) production and localization of macrophages and T lymphocytes in the rabbit corpus luteum. *Endocrinology* 122: 1185-1187, 1988.
42. Banka CL and Erickson GF. Gonadotropin-releasing hormone induces classical meiotic maturation in subpopulations of atretic preantral follicles. *Endocrinology* 117: 1500-1507, 1985.
43. Bazer F. Maintenance of pregnancy. In: Encyclopedia of Reproduction, edited by Knobil E and Neill JD. New York: Academic Press, 1999, p. 1002-1006.
44. Beckman JD, Grazul-Bilska AT, Johnson ML, Reynolds LP and Redmer DA. Isolation and characterization of ovine luteal pericytes and effects of nitric oxide on pericyte expression of angiogenic factors. *Endocrine* 29: 467-476, 2006.
45. Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Taylor P, Morimoto RI, Cohen GM and Green DR. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2: 469-475, 2000.
46. Beg AA and Baltimore D. An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death. *Science* 274: 782-784, 1996.
47. Behrman HR and Aten RF. Evidence that hydrogen peroxide blocks hormone-sensitive cholesterol transport into mitochondria of rat luteal cells. *Endocrinology* 128: 2958-2966, 1991.
48. Behrman HR, Grinwich DL and Hichens M. Studies on the mechanism of PGF $_2$ α and gonadotropin interactions on LH receptor function in corpora lutea during luteolysis. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res* 2: 655-666, 1976.
49. Benyo DF and Pate JL. Tumor necrosis factor- α alters bovine luteal cell synthetic capacity and viability. *Endocrinology* 130: 854-860, 1992.
50. Bergeron L, Perez GI, Macdonald G, Shi L, Sun Y, Jurisicova A, Varmuza S, Latham KE, Flaws JA, Salter JC, Hara H, Moskowitz MA, Li E, Greenberg A, Tilly JL and Yuan J. Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. *Genes Dev* 12: 1304-1314, 1998.
51. Berisha B, Schams D and Miyamoto A. The expression of angiotensin and endothelin system members in bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. *Endocrine* 19: 305-312, 2002.
52. Besman MJ, Yanagibashi K, Lee TD, Kawamura M, Hall PF and Shively JE. Identification of des-(Gly-Ile)-endozepine as an effector of corticotropin-dependent adrenal steroidogenesis: stimulation of cholesterol delivery is mediated by the peripheral benzodiazepine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 4897-4901, 1989.

53. Bill CH and Keyes PL. 17 beta-estradiol maintains normal function of corpora lutea throughout pseudopregnancy in hypophysectomized rabbits. *Biol Reprod* 28: 608-617, 1983.
54. Bloom W. and Fawcett W.D. *Tratado de Histología*. Madrid: Mc. Graw Hill - Interamericana, 1975.
55. Bloom W. and Fawcett W.D. *Tratado de Histología*. Madrid: Mc. Graw Hill - Interamericana, 1975.
56. Bloom W. and Fawcett W.D. *Tratado de Histología*. Madrid: Mc. Graw Hill - Interamericana, 1975.
57. Bloom W. and Fawcett W.D. *Tratado de Histología*. Madrid: Mc. Graw Hill - Interamericana, 1975.
58. Boiti C, Guelfi G, Brecchia G, Dall'Aglio C, Ceccarelli P, Maranesi M, Mariottini C, Zampini D, Gobbetti A and Zerani M. Role of the endothelin-1 system in the luteolytic process of pseudopregnant rabbits. *Endocrinology* 146: 1293-1300, 2005.
59. Boiti C, Guelfi G, Brecchia G, Dall'Aglio C, Ceccarelli P, Maranesi M, Mariottini C, Zampini D, Gobbetti A and Zerani M. Role of the endothelin-1 system in the luteolytic process of pseudopregnant rabbits. *Endocrinology* 146: 1293-1300, 2005.
60. Boiti C, Guelfi G, Zerani M, Zampini D, Brecchia G and Gobbetti A. Expression patterns of cytokines, p53 and nitric oxide synthase isoenzymes in corpora lutea of pseudopregnant rabbits during spontaneous luteolysis. *Reproduction* 127: 229-238, 2004.
61. Boiti C, Maranesi M, Dall'Aglio C, Pascucci L, Brecchia G, Gobbetti A and Zerani M. Vasoactive peptides in the luteolytic process activated by PGF₂alpha in pseudopregnant rabbits at different luteal stages. *Biol Reprod* 77: 156-164, 2007.
62. Boiti C, Zampini D, Zerani M, Guelfi G and Gobbetti A. Prostaglandin receptors and role of G protein-activated pathways on corpora lutea of pseudopregnant rabbit in vitro. *J Endocrinol* 168: 141-151, 2001.
63. Boiti C, Zerani M, Zampini D and Gobbetti A. Nitric oxide synthase activity and progesterone release by isolated corpora lutea of rabbits in the early and mid-luteal phases of pseudopregnancy are modulated differently by prostaglandin E-2 and prostaglandin F-2alpha via adenylate cyclase and phospholipase C. *J Endocrinol* 164: 179-186, 2000.
64. Boone DL and Tsang BK. Caspase-3 in the rat ovary: localization and possible role in follicular atresia and luteal regression. *Biol Reprod* 58: 1533-1539, 1998.
65. Boone DL and Tsang BK. Caspase-3 in the rat ovary: localization and possible role in follicular atresia and luteal regression. *Biol Reprod* 58: 1533-1539, 1998.
66. Bowen J, Keyes P, Warren J and Townson D. Prolactin-induced regression of the rat corpus luteum: expression of monocyte chemoattractant protein-1 and invasion of macrophages. *Biol Reprod* 54: 1120-1127, 1996.
67. Bowen J, Keyes P, Warren J and Townson D. Prolactin-induced regression of the rat corpus luteum: expression of monocyte chemoattractant protein-1 and invasion of macrophages. *Biol Reprod* 54: 1120-1127, 1996.
68. Bowen J, Keyes P, Warren J and Townson D. Prolactin-induced regression of the rat corpus luteum: expression of monocyte chemoattractant protein-1 and invasion of macrophages. *Biol Reprod* 54: 1120-1127, 1996.
69. Bowen J, Keyes P, Warren J and Townson D. Prolactin-induced regression of the rat corpus luteum: expression of monocyte chemoattractant protein-1 and invasion of macrophages. *Biol Reprod* 54: 1120-1127, 1996.

70. Bowen J, Keyes P, Warren J and Townson D. Prolactin-induced regression of the rat corpus luteum: expression of monocyte chemoattractant protein-1 and invasion of macrophages. *Biol Reprod* 54: 1120-1127, 1996.
71. Bowen J, Keyes P, Warren J and Townson D. Prolactin-induced regression of the rat corpus luteum: expression of monocyte chemoattractant protein-1 and invasion of macrophages. *Biol Reprod* 54: 1120-1127, 1996.
72. Bowen-Shauver JM and Gibori G. The Corpus Luteum of Pregnancy. In: *The Ovary*, edited by Leung P.C.K and Adashi EY. San Diego: Elsevier Inc, Academic Press, 2004, p. 201-230.
73. Brannstrom M, Giesecke L, Moore IC, van den Heuvel CJ and Robertson SA. Leukocyte subpopulations in the rat corpus luteum during pregnancy and pseudopregnancy. *Biol Reprod* 50: 1161-1167, 1994.
74. Brannstrom M, Giesecke L, Moore IC, van den Heuvel CJ and Robertson SA. Leukocyte subpopulations in the rat corpus luteum during pregnancy and pseudopregnancy. *Biol Reprod* 50: 1161-1167, 1994.
75. Brannstrom M, Norman RJ, Seamark RF and Robertson SA. Rat ovary produces cytokines during ovulation. *Biol Reprod* 50: 88-94, 1994.
76. Bratton SB, Walker G, Srinivasula SM, Sun XM, Butterworth M, Alnemri ES and Cohen GM. Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *EMBO J* 20: 998-1009, 2001.
77. Bruot BC, Wiest WG and Collins DC. Effect of low density and high density lipoproteins on progesterone secretion by dispersed corpora luteal cells from rats treated with aminopyrazolo-(3,4-d)pyrimidine. *Endocrinology* 110: 1572-1578, 1982.
78. Bussmann LE and Deis RP. Studies concerning the hormonal induction of lactogenesis by prostaglandin F2 alpha in pregnant rats. *J Steroid Biochem* 11: 1485-1489, 1979.
79. Bussmann LE and Deis RP. Studies concerning the hormonal induction of lactogenesis by prostaglandin F2 alpha in pregnant rats. *J Steroid Biochem* 11: 1485-1489, 1979.
80. Butcher RL, Fugo NW and Collins WE. Semicircadian rhythm in plasma levels of prolactin during early gestation in the rat. *Endocrinology* 90: 1125-1127, 1972.
81. Butenandt A, Westphal U and Cobler H. Uber einen abbau des stigma-sterins zu corpus-luteum-worksaamen stoffen; ein beitrag zur konstitution des corpus-luteum-hormons (vorlauf mitteil). *Ber Dtsch Chem Ges* B67: 1611-1616, 1934.
82. Butler WR, Hotchkiss J and Knobil E. Functional luteolysis in the rhesus monkey: ovarian estrogen and progesterone during the luteal phase of the menstrual cycle. *Endocrinology* 96: 1509-1512, 1975.
83. Butler WR, Hotchkiss J and Knobil E. Functional luteolysis in the rhesus monkey: ovarian estrogen and progesterone during the luteal phase of the menstrual cycle. *Endocrinology* 96: 1509-1512, 1975.
84. Byers M, Kuiper GG, Gustafsson JA and Park-Sarge OK. Estrogen receptor-beta mRNA expression in rat ovary: down-regulation by gonadotropins. *Mol Endocrinol* 11: 172-182, 1997.
85. Caffrey JL, Fletcher PW, Diekmann MA, O'Callaghan PL and Niswender GD. The activity of ovine luteal cholesterol esterase during several experimental conditions. *Biol Reprod* 21: 601-608, 1979.
86. Cai Z and Stocco C. Expression and regulation of progestin membrane receptors in the rat corpus luteum. *Endocrinology* 146: 5522-5532, 2005.
87. Cai Z and Stocco C. Expression and regulation of progestin membrane receptors in the rat corpus luteum. *Endocrinology* 146: 5522-5532, 2005.

88. Camp TA, Rahal JO and Mayo KE. Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary. *Mol Endocrinol* 5: 1405-1417, 1991.
89. Carambula SF, Matikainen T, Lynch MP, Flavell RA, Goncalves PB and Rueda BR. Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of the ovarian corpus luteum. *Endocrinology* 143: 1495-1501, 2002.
90. Carambula SF, Matikainen T, Lynch MP, Flavell RA, Goncalves PB and Rueda BR. Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of the ovarian corpus luteum. *Endocrinology* 143: 1495-1501, 2002.
91. Carambula SF, Matikainen T, Lynch MP, Flavell RA, Goncalves PB and Rueda BR. Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of the ovarian corpus luteum. *Endocrinology* 143: 1495-1501, 2002.
92. Carambula SF, Matikainen T, Lynch MP, Flavell RA, Goncalves PB and Rueda BR. Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of the ovarian corpus luteum. *Endocrinology* 143: 1495-1501, 2002.
93. Carambula SF, Pru JK, Lynch MP, Matikainen T, Goncalves PB, Flavell RA, Tilly JL and Rueda BR. Prostaglandin F2alpha- and FAS-activating antibody-induced regression of the corpus luteum involves caspase-8 and is defective in caspase-3 deficient mice. *Reprod Biol Endocrinol* 1: 15, 2003.
94. Carambula SF, Pru JK, Lynch MP, Matikainen T, Goncalves PB, Flavell RA, Tilly JL and Rueda BR. Prostaglandin F2alpha- and FAS-activating antibody-induced regression of the corpus luteum involves caspase-8 and is defective in caspase-3 deficient mice. *Reprod Biol Endocrinol* 1: 15, 2003.
95. Carambula SF, Pru JK, Lynch MP, Matikainen T, Goncalves PB, Flavell RA, Tilly JL and Rueda BR. Prostaglandin F2alpha- and FAS-activating antibody-induced regression of the corpus luteum involves caspase-8 and is defective in caspase-3 deficient mice. *Reprod Biol Endocrinol* 1: 15, 2003.
96. Carlson JC, Buhr MM, Gruber MY and Thompson JE. Compositional and physical properties of microsomal membrane lipids from regressing rat corpora lutea. *Endocrinology* 108: 2124-2128, 1981.
97. Carlson JC, Buhr MM and Riley JC. Plasma membrane changes during corpus luteum regression. *Can J Physiol Pharmacol* 67: 957-961, 1989.
98. Carlson JC, Buhr MM and Riley JC. Plasma membrane changes during corpus luteum regression. *Can J Physiol Pharmacol* 67: 957-961, 1989.
99. Carlson JC, Buhr MM, Wentworth R and Hansel W. Evidence of membrane changes during regression in the bovine corpus luteum. *Endocrinology* 110: 1472-1476, 1982.
100. Carlson JC, Wu XM and Sawada M. Oxygen radicals and the control of ovarian corpus luteum function. *Free Radic Biol Med* 14: 79-84, 1993.
101. Caron MG, Goldstein S, Savard K and Marsh JM. Protein kinase stimulation of a reconstituted cholesterol side chain cleavage enzyme system in the bovine corpus luteum. *J Biol Chem* 250: 5137-5143, 1975.
102. Castracane VD, Stevens V, Knickerbocker J, Powell J, Randolph M and Gimpel T. Late luteal rescue in the baboon (*Papio cynocephalus*). *Hum Reprod Update* 4: 383-388, 1998.
103. Castracane VD, Stevens V, Knickerbocker J, Powell J, Randolph M and Gimpel T. Late luteal rescue in the baboon (*Papio cynocephalus*). *Hum Reprod Update* 4: 383-388, 1998.
104. Cataldo NA, Fujimoto VY and Jaffe RB. Interferon-gamma and activin A promote insulin-like growth factor- binding protein-2 and -4 accumulation by human luteinizing granulosa cells, and interferon-gamma promotes their apoptosis. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 179-186, 1998.
105. Cavanagh AC and Morton H. The purification of early-pregnancy factor to homogeneity from human platelets and identification as chaperonin 10. *Eur J Biochem* 222: 551-560, 1994.

106. Chaffin CL and Stouffer RL. Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor messenger ribonucleic acids in macaque periovulatory granulosa cells: time course and steroid regulation. *Biol Reprod* 61: 14-21, 1999.
107. Chaffin CL, Stouffer RL and Duffy DM. Gonadotropin and steroid regulation of steroid receptor and aryl hydrocarbon receptor messenger ribonucleic acid in macaque granulosa cells during the periovulatory interval. *Endocrinology* 140: 4753-4760, 1999.
108. Chen D, Fong HW and Davis JS. Induction of c-fos and c-jun messenger ribonucleic acid expression by prostaglandin F2alpha is mediated by a protein kinase C-dependent extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathway in bovine luteal cells. *Endocrinology* 142: 887-895, 2001.
109. Chen D, Fong HW and Davis JS. Induction of c-fos and c-jun messenger ribonucleic acid expression by prostaglandin F2alpha is mediated by a protein kinase C-dependent extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathway in bovine luteal cells. *Endocrinology* 142: 887-895, 2001.
110. Chen XL, Gao HJ, Wei P, Song XX, Hu ZY and Liu YX. Regulatory effect of IFN-gamma on expression of TGF-beta 1, T beta R-II, and StAR in corpus luteum of pregnant rhesus monkey. *Acta Pharmacol Sin* 24: 435-441, 2003.
111. Chen Z and Menon KM. Expression of high density lipoprotein-binding protein messenger ribonucleic acid in the rat ovary and its regulation by gonadotropin. *Endocrinology* 134: 2360-2366, 1994.
112. Chiang CH, Cheng KW, Igarashi S, Nathwani PS and Leung PC. Hormonal regulation of estrogen receptor alpha and beta gene expression in human granulosa-luteal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 3828-3839, 2000.
113. Chin EC, Harris TE and Abayasekara DR. Changes in cAMP-dependent protein kinase (PKA) and progesterone secretion in luteinizing human granulosa cells. *J Endocrinol* 183: 39-50, 2004.
114. Chomczynski P and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987.
115. Clark BJ, Soo SC, Caron KM, Ikeda Y, Parker KL and Stocco DM. Hormonal and developmental regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. *Mol Endocrinol* 9: 1346-1355, 1995.
116. Clark BJ, Soo SC, Caron KM, Ikeda Y, Parker KL and Stocco DM. Hormonal and developmental regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. *Mol Endocrinol* 9: 1346-1355, 1995.
117. Clarke DL and Linzer DL. Changes in prolactin receptor expression during pregnancy in the mouse ovary. *Endocrinology* 133: 224-232, 1993.
118. Clevenger CV, Freier DO and Kline JB. Prolactin receptor signal transduction in cells of the immune system. *J Endocrinol* 157: 187-197, 1998.
119. Cok SJ, Hay RV and Holt JA. Estrogen-mediated mitochondrial cholesterol transport and metabolism to pregnenolone in the rabbit luteinized ovary. *Biol Reprod* 57: 360-366, 1997.
120. Colles SM, Woodford JK, Moncecchi D, Myers-Payne SC, McLean LR, Billheimer JT and Schroeder F. Cholesterol interaction with recombinant human sterol carrier protein-2. *Lipids* 30: 795-803, 1995.
121. Colles SM, Woodford JK, Moncecchi D, Myers-Payne SC, McLean LR, Billheimer JT and Schroeder F. Cholesterol interaction with recombinant human sterol carrier protein-2. *Lipids* 30: 795-803, 1995.
122. Conneely OM, Mulac-Jericevic B, DeMayo F, Lydon JP and O'Malley BW. Reproductive functions of progesterone receptors. *Recent Prog Horm Res* 57: 339-355, 2002.
123. Cook B, Kaltenbach CC, Norton HW and Nalbandov AV. Synthesis of progesterone in vitro by porcine corpora lutea. *Endocrinology* 81: 573-584, 1967.

124. Cook CL, Rao CV and Yussman MA. Plasma gonadotropin and sex steroid hormone levels during early, midfollicular, and midluteal phases of women with luteal phase defects. *Fertil Steril* 40: 45-48, 1983.
125. Corner GW. Development, organization, and breakdown of the corpus luteum in the Rhesus monkey. In: *Contributions to Embryol.*, 1945, p. 119-146.
126. Corner GW and Allen WM. Normal growth and implantation of embryos after very early ablation of the ovaries, under the influence of extracts of the corpus luteum. *Am J Physiol* 88: 340-346, 1929.
127. Cuende E, Ales-Martinez JE, Ding L, Gonzalez-Garcia M, Martinez C and Nunez G. Programmed cell death by bcl-2-dependent and independent mechanisms in B lymphoma cells. *EMBO J* 12: 1555-1560, 1993.
128. Curlewis JD, Tam SP, Lau P, Kusters DH, Barclay JL, Anderson ST and Waters MJ. A prostaglandin f (2alpha) analog induces suppressors of cytokine signaling-3 expression in the corpus luteum of the pregnant rat: a potential new mechanism in luteolysis. *Endocrinology* 143: 3984-3993, 2002.
129. Curry TE, Jr., Song L and Wheeler SE. Cellular localization of gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases during follicular growth, ovulation, and early luteal formation in the rat. *Biol Reprod* 65: 855-865, 2001.
130. Curtis H. and Barnes N.S. *Biología*. 2000.
131. D'Hooghe TM, Bambra CS, Raeymaekers BM and Koninckx PR. Increased incidence and recurrence of recent corpus luteum without ovulation stigma (luteinized unruptured follicle syndrome?) in baboons with endometriosis. *J Soc Gynecol Invest* 3: 140-144, 1996.
132. Davis JS and Rueda BR. The corpus luteum: an ovarian structure with maternal instincts and suicidal tendencies. *Front Biosci* 7: 1978, 2002.
133. De Graaf, R. *De Mullierum Organis Generationi Inservientibus*. 1672. Leyden, Translated by G.W.Corner. In: *Essays in Biology*. Berkeley, CA: Univ. of California Press, 1943.

Ref Type: Report

134. De Jong FH. Inhibin. *Physiol Rev* 68: 555-607, 1988.
135. Deveraux QL and Reed JC. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13: 239-252, 1999.
136. Dewi DA, Abayasekara DR and Wheeler-Jones CP. Requirement for ERK1/2 activation in the regulation of progesterone production in human granulosa-lutein cells is stimulus specific. *Endocrinology* 143: 877-888, 2002.
137. Dharmarajan AM, Goodman SB, Tilly KI and Tilly JL. Apoptosis during functional corpus luteum regression: evidence of a role for chorionic gonadotropin in promoting luteal cell survival. *Endocrine Journal* 2: 295-303, 1994.
138. Diaz FJ, Anderson LE, Wu YL, Rabot A, Tsai SJ and Wiltbank MC. Regulation of progesterone and prostaglandin F2alpha production in the CL. *Mol Cell Endocrinol* 191: 65-80, 2002.
139. Diaz FJ, Anderson LE, Wu YL, Rabot A, Tsai SJ and Wiltbank MC. Regulation of progesterone and prostaglandin F2alpha production in the CL. *Mol Cell Endocrinol* 191: 65-80, 2002.
140. Diaz FJ, Anderson LE, Wu YL, Rabot A, Tsai SJ and Wiltbank MC. Regulation of progesterone and prostaglandin F2alpha production in the CL. *Mol Cell Endocrinol* 191: 65-80, 2002.
141. Dimmeler S, Haendeler J, Galle J and Zeiher AM. Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases. A mechanistic clue to the 'response to injury' hypothesis. *Circulation* 95: 1760-1763, 1997.

142. diZerega GS and Hodgen GD. Folliculogenesis in the primate ovarian cycle. *Endocr Rev* 2: 27-49, 1981.
143. Doody KJ, Lephart ED, Stirling D, Lorence MC, Magness RR, McPhaul MJ and Simpson ER. Expression of mRNA species encoding steroidogenic enzymes in the rat ovary. *J Mol Endocrinol* 6: 153-162, 1991.
144. Doody KJ, Lorence MC, Mason JI and Simpson ER. Expression of messenger ribonucleic acid species encoding steroidogenic enzymes in human follicles and corpora lutea throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 70: 1041-1045, 1990.
145. Douglas DA, Pierson RA and Murphy BD. Ovarian follicular development in mink (*Mustela vison*). *J Reprod Fertil* 100: 583-590, 1994.
146. Duan H and Dixit VM. RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. *Nature* 385: 86-89, 1997.
147. Duan H and Dixit VM. RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. *Nature* 385: 86-89, 1997.
148. Duan WR, Linzer DI and Gibori G. Cloning and characterization of an ovarian-specific protein that associates with the short form of the prolactin receptor. *J Biol Chem* 271: 15602-15607, 1996.
149. Duan WR, Parmer TG, Albarracin CT, Zhong L and Gibori G. PRAP, a prolactin receptor associated protein: its gene expression and regulation in the corpus luteum. *Endocrinology* 138: 3216-3221, 1997.
150. Duffy DM, Abdelgadir SE, Stott KR, Resko JA, Stouffer RL and Zelinski-Wooten MB. Androgen receptor mRNA expression in the rhesus monkey ovary. *Endocrine* 11: 23-30, 1999.
151. Duffy DM, Abdelgadir SE, Stott KR, Resko JA, Stouffer RL and Zelinski-Wooten MB. Androgen receptor mRNA expression in the rhesus monkey ovary. *Endocrine* 11: 23-30, 1999.
152. Duffy DM, Chaffin CL and Stouffer RL. Expression of estrogen receptor alpha and beta in the rhesus monkey corpus luteum during the menstrual cycle: regulation by luteinizing hormone and progesterone. *Endocrinology* 141: 1711-1717, 2000.
153. Duffy DM, Chaffin CL and Stouffer RL. Expression of estrogen receptor alpha and beta in the rhesus monkey corpus luteum during the menstrual cycle: regulation by luteinizing hormone and progesterone. *Endocrinology* 141: 1711-1717, 2000.
154. Duffy DM, Chaffin CL and Stouffer RL. Expression of estrogen receptor alpha and beta in the rhesus monkey corpus luteum during the menstrual cycle: regulation by luteinizing hormone and progesterone. *Endocrinology* 141: 1711-1717, 2000.
155. Duffy DM, Chaffin CL and Stouffer RL. Expression of estrogen receptor alpha and beta in the rhesus monkey corpus luteum during the menstrual cycle: regulation by luteinizing hormone and progesterone. *Endocrinology* 141: 1711-1717, 2000.
156. Duffy DM, Chaffin CL and Stouffer RL. Expression of estrogen receptor alpha and beta in the rhesus monkey corpus luteum during the menstrual cycle: regulation by luteinizing hormone and progesterone. *Endocrinology* 141: 1711-1717, 2000.
157. Duffy DM, Chaffin CL and Stouffer RL. Expression of estrogen receptor alpha and beta in the rhesus monkey corpus luteum during the menstrual cycle: regulation by luteinizing hormone and progesterone. *Endocrinology* 141: 1711-1717, 2000.
158. Duffy DM, Chaffin CL and Stouffer RL. Expression of estrogen receptor alpha and beta in the rhesus monkey corpus luteum during the menstrual cycle: regulation by luteinizing hormone and progesterone. *Endocrinology* 141: 1711-1717, 2000.
159. Duffy DM, Stewart DR and Stouffer RL. Titrating luteinizing hormone replacement to sustain the structure and function of the corpus luteum after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment in rhesus monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 342-349, 1999.

160. Duffy DM, Stewart DR and Stouffer RL. Titrating luteinizing hormone replacement to sustain the structure and function of the corpus luteum after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment in rhesus monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 342-349, 1999.
161. Duffy DM and Stouffer RL. Progesterone receptor messenger ribonucleic acid in the primate corpus luteum during the menstrual cycle: possible regulation by progesterone. *Endocrinology* 136: 1869-1876, 1995.
162. Duffy DM and Stouffer RL. Gonadotropin versus steroid regulation of the corpus luteum of the rhesus monkey during simulated early pregnancy. *Biol Reprod* 57: 1451-1460, 1997.
163. Duffy DM and Stouffer RL. Gonadotropin versus steroid regulation of the corpus luteum of the rhesus monkey during simulated early pregnancy. *Biol Reprod* 57: 1451-1460, 1997.
164. Duffy DM, Wells TR, Haluska GJ and Stouffer RL. The ratio of progesterone receptor isoforms changes in the monkey corpus luteum during the luteal phase of the menstrual cycle. *Biol Reprod* 57: 693-699, 1997.
165. Duffy DM, Wells TR, Haluska GJ and Stouffer RL. The ratio of progesterone receptor isoforms changes in the monkey corpus luteum during the luteal phase of the menstrual cycle. *Biol Reprod* 57: 693-699, 1997.
166. Duncan WC, Illingworth PJ and Fraser HM. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in the primate ovary during induced luteal regression. *J Endocrinol* 151: 203-213, 1996.
167. Eggan K, Jurga S, Gosden R, Min IM and Wagers AJ. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature* 441: 1109-1114, 2006.
168. el-Fouly MA, Cook B, Nekola M and Nalbandov AV. Role of the ovum in follicular luteinization. *Endocrinology* 87: 286-293, 1970.
169. Enders AC. Cytology of the corpus luteum. *Biol Reprod* 8: 158-182, 1973.
170. Endo T, Aten RF, Wang F and Behrman HR. Coordinate induction and activation of metalloproteinase and ascorbate depletion in structural luteolysis. *Endocrinology* 133: 690-698, 1993.
171. Endo T, Kiya T, Kitajima Y, Honnma H, Chida M, Hayashi T, Henmi H, Yamazaki K, Hayashi T, Manase K and Kudo R. Identical changes in Bax expression, but not Fas ligand expression, occur in structural luteolysis in gonadotropin releasing hormone agonist- and prolactin-treated superovulated rats. *Life Sci* 76: 2159-2169, 2005.
172. Eppig JJ, Chesnel F, Hirao Y, O'Brien MJ, Pendola FL, Watanabe S and Wigglesworth K. Oocyte control of granulosa cell development: how and why. *Hum Reprod* 12: 127-132, 1997.
173. Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola F and Hirao Y. Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biol Reprod* 56: 976-984, 1997.
174. Espey LL, Ujioka T, Russell DL, Skelsey M, Vladu B, Robker RL, Okamura H and Richards JS. Induction of early growth response protein-1 gene expression in the rat ovary in response to an ovulatory dose of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 141: 2385-2391, 2000.
175. Fairchild DL and Pate JL. Modulation of bovine luteal cell synthetic capacity by interferon-gamma. *Biol Reprod* 44: 357-363, 1991.
176. Fairchild DL and Pate JL. Modulation of bovine luteal cell synthetic capacity by interferon-gamma. *Biol Reprod* 44: 357-363, 1991.
177. Fairchild DL and Pate JL. Modulation of bovine luteal cell synthetic capacity by interferon-gamma. *Biol Reprod* 44: 357-363, 1991.
178. Faria TN, Deb S, Kwok SC, Talamantes F and Soares MJ. Ontogeny of placental lactogen-I and placental lactogen-II expression in the developing rat placenta. *Dev Biol* 141: 279-291, 1990.

179. Faria TN, Deb S, Kwok SC, Talamantes F and Soares MJ. Ontogeny of placental lactogen-I and placental lactogen-II expression in the developing rat placenta. *Dev Biol* 141: 279-291, 1990.
180. Farin CE, Sawyer HR and Niswender GD. Analysis of cell types in the corpus luteum of the sheep. *J Reprod Fertil Suppl* 37: 181-187, 1989.
181. Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ and Schwall RH. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med* 4: 336-340, 1998.
182. Finn CA and Booth JE. The physiological effects of estrogens and progesterone. In: *The ovary*, edited by Zucherman S and Weir BJ. New York/London: Academic Press, 1977, p. 151-225.
183. Flores JA, Aguirre C, Sharma OP and Veldhuis JD. Luteinizing hormone (LH) stimulates both intracellular calcium ion ([Ca²⁺]_i) mobilization and transmembrane cation influx in single ovarian (granulosa) cells: recruitment as a cellular mechanism of LH-[Ca²⁺]_i dose response. *Endocrinology* 139: 3606-3612, 1998.
184. Fortune JE and Armstrong DT. Androgen production by theca and granulosa isolated from proestrous rat follicles. *Endocrinology* 100: 1341-1347, 1977.
185. Fraenkel L. Die function des corpus luteum. *Arch Gynaekol* 68: 438-545, 1903.
186. Fraenkel L and Cohn F. Experimentelle untersuchungen uber den einfluss des corpus luteum auf de insertion des eies. *Anat Anz* 20: 294-300, 1901.
187. Fraser HM, Bell J, Wilson H, Taylor PD, Morgan K, Anderson RA and Duncan WC. Localization and quantification of cyclic changes in the expression of endocrine gland vascular endothelial growth factor in the human corpus luteum. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 427-434, 2005.
188. Fraser HM, Dickson SE, Lunn SF, Wulff C, Morris KD, Carroll VA and Bicknell R. Suppression of luteal angiogenesis in the primate after neutralization of vascular endothelial growth factor. *Endocrinology* 141: 995-1000, 2000.
189. Fraser HM, Lunn SF, Cowen GM and Illingworth PJ. Induced luteal regression in the primate: evidence for apoptosis and changes in c-myc protein. *J Endocrinol* 147: 131-137, 1995.
190. Fraser HM, Lunn SF, Cowen GM and Illingworth PJ. Induced luteal regression in the primate: evidence for apoptosis and changes in c-myc protein. *J Endocrinol* 147: 131-137, 1995.
191. Fraser HM, Lunn SF, Harrison DJ and Kerr JB. Luteal regression in the primate: different forms of cell death during natural and gonadotropin-releasing hormone antagonist or prostaglandin analogue-induced luteolysis. *Biol Reprod* 61: 1468-1479, 1999.
192. Fraser HM, Lunn SF, Harrison DJ and Kerr JB. Luteal regression in the primate: different forms of cell death during natural and gonadotropin-releasing hormone antagonist or prostaglandin analogue-induced luteolysis. *Biol Reprod* 61: 1468-1479, 1999.
193. Fraser HM, Lunn SF, Harrison DJ and Kerr JB. Luteal regression in the primate: different forms of cell death during natural and gonadotropin-releasing hormone antagonist or prostaglandin analogue-induced luteolysis. *Biol Reprod* 61: 1468-1479, 1999.
194. Frasier J, Park K, Byers M, Telleria C, Kitamura T, Yu-Lee LY, Djiane J, Park-Sarge OK and Gibori G. Differential roles for signal transducers and activators of transcription 5a and 5b in PRL stimulation of ERalpha and ERbeta transcription. *Mol Endocrinol* 15: 2172-2181, 2001.
195. Freeman ME. The Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle in the rat. In: *The Physiology of Reproduction*, edited by Knobil E and Neill JD. New York: Raven Press, 1994, p. 613-658.
196. Freeman ME and Neill JD. The pattern of prolactin secretion during pseudopregnancy in the rat: a daily nocturnal surge. *Endocrinology* 90: 1292-1294, 1972.

197. Friedman A, Weiss S, Levy N and Meidan R. Role of tumor necrosis factor alpha and its type I receptor in luteal regression: induction of programmed cell death in bovine corpus luteum-derived endothelial cells. *Biol Reprod* 63: 1905-1912, 2000.
198. Friedman A, Weiss S, Levy N and Meidan R. Role of tumor necrosis factor alpha and its type I receptor in luteal regression: induction of programmed cell death in bovine corpus luteum-derived endothelial cells. *Biol Reprod* 63: 1905-1912, 2000.
199. Friedman A, Weiss S, Levy N and Meidan R. Role of tumor necrosis factor alpha and its type I receptor in luteal regression: induction of programmed cell death in bovine corpus luteum-derived endothelial cells. *Biol Reprod* 63: 1905-1912, 2000.
200. Friedman A, Weiss S, Levy N and Meidan R. Role of tumor necrosis factor alpha and its type I receptor in luteal regression: induction of programmed cell death in bovine corpus luteum-derived endothelial cells. *Biol Reprod* 63: 1905-1912, 2000.
201. Friedman A, Weiss S, Levy N and Meidan R. Role of tumor necrosis factor alpha and its type I receptor in luteal regression: induction of programmed cell death in bovine corpus luteum-derived endothelial cells. *Biol Reprod* 63: 1905-1912, 2000.
202. Fuchs A and Fields M. Nonhuman mammals parturition. In: Encyclopedia of Reproduction, edited by Knobil E and Neill JD. New York: Academic Press, 1999, p. 703-716.
203. Fukuoka M, Yasuda K, Fujiwara H, Kanzaki H and Mori T. Interactions between interferon gamma, tumour necrosis factor alpha, and interleukin-1 in modulating progesterone and oestradiol production by human luteinized granulosa cells in culture. *Hum Reprod* 7: 1361-1364, 1992.
204. Fukuoka M, Yasuda K, Fujiwara H, Kanzaki H and Mori T. Interactions between interferon gamma, tumour necrosis factor alpha, and interleukin-1 in modulating progesterone and oestradiol production by human luteinized granulosa cells in culture. *Hum Reprod* 7: 1361-1364, 1992.
205. Gadsby J, Rose L, Sriperumbudur R and Ge Z. The role of intra-luteal factors in the control of the porcine corpus luteum. *Soc Reprod Fertil Suppl* 62: 69-83, 2006.
206. Gao H, Chen XL, Zhang ZH, Song XX, Hu ZY and Liu YX. IFN-gamma and TNF-alpha inhibit expression of TGF-beta-1, its receptors TBETAR-I and TBETAR-II in the corpus luteum of PMSG/hCG treated rhesus monkey. *Front Biosci* 10: 2496-2503, 2005.
207. Gaytan F, Bellido C, Morales C and Sanchez-Criado JE. Both prolactin and progesterone in proestrus are necessary for the induction of apoptosis in the regressing corpus luteum of the rat. *Biol Reprod* 59: 1200-1206, 1998.
208. Gaytan F, Bellido C, Morales C and Sanchez-Criado JE. Both prolactin and progesterone in proestrus are necessary for the induction of apoptosis in the regressing corpus luteum of the rat. *Biol Reprod* 59: 1200-1206, 1998.
209. Gaytan F, Bellido C, Morales C and Sanchez-Criado JE. Cyclic changes in the responsiveness of regressing corpora lutea to the luteolytic effects of prolactin in rats. *Reproduction* 122: 411-417, 2001.
210. Gaytan F, Bellido C, Morales C and Sanchez-Criado JE. Cyclic changes in the responsiveness of regressing corpora lutea to the luteolytic effects of prolactin in rats. *Reproduction* 122: 411-417, 2001.
211. Gaytan F, Bellido C, Morales C and Sanchez-Criado JE. Luteolytic effect of prolactin is dependent on the degree of differentiation of luteal cells in the rat. *Biol Reprod* 65: 433-441, 2001.
212. Gaytan F, Bellido C, Morales C and Sanchez-Criado JE. Luteolytic effect of prolactin is dependent on the degree of differentiation of luteal cells in the rat. *Biol Reprod* 65: 433-441, 2001.

213. Gaytan F, Morales C, Bellido C, Aguilar E and Sanchez-Criado JE. Role of prolactin in the regulation of macrophages and in the proliferative activity of vascular cells in newly formed and regressing rat corpora lutea. *Biol Reprod* 57: 478-486, 1997.
214. Gaytan F, Morales C, Bellido C, Aguilar R, Millan Y, Martin De Las MJ and Sanchez-Criado JE. Progesterone on an oestrogen background enhances prolactin-induced apoptosis in regressing corpora lutea in the cyclic rat: possible involvement of luteal endothelial cell progesterone receptors. *J Endocrinol* 165: 715-724, 2000.
215. Gaytan F, Morales C, Bellido C, Aguilar R, Millan Y, Martin De Las MJ and Sanchez-Criado JE. Progesterone on an oestrogen background enhances prolactin-induced apoptosis in regressing corpora lutea in the cyclic rat: possible involvement of luteal endothelial cell progesterone receptors. *J Endocrinol* 165: 715-724, 2000.
216. Gaytan F, Morales C, Bellido C, Aguilar R, Millan Y, Martin De Las MJ and Sanchez-Criado JE. Progesterone on an oestrogen background enhances prolactin-induced apoptosis in regressing corpora lutea in the cyclic rat: possible involvement of luteal endothelial cell progesterone receptors. *J Endocrinol* 165: 715-724, 2000.
217. Gaytan F, Morales C, Bellido C, Aguilar R, Millan Y, Martin De Las MJ and Sanchez-Criado JE. Progesterone on an oestrogen background enhances prolactin-induced apoptosis in regressing corpora lutea in the cyclic rat: possible involvement of luteal endothelial cell progesterone receptors. *J Endocrinol* 165: 715-724, 2000.
218. Gaytan F, Morales C, Bellido C, Aguilar R, Millan Y, Martin De Las MJ and Sanchez-Criado JE. Progesterone on an oestrogen background enhances prolactin-induced apoptosis in regressing corpora lutea in the cyclic rat: possible involvement of luteal endothelial cell progesterone receptors. *J Endocrinol* 165: 715-724, 2000.
219. Gaytan F, Morales C, Garcia-Pardo L, Reymundo C, Bellido C and Sanchez-Criado JE. Macrophages, cell proliferation, and cell death in the human menstrual corpus luteum. *Biol Reprod* 59: 417-425, 1998.
220. Gaytan F, Morales C, Garcia-Pardo L, Reymundo C, Bellido C and Sanchez-Criado JE. Macrophages, cell proliferation, and cell death in the human menstrual corpus luteum. *Biol Reprod* 59: 417-425, 1998.
221. Gaytan F, Morales C, Garcia-Pardo L, Reymundo C, Bellido C and Sanchez-Criado JE. Macrophages, cell proliferation, and cell death in the human menstrual corpus luteum. *Biol Reprod* 59: 417-425, 1998.
222. Gaytan F, Morales C, Garcia-Pardo L, Reymundo C, Bellido C and Sanchez-Criado JE. Macrophages, cell proliferation, and cell death in the human menstrual corpus luteum. *Biol Reprod* 59: 417-425, 1998.
223. Ghersevich S, Nokelainen P, Poutanen M, Orava M, Autio-Harmanen H, Rajaniemi H and Vihko R. Rat 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: primary structure and regulation of enzyme expression in rat ovary by diethylstilbestrol and gonadotropins in vivo. *Endocrinology* 135: 1477-1487, 1994.
224. Ghersevich S, Poutanen M, Tapanainen J and Vihko R. Hormonal regulation of rat 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in cultured rat granulosa cells: effects of recombinant follicle-stimulating hormone, estrogens, androgens, and epidermal growth factor. *Endocrinology* 135: 1963-1971, 1994.
225. Ghersevich SA, Poutanen MH, Rajaniemi HJ and Vihko RK. Expression of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat ovary during follicular development and luteinization induced with pregnant mare serum gonadotrophin and human chorionic gonadotrophin. *J Endocrinol* 140: 409-417, 1994.
226. Ghersevich SA, Poutanen MH, Rajaniemi HJ and Vihko RK. Expression of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat ovary during follicular development and luteinization induced with pregnant mare serum gonadotrophin and human chorionic gonadotrophin. *J Endocrinol* 140: 409-417, 1994.

227. Gibori G, Chen YD, Khan I, Azhar S and Reaven GM. Regulation of luteal cell lipoprotein receptors, sterol contents, and steroidogenesis by estradiol in the pregnant rat. *Endocrinology* 114: 609-617, 1984.
228. Gibori G and Keyes PL. Luteotropic role of estrogen in early pregnancy in the rat. *Endocrinology* 106: 1584-1588, 1980.
229. Gibori G and Keyes PL. Luteotropic role of estrogen in early pregnancy in the rat. *Endocrinology* 106: 1584-1588, 1980.
230. Gibori G, Khan I, Warshaw ML, McLean MP, Puryear TK, Nelson S, Durkee TJ, Azhar S, Steinschneider A and Rao MC. Placental-derived regulators and the complex control of luteal cell function. *Recent Prog Horm Res* 44: 377-429, 1988.
231. Gibori G, Sridaran R and Basuray R. Control of aromatase activity in luteal and ovarian nonluteal tissue of pregnant rats. *Endocrinology* 111: 781-788, 1982.
232. Gillies RJ, Martinez R, Sneider JM and Hoyer PB. Sphingosine inhibits phorbol 12-myristate 13-acetate-, but not serum-induced, activation of Na⁺/H⁺ exchange in mammalian cells. *J Cell Physiol* 139: 125-130, 1989.
233. Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO and Beg MA. Effect of prostaglandin F2alpha on ovarian, adrenal, and pituitary hormones and on luteal blood flow in mares. *Domest Anim Endocrinol* 32: 315-328, 2007.
234. Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Utt MD and Beg MA. Luteal blood flow and progesterone production in mares. *Anim Reprod Sci* 99: 213-220, 2007.
235. Ginther OJ, Silva LA, Araujo RR and Beg MA. Temporal associations among pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF2alpha, luteal blood flow, and luteolysis in cattle. *Biol Reprod* 76: 506-513, 2007.
236. Girsh E and Dekel N. Involvement of endothelin-1 and its receptors in PGF2alpha-induced luteolysis in the rat. *Mol Reprod Dev* 63: 71-78, 2002.
237. Girsh E, Milvae RA, Wang W and Meidan R. Effect of endothelin-1 on bovine luteal cell function: role in prostaglandin F2alpha-induced antisteroidogenic action. *Endocrinology* 137: 1306-1312, 1996.
238. Girsh E, Milvae RA, Wang W and Meidan R. Effect of endothelin-1 on bovine luteal cell function: role in prostaglandin F2alpha-induced antisteroidogenic action. *Endocrinology* 137: 1306-1312, 1996.
239. Girsh E, Wang W, Mamluk R, Arditi F, Friedman A, Milvae RA and Meidan R. Regulation of endothelin-1 expression in the bovine corpus luteum: elevation by prostaglandin F 2 alpha. *Endocrinology* 137: 5191-5196, 1996.
240. Gobbetti A, Boiti C, Canali C and Zerani M. Nitric oxide synthase acutely regulates progesterone production by in vitro cultured rabbit corpora lutea. *J Endocrinol* 160: 275-283, 1999.
241. Golander A, Hurley T, Barrett J, Hizi A and Handwerger S. Prolactin synthesis by human chorion-decidual tissue: a possible source of prolactin in the amniotic fluid. *Science* 202: 311-313, 1978.
242. Goldenberg RL, Vaitukaitis JL and Ross GT. Estrogen and follicle stimulation hormone interactions on follicle growth in rats. *Endocrinology* 90: 1492-1498, 1972.
243. Goldring NB, Durica JM, Lifka J, Hedin L, Ratoosh SL, Miller WL, Orly J and Richards JS. Cholesterol side-chain cleavage P450 messenger ribonucleic acid: evidence for hormonal regulation in rat ovarian follicles and constitutive expression in corpora lutea. *Endocrinology* 120: 1942-1950, 1987.
244. Goldring NB, Durica JM, Lifka J, Hedin L, Ratoosh SL, Miller WL, Orly J and Richards JS. Cholesterol side-chain cleavage P450 messenger ribonucleic acid: evidence for hormonal

- regulation in rat ovarian follicles and constitutive expression in corpora lutea. *Endocrinology* 120: 1942-1950, 1987.
245. Gonzalez-Robayna JJ, Alliston TN, Buse P, Firestone GL and Richards JS. Functional and subcellular changes in the A-kinase-signaling pathway: relation to aromatase and Sgk expression during the transition of granulosa cells to luteal cells. *Mol Endocrinol* 13: 1318-1337, 1999.
 246. Goodman SB, Kugu K, Chen SH, Preutthipan S, Tilly KI, Tilly JL and Dharmarajan AM. Estradiol-mediated suppression of apoptosis in the rabbit corpus luteum is associated with a shift in expression of bcl-2 family members favoring cellular survival. *Biol Reprod* 59: 820-827, 1998.
 247. Goodman SB, Kugu K, Chen SH, Preutthipan S, Tilly KI, Tilly JL and Dharmarajan AM. Estradiol-mediated suppression of apoptosis in the rabbit corpus luteum is associated with a shift in expression of bcl-2 family members favoring cellular survival. *Biol Reprod* 59: 820-827, 1998.
 248. Goodsaid-Zalduondo F, Rintoul DA, Carlson JC and Hansel W. Luteolysis-induced changes in phase composition and fluidity of bovine luteal cell membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 4332-4336, 1982.
 249. Gordon WL and Sherwood OD. Evidence that luteinizing hormone from the maternal pituitary gland may promote antepartum release of relaxin, luteolysis, and birth in rats. *Endocrinology* 111: 1299-1310, 1982.
 250. Goto T, Endo T, Henmi H, Kitajima Y, Kiya T, Nishikawa A, Manase K, Sato H and Kudo R. Gonadotropin-releasing hormone agonist has the ability to induce increased matrix metalloproteinase (MMP)-2 and membrane type 1-MMP expression in corpora lutea, and structural luteolysis in rats. *J Endocrinol* 161: 393-402, 1999.
 251. Goyeneche AA, Calvo V, Gibori G and Telleria CM. Androstenedione interferes in luteal regression by inhibiting apoptosis and stimulating progesterone production. *Biol Reprod* 66: 1540-1547, 2002.
 252. Goyeneche AA, Deis RP, Gibori G and Telleria CM. Progesterone promotes survival of the rat corpus luteum in the absence of cognate receptors. *Biol Reprod* 68: 151-158, 2003.
 253. Goyeneche AA, Deis RP, Gibori G and Telleria CM. Progesterone promotes survival of the rat corpus luteum in the absence of cognate receptors. *Biol Reprod* 68: 151-158, 2003.
 254. Goyeneche AA, Harmon JM and Telleria CM. Cell death induced by serum deprivation in luteal cells involves the intrinsic pathway of apoptosis. *Reproduction* 131: 103-111, 2006.
 255. Goyeneche AA, Martinez IL, Deis RP, Gibori G and Telleria CM. In vivo hormonal environment leads to differential susceptibility of the corpus luteum to apoptosis in vitro. *Biol Reprod* 68: 2322-2330, 2003.
 256. Goyeneche AA, Martinez IL, Deis RP, Gibori G and Telleria CM. In vivo hormonal environment leads to differential susceptibility of the corpus luteum to apoptosis in vitro. *Biol Reprod* 68: 2322-2330, 2003.
 257. Greenwald GS. Hormonal changes associated with estrogen induced luteolysis in the pregnant hamster: a reevaluation of the luteotropic complex. *Proc Soc Exp Biol Med* 181: 284-288, 1986.
 258. Gudermann T, Birnbaumer M and Birnbaumer L. Evidence for dual coupling of the murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and Ca²⁺ mobilization. Studies with the cloned murine luteinizing hormone receptor expressed in L cells. *J Biol Chem* 267: 4479-4488, 1992.
 259. Guo K, Wolf V, Dharmarajan AM, Feng Z, Bielke W, Saurer S and Friis R. Apoptosis-associated gene expression in the corpus luteum of the rat. *Biol Reprod* 58: 739-746, 1998.
 260. Guo K, Wolf V, Dharmarajan AM, Feng Z, Bielke W, Saurer S and Friis R. Apoptosis-associated gene expression in the corpus luteum of the rat. *Biol Reprod* 58: 739-746, 1998.

261. Guo Y, Srinivasula SM, Druilhe A, Fernandes-Alnemri T and Alnemri ES. Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J Biol Chem* 277: 13430-13437, 2002.
262. Guo Y, Srinivasula SM, Druilhe A, Fernandes-Alnemri T and Alnemri ES. Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J Biol Chem* 277: 13430-13437, 2002.
263. Gupta S. Molecular steps of tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis. *Curr Mol Med* 1: 317-324, 2001.
264. Hampl A, Pachernik J and Dvorak P. Levels and interactions of p27, cyclin D3, and CDK4 during the formation and maintenance of the corpus luteum in mice. *Biol Reprod* 62: 1393-1401, 2000.
265. Hartmann M and Wettstein A. Zur Kenntnis der corpusluteum hormone (2. Mitteilung). *Helv Chem Acta* 17: 1365-1370, 1934.
266. Hasumoto K, Sugimoto Y, Yamasaki A, Morimoto K, Kakizuka A, Negishi M and Ichikawa A. Association of expression of mRNA encoding the PGF2 alpha receptor with luteal cell apoptosis in ovaries of pseudopregnant mice. *J Reprod Fertil* 109: 45-51, 1997.
267. Hasumoto K, Sugimoto Y, Yamasaki A, Morimoto K, Kakizuka A, Negishi M and Ichikawa A. Association of expression of mRNA encoding the PGF2 alpha receptor with luteal cell apoptosis in ovaries of pseudopregnant mice. *J Reprod Fertil* 109: 45-51, 1997.
268. Hazzard TM and Stouffer RL. Angiogenesis in ovarian follicular and luteal development. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 14: 883-900, 2000.
269. Hearn JP. The embryo-maternal dialogue during early pregnancy in primates. *J Reprod Fertil* 76: 809-819, 1986.
270. Hedin L, Rodgers RJ, Simpson ER and Richards JS. Changes in content of cytochrome P450(17)alpha, cytochrome P450scc, and 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in developing rat ovarian follicles and corpora lutea: correlation with theca cell steroidogenesis. *Biol Reprod* 37: 211-223, 1987.
271. Hehnke KE, Christenson LK, Ford SP and Taylor M. Macrophage infiltration into the porcine corpus luteum during prostaglandin F2 alpha-induced luteolysis. *Biol Reprod* 50: 10-15, 1994.
272. Hehnke-Vagnoni KE, Clark CL, Taylor MJ and Ford SP. Presence and localization of tumor necrosis factor alpha in the corpus luteum of nonpregnant and pregnant pigs. *Biol Reprod* 53: 1339-1344, 1995.
273. Hehnke-Vagnoni KE, Clark CL, Taylor MJ and Ford SP. Presence and localization of tumor necrosis factor alpha in the corpus luteum of nonpregnant and pregnant pigs. *Biol Reprod* 53: 1339-1344, 1995.
274. Hickey GJ, Oonk RB, Hall PF and Richards JS. Aromatase cytochrome P450 and cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 in corpora lutea of pregnant rats: diverse regulation by peptide and steroid hormones. *Endocrinology* 125: 1673-1682, 1989.
275. Hickey GJ, Oonk RB, Hall PF and Richards JS. Aromatase cytochrome P450 and cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 in corpora lutea of pregnant rats: diverse regulation by peptide and steroid hormones. *Endocrinology* 125: 1673-1682, 1989.
276. Hickey GJ, Oonk RB, Hall PF and Richards JS. Aromatase cytochrome P450 and cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 in corpora lutea of pregnant rats: diverse regulation by peptide and steroid hormones. *Endocrinology* 125: 1673-1682, 1989.
277. Hickey GJ, Oonk RB, Hall PF and Richards JS. Aromatase cytochrome P450 and cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 in corpora lutea of pregnant rats: diverse regulation by peptide and steroid hormones. *Endocrinology* 125: 1673-1682, 1989.

278. Hild-Petito S, Stouffer RL and Brenner RM. Immunocytochemical localization of estradiol and progesterone receptors in the monkey ovary throughout the menstrual cycle. *Endocrinology* 123: 2896-2905, 1988.
279. Hild-Petito S, Stouffer RL and Brenner RM. Immunocytochemical localization of estradiol and progesterone receptors in the monkey ovary throughout the menstrual cycle. *Endocrinology* 123: 2896-2905, 1988.
280. Hillier SG, van den Boogaard AM, Reichert LE, Jr. and van Hall EV. Alterations in granulosa cell aromatase activity accompanying preovulatory follicular development in the rat ovary with evidence that 5alpha-reduced C19 steroids inhibit the aromatase reaction in vitro. *J Endocrinol* 84: 409-419, 1980.
281. Hodgen GD and Istkovitz J. Recognition and maintenance of pregnancy. In: *The Physiology of Reproduction*, edited by Knobil E and Neill JD. New York: Raven Press, 1988.
282. Hoyer PB and Marion SL. Influence of agents that affect intracellular calcium regulation on progesterone secretion in small and large luteal cells of the sheep. *J Reprod Fertil* 86: 445-455, 1989.
283. Hoyer PB and Marion SL. Influence of agents that affect intracellular calcium regulation on progesterone secretion in small and large luteal cells of the sheep. *J Reprod Fertil* 86: 445-455, 1989.
284. Hsieh M, Johnson MA, Greenberg NM and Richards JS. Regulated expression of Wnts and Frizzleds at specific stages of follicular development in the rodent ovary. *Endocrinology* 143: 898-908, 2002.
285. Hsu SY and Hsueh AJ. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm. *Physiol Rev* 80: 593-614, 2000.
286. Hsueh AJ, Adashi EY, Jones PB and Welsh TH, Jr. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev* 5: 76-127, 1984.
287. Hsueh AJ, Billig H and Tsafiriri A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev* 15: 707-724, 1994.
288. Hsueh AJ, Billig H and Tsafiriri A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev* 15: 707-724, 1994.
289. Hsueh AJ and Jones PB. Gonadotropin releasing hormone: extrapituitary actions and paracrine control mechanisms. *Annu Rev Physiol* 45: 83-94, 1983.
290. Hsueh AJ, McGee EA, Hayashi M and Hsu SY. Hormonal regulation of early follicle development in the rat ovary. *Mol Cell Endocrinol* 163: 95-100, 2000.
291. Hsueh AJ, McGee EA, Hayashi M and Hsu SY. Hormonal regulation of early follicle development in the rat ovary. *Mol Cell Endocrinol* 163: 95-100, 2000.
292. Hwang J and Menon KM. Characterization of low density and high density lipoprotein receptors in the rat corpus luteum and regulation by gonadotropin. *J Biol Chem* 258: 8020-8027, 1983.
293. Irusta G, Parborell F, Peluffo M, Manna PR, Gonzalez-Calvar SI, Calandra R, Stocco DM and Tesone M. Steroidogenic acute regulatory protein in ovarian follicles of gonadotropin-stimulated rats is regulated by a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol Reprod* 68: 1577-1583, 2003.
294. Irusta G, Parborell F, Peluffo M, Manna PR, Gonzalez-Calvar SI, Calandra R, Stocco DM and Tesone M. Steroidogenic acute regulatory protein in ovarian follicles of gonadotropin-stimulated rats is regulated by a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol Reprod* 68: 1577-1583, 2003.
295. Iwai M, Hasegawa M, Taii S, Sagawa N, Nakao K, Imura H, Nakanishi S and Mori T. Endothelins inhibit luteinization of cultured porcine granulosa cells. *Endocrinology* 129: 1909-1914, 1991.

296. Iwai T, Nanbu Y, Iwai M, Taii S, Fujii S and Mori T. Immunohistochemical localization of oestrogen receptors and progesterone receptors in the human ovary throughout the menstrual cycle. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 417: 369-375, 1990.
297. Jackson JA and Albrecht ED. The development of placental androstenedione and testosterone production and their utilization by the ovary for aromatization to estrogen during rat pregnancy. *Biol Reprod* 33: 451-457, 1985.
298. Janson O, Albrecht I and Ahren K. Effects of prostaglandin f2a on ovarian blood flow and vascular resistance in the pseudopregnant rabbit. *Acta Endocrinol (Copenh)* 79: 337-350, 1975.
299. Jaroszewski JJ and Hansel W. Intraluteal administration of a nitric oxide synthase blocker stimulates progesterone and oxytocin secretion and prolongs the life span of the bovine corpus luteum. *Proc Soc Exp Biol Med* 224: 50-55, 2000.
300. Jaroszewski JJ and Hansel W. Intraluteal administration of a nitric oxide synthase blocker stimulates progesterone and oxytocin secretion and prolongs the life span of the bovine corpus luteum. *Proc Soc Exp Biol Med* 224: 50-55, 2000.
301. Jaroszewski JJ, Skarzynski DJ and Hansel W. Nitric oxide as a local mediator of prostaglandin F2alpha-induced regression in bovine corpus luteum: an in vivo study. *Exp Biol Med (Maywood)* 228: 1057-1062, 2003.
302. Jo T, Terada N, Takauchi Y, Saji F, Nishizawa Y, Tanaka S and Kosaka H. Cytotoxic actions of cytokines on cultured mouse luteal cells are independent of nitric oxide. *J Steroid Biochem Mol Biol* 55: 291-296, 1995.
303. Jo T, Terada N, Takauchi Y, Saji F, Nishizawa Y, Tanaka S and Kosaka H. Cytotoxic actions of cytokines on cultured mouse luteal cells are independent of nitric oxide. *J Steroid Biochem Mol Biol* 55: 291-296, 1995.
304. Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, Lee HJ, Adams GB, Niikura Y, Tschudy KS, Tilly JC, Cortes ML, Forkert R, Spitzer T, Iacomini J, Scadden DT and Tilly JL. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell* 122: 303-315, 2005.
305. Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK and Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 428: 145-150, 2004.
306. Jones PB, Valk CA and Hsueh AJ. Regulation of progestin biosynthetic enzymes in cultured rat granulosa cells: effects of prolactin, beta 2-adrenergic agonist, human chorionic gonadotropin and gonadotropin releasing hormone. *Biol Reprod* 29: 572-585, 1983.
307. Juengel JL, Garverick HA, Johnson AL, Youngquist RS and Smith MF. Apoptosis during luteal regression in cattle. *Endocrinology* 132: 249-254, 1993.
308. Juengel JL, Garverick HA, Johnson AL, Youngquist RS and Smith MF. Apoptosis during luteal regression in cattle. *Endocrinology* 132: 249-254, 1993.
309. Kaltenbach CC, Cook B, Niswender GD and Nalbandov AV. Effect of pituitary hormones on progesterone synthesis by ovine luteal tissue in vitro. *Endocrinology* 81: 1407-1409, 1967.
310. Kawano T, Okamura H, Tajima C, Fukuma K and Katabuchi H. Effect of RU 486 on luteal function in the early pregnant rat. *J Reprod Fertil* 83: 279-285, 1988.
311. Kaynard AH, Periman LM, Simard J and Melner MH. Ovarian 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and sulfated glycoprotein-2 gene expression are differentially regulated by the induction of ovulation, pseudopregnancy, and luteolysis in the immature rat. *Endocrinology* 130: 2192-2200, 1992.
312. Kaynard AH, Periman LM, Simard J and Melner MH. Ovarian 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and sulfated glycoprotein-2 gene expression are differentially regulated by the induction of ovulation, pseudopregnancy, and luteolysis in the immature rat. *Endocrinology* 130: 2192-2200, 1992.

313. Kaynard AH, Periman LM, Simard J and Melner MH. Ovarian 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and sulfated glycoprotein-2 gene expression are differentially regulated by the induction of ovulation, pseudopregnancy, and luteolysis in the immature rat. *Endocrinology* 130: 2192-2200, 1992.
314. Kaynard AH, Periman LM, Simard J and Melner MH. Ovarian 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and sulfated glycoprotein-2 gene expression are differentially regulated by the induction of ovulation, pseudopregnancy, and luteolysis in the immature rat. *Endocrinology* 130: 2192-2200, 1992.
315. Khan I, Belanger A, Chen YD and Gibori G. Influence of high-density lipoprotein on estradiol stimulation of luteal steroidogenesis. *Biol Reprod* 32: 96-104, 1985.
316. Khan SM, Dauffenbach LM and Yeh J. Mitochondria and caspases in induced apoptosis in human luteinized granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 269: 542-545, 2000.
317. Khan SM, Dauffenbach LM and Yeh J. Mitochondria and caspases in induced apoptosis in human luteinized granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 269: 542-545, 2000.
318. Kiyokawa H, Kineman RD, Manova-Todorova KO, Soares VC, Hoffman ES, Ono M, Khanam D, Hayday AC, Frohman LA and Koff A. Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell* 85: 721-732, 1996.
319. Kiyokawa H, Kineman RD, Manova-Todorova KO, Soares VC, Hoffman ES, Ono M, Khanam D, Hayday AC, Frohman LA and Koff A. Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell* 85: 721-732, 1996.
320. Knobil E. On the Regulation of the Primate Corpus Luteum. *Biol Reprod* 8: 246-258, 1973.
321. Knobil E. On the control of gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Recent Prog Horm Res* 30: 1-46, 1974.
322. Komatsu K, Manabe N, Kiso M, Shimabe M and Miyamoto H. Changes in localization of immune cells and cytokines in corpora lutea during luteolysis in murine ovaries. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 296: 152-159, 2003.
323. Komatsu K, Manabe N, Kiso M, Shimabe M and Miyamoto H. Changes in localization of immune cells and cytokines in corpora lutea during luteolysis in murine ovaries. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 296: 152-159, 2003.
324. Kondo H, Maruo T, Peng X and Mochizuki M. Immunological evidence for the expression of the Fas antigen in the infant and adult human ovary during follicular regression and atresia. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 2702-2710, 1996.
325. Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE and Oltvai ZN. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol* 4: 327-332, 1993.
326. Korzekwa AJ, Okuda K, Woclawek-Potocka I, Murakami S and Skarzynski DJ. Nitric oxide induces apoptosis in bovine luteal cells. *J Reprod Dev* 52: 353-361, 2006.
327. Kraicer PF and Shelesnyak MC. Studies on the mechanism of nidation. IX. analysis of the responses to ergocornine--an inhibitor of nidation. *J Reprod Fertil* 8: 225-233, 1964.
328. Krajewska M, Wang HG, Krajewski S, Zapata JM, Shabaik A, Gascoyne R and Reed JC. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res* 57: 1605-1613, 1997.
329. Krasnow JS, Hickey GJ and Richards JS. Regulation of aromatase mRNA and estradiol biosynthesis in rat ovarian granulosa and luteal cells by prolactin. *Mol Endocrinol* 4: 13-12, 1990.
330. Kumar S, Kinoshita M, Noda M, Copeland NG and Jenkins NA. Induction of apoptosis by the mouse Nedd2 gene, which encodes a protein similar to the product of the *Caenorhabditis elegans* cell death gene ced-3 and the mammalian IL-1 beta-converting enzyme. *Genes Dev* 8: 1613-1626, 1994.

331. Kuranaga E, Kanuka H, Bannai M, Suzuki M, Nishihara M and Takahashi M. Fas/Fas ligand system in prolactin-induced apoptosis in rat corpus luteum: possible role of luteal immune cells. *Biochem Biophys Res Commun* 260: 167-173, 1999.
332. Kuranaga E, Kanuka H, Bannai M, Suzuki M, Nishihara M and Takahashi M. Fas/Fas ligand system in prolactin-induced apoptosis in rat corpus luteum: possible role of luteal immune cells. *Biochem Biophys Res Commun* 260: 167-173, 1999.
333. Kuranaga E, Kanuka H, Furuhashi Y, Yonezawa T, Suzuki M, Nishihara M and Takahashi M. Requirement of the Fas ligand-expressing luteal immune cells for regression of corpus luteum. *FEBS Lett* 472: 137-142, 2000.
334. Kuranaga E, Kanuka H, Furuhashi Y, Yonezawa T, Suzuki M, Nishihara M and Takahashi M. Requirement of the Fas ligand-expressing luteal immune cells for regression of corpus luteum. *FEBS Lett* 472: 137-142, 2000.
335. Kuranaga E, Kanuka H, Hirabayashi K, Suzuki M, Nishihara M and Takahashi M. Progesterone is a cell death suppressor that downregulates Fas expression in rat corpus luteum. *FEBS Lett* 466: 279-282, 2000.
336. Lahav M, Lamprecht SA, Amsterdam A and Lindner HR. Suppression of 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity in cultured rat luteal cells by prolactin. *Mol Cell Endocrinol* 6: 293-302, 1977.
337. Lahav M, Lamprecht SA, Amsterdam A and Lindner HR. Suppression of 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity in cultured rat luteal cells by prolactin. *Mol Cell Endocrinol* 6: 293-302, 1977.
338. Lamprecht SA, Lindner HR and Strauss JF, III. Induction of 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in rat corpora lutea by pharmacological blockade of pituitary prolactin secretion. *Biochim Biophys Acta* 187: 133-143, 1969.
339. Lamprecht SA, Lindner HR and Strauss JF, III. Induction of 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in rat corpora lutea by pharmacological blockade of pituitary prolactin secretion. *Biochim Biophys Acta* 187: 133-143, 1969.
340. Landschulz KT, Pathak RK, Rigotti A, Krieger M and Hobbs HH. Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J Clin Invest* 98: 984-995, 1996.
341. Lavrik IN, Golks A and Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 115: 2665-2672, 2005.
342. LeCouter J, Lin R and Ferrara N. Endocrine gland-derived VEGF and the emerging hypothesis of organ-specific regulation of angiogenesis. *Nat Med* 8: 913-917, 2002.
343. Lee A, Christenson LK, Patton PE, Burry KA and Stouffer RL. Vascular endothelial growth factor production by human luteinized granulosa cells in vitro. *Hum Reprod* 12: 2756-2761, 1997.
344. Lee PS, Buchan AM, Hsueh AJ, Yuen BH and Leung PC. Intracellular calcium mobilization in response to the activation of human wild-type and chimeric gonadotropin receptors. *Endocrinology* 143: 1732-1740, 2002.
345. LeMaire WJ, Leidner R and Marsh JM. Pre and post ovulatory changes in the concentration of prostaglandins in rat graafian follicles. *Prostaglandins* 9: 221-229, 1975.
346. Levy N, Kobayashi S, Roth Z, Wolfenson D, Miyamoto A and Meidan R. Administration of prostaglandin f(2 alpha) during the early bovine luteal phase does not alter the expression of ET-1 and of its type A receptor: a possible cause for corpus luteum refractoriness. *Biol Reprod* 63: 377-382, 2000.
347. Levy N, Kobayashi S, Roth Z, Wolfenson D, Miyamoto A and Meidan R. Administration of prostaglandin f(2 alpha) during the early bovine luteal phase does not alter the expression of ET-1

- and of its type A receptor: a possible cause for corpus luteum refractoriness. *Biol Reprod* 63: 377-382, 2000.
348. Li X, Peegel H and Menon KM. In situ hybridization of high density lipoprotein (scavenger, type 1) receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) during folliculogenesis and luteinization: evidence for mRNA expression and induction by human chorionic gonadotropin specifically in cell types that use cholesterol for steroidogenesis. *Endocrinology* 139: 3043-3049, 1998.
 349. Lin D, Sugawara T, Strauss JF, III, Clark BJ, Stocco DM, Saenger P, Rogol A and Miller WL. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science* 267: 1828-1831, 1995.
 350. Linzer DI and Fisher SJ. The placenta and the prolactin family of hormones: regulation of the physiology of pregnancy. *Mol Endocrinol* 13: 837-840, 1999.
 351. Liu K, Olofsson JI, Wahlberg P and Ny T. Distinct expression of gelatinase A [matrix metalloproteinase (MMP)-2], collagenase-3 (MMP-13), membrane type MMP 1 (MMP-14), and tissue inhibitor of MMPs type 1 mediated by physiological signals during formation and regression of the rat corpus luteum. *Endocrinology* 140: 5330-5338, 1999.
 352. Liu Y, Wu C, Lyu Q, Yang D, Albertini DF, Keefe DL and Liu L. Germline stem cells and neo-oogenesis in the adult human ovary. *Dev Biol* 306: 112-120, 2007.
 353. Loeb L. The effect of extirpation of the uterus on the life and function of the corpus luteum in the guinea pig. *Proc Soc Exp Biol Med* 20: 441-446, 1923.
 354. Los M, Wesselborg S and Schulze-Osthoff K. The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity* 10: 629-639, 1999.
 355. Los M, Wesselborg S and Schulze-Osthoff K. The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity* 10: 629-639, 1999.
 356. Luciano AA, Maslar IA, Kusmik WF and Riddick DH. Stimulatory activity of serum on prolactin production by human decidua. *Am J Obstet Gynecol* 138: 665-669, 1980.
 357. M de Fátima Horta, J Dig and E Young. Apoptosis. Cuando la célula programa su muerte. *Ciencia Hoy* 9 n° 53: 1999.
 358. Maekawa A. Pathology of tumours in laboratory animals. Tumours of the rat. Tumours of the ovary. *IARC Sci Publ* 473-497, 1990.
 359. Magnus V. Ovariets betydning for svangerskabet med saerligt hensyn til corpus luteum. *Nor Mag Laegevidensk* 62: 1138-1145, 1901.
 360. Maillet G, Breard E, Benhaim A, Leymarie P and Feral C. Hormonal regulation of apoptosis in rabbit granulosa cells in vitro: evaluation by flow cytometric detection of plasma membrane phosphatidylserine externalization. *Reproduction* 123: 243-251, 2002.
 361. Maizels ET, Mukherjee A, Sithanandam G, Peters CA, Cottom J, Mayo KE and Hunzicker-Dunn M. Developmental regulation of mitogen-activated protein kinase-activated kinases-2 and -3 (MAPKAPK-2/-3) in vivo during corpus luteum formation in the rat. *Mol Endocrinol* 15: 716-733, 2001.
 362. Malpighi M. *De Structura Glandarum Conglobatarum*. London: Apud Richardum Chiswell, 1689.
 363. Malven PV. Luteotrophic and luteolytic responses to prolactin in hypophysectomized rats. *Endocrinology* 84: 1224-1229, 1969.
 364. Malven PV. Luteotrophic and luteolytic responses to prolactin in hypophysectomized rats. *Endocrinology* 84: 1224-1229, 1969.
 365. Malven PV. Luteotrophic and luteolytic responses to prolactin in hypophysectomized rats. *Endocrinology* 84: 1224-1229, 1969.

366. Malven PV, Cousar GJ and Row EH. Structural luteolysis in hypophysectomized rats. *Am J Physiol* 216: 421-424, 1969.
367. Malven PV and Sawyer CH. A luteolytic action of prolactin in hypophysectomized rats. *Endocrinology* 79: 268-274, 1966.
368. Mamane Y, Heylbroeck C, Genin P, Algarte M, Servant MJ, LePage C, DeLuca C, Kwon H, Lin R and Hiscott J. Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene* 237: 1-14, 1999.
369. Martel C, Gagne D, Couet J, Labrie Y, Simard J and Labrie F. Rapid modulation of ovarian 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase gene expression by prolactin and human chorionic gonadotropin in the hypophysectomized rat. *Mol Cell Endocrinol* 99: 63-71, 1994.
370. Martel C, Labrie C, Dupont E, Couet J, Trudel C, Rheume E, Simard J, Luu-The V, Pelletier G and Labrie F. Regulation of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase expression and activity in the hypophysectomized rat ovary: interactions between the stimulatory effect of human chorionic gonadotropin and the luteolytic effect of prolactin. *Endocrinology* 127: 2726-2737, 1990.
371. Matikainen T., Perez G.I., Zheng T.S., Kluzak T.R., Rueda BR, Flavell R.A. and Tilly JL. Caspase-3 gene knockout defines cell lineage specificity for programmed cell death signaling in the ovary. *Endocrinology* 142: 2468-2480, 2001.
372. Matsuyama S, Chang KT, Kanuka H, Ohnishi M, Ikeda A, Nishihara M and Takahashi M. Occurrence of deoxyribonucleic acid fragmentation during prolactin-induced structural luteolysis in cycling rats. *Biol Reprod* 54: 1245-1251, 1996.
373. Matsuyama S, Chang KT, Kanuka H, Ohnishi M, Ikeda A, Nishihara M and Takahashi M. Occurrence of deoxyribonucleic acid fragmentation during prolactin-induced structural luteolysis in cycling rats. *Biol Reprod* 54: 1245-1251, 1996.
374. Matsuyama S, Chang KT, Kanuka H, Ohnishi M, Ikeda A, Nishihara M and Takahashi M. Occurrence of deoxyribonucleic acid fragmentation during prolactin-induced structural luteolysis in cycling rats. *Biol Reprod* 54: 1245-1251, 1996.
375. Matsuyama S, Chang KT, Kanuka H, Ohnishi M, Ikeda A, Nishihara M and Takahashi M. Occurrence of deoxyribonucleic acid fragmentation during prolactin-induced structural luteolysis in cycling rats. *Biol Reprod* 54: 1245-1251, 1996.
376. McCormack JT, Friederichs MG, Limback SD and Greenwald GS. Apoptosis during spontaneous luteolysis in the cyclic golden hamster: biochemical and morphological evidence. *Biol Reprod* 58: 255-260, 1998.
377. McCracken JA, Custer EE and Lamsa JC. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev* 79: 263-323, 1999.
378. McCracken JA, Custer EE and Lamsa JC. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev* 79: 263-323, 1999.
379. McCracken JA, Custer EE and Lamsa JC. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev* 79: 263-323, 1999.
380. McCracken JA, Custer EE and Lamsa JC. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev* 79: 263-323, 1999.
381. McCracken JA, Custer EE and Lamsa JC. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev* 79: 263-323, 1999.
382. McCracken JA, Custer EE and Lamsa JC. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev* 79: 263-323, 1999.
383. McCracken JA, Custer EE and Lamsa JC. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev* 79: 263-323, 1999.

384. McCracken JA, Custer EE and Lamsa JC. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev* 79: 263-323, 1999.
385. McCracken JA, Custer EE and Lamsa JC. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev* 79: 263-323, 1999.
386. McCracken JA, Custer EE and Lamsa JC. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev* 79: 263-323, 1999.
387. McCracken JA, Custer EE and Lamsa JC. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev* 79: 263-323, 1999.
388. McCracken JA, Custer EE and Lamsa JC. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev* 79: 263-323, 1999.
389. McCracken JA, Custer EE and Lamsa JC. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev* 79: 263-323, 1999.
390. McCracken JA, Custer EE and Lamsa JC. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev* 79: 263-323, 1999.
391. McCracken JA, Custer EE and Lamsa JC. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev* 79: 263-323, 1999.
392. McDonnell TJ, Nunez G, Platt FM, Hockenberry D, London L, McKearn JP and 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.
393. McGee EA and Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 21: 200-214, 2000.
394. McGee EA and Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 21: 200-214, 2000.
395. McGee EA and Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 21: 200-214, 2000.
396. McGuire WJ, Juengel JL and Niswender GD. Protein kinase C second messenger system mediates the antisteroidogenic effects of prostaglandin F2 alpha in the ovine corpus luteum in vivo. *Biol Reprod* 51: 800-806, 1994.
397. McGuire WJ, Juengel JL and Niswender GD. Protein kinase C second messenger system mediates the antisteroidogenic effects of prostaglandin F2 alpha in the ovine corpus luteum in vivo. *Biol Reprod* 51: 800-806, 1994.
398. McLean MP, Nelson S, Parmer T, Khan I, Steinschneider A, Puryear T and Gibori G. Identification and characterization of an abundant phosphoprotein specific to the large luteal cell. *Endocrinology* 126: 1796-1805, 1990.
399. McLean MP, Nelson S, Parmer T, Khan I, Steinschneider A, Puryear T and Gibori G. Identification and characterization of an abundant phosphoprotein specific to the large luteal cell. *Endocrinology* 126: 1796-1805, 1990.
400. McLean MP, Nelson S, Parmer T, Khan I, Steinschneider A, Puryear T and Gibori G. Identification and characterization of an abundant phosphoprotein specific to the large luteal cell. *Endocrinology* 126: 1796-1805, 1990.
401. McLean MP, Nelson SE, Billheimer JT and Gibori G. Differential capacity for cholesterol transport and processing in large and small rat luteal cells. *Endocrinology* 131: 2203-2212, 1992.
402. McLean MP, Puryear TK, Khan I, Azhar S, Billheimer JT, Orly J and Gibori G. Estradiol regulation of sterol carrier protein-2 independent of cytochrome P450 side-chain cleavage expression in the rat corpus luteum. *Endocrinology* 125: 1337-1344, 1989.

403. McLean MP, Puryear TK, Khan I, Azhar S, Billheimer JT, Orly J and Gibori G. Estradiol regulation of sterol carrier protein-2 independent of cytochrome P450 side-chain cleavage expression in the rat corpus luteum. *Endocrinology* 125: 1337-1344, 1989.
404. McLean MP and Sandhoff TW. Expression and hormonal regulation of the high-density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I messenger ribonucleic acid in the rat ovary. *Endocrine* 9: 243-252, 1998.
405. McNatty KP. Regulation of follicle maturation in the human ovary: a role for 5-reduced androgens. In: *Endocrinology*, edited by Cumming IA FJMF. Canberra: Australian Academy of Sciences, 1980, p. 1-51.
406. McNatty KP, Makris A, DeGrazia C, Osathanondh R and 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: 687-699, 1979.
407. Meidan R, Girsh E, Blum O and Aberdam E. In vitro differentiation of bovine theca and granulosa cells into small and large luteal-like cells: morphological and functional characteristics. *Biol Reprod* 43: 913-921, 1990.
408. Meidan R, Milvae RA, Weiss S, Levy N and Friedman A. Intraovarian regulation of luteolysis. *J Reprod Fertil Suppl* 54: 217-228, 1999.
409. Menon M, Peegel H and Menon KM. Lipoprotein augmentation of human chorionic gonadotropin and prolactin stimulated progesterone synthesis by rat luteal cells. *J Steroid Biochem* 22: 79-84, 1985.
410. Meyer MD, Hansen PJ, Thatcher WW, Drost M, Badinga L, Roberts RM, Li J, Ott TL and Bazer FW. Extension of corpus luteum lifespan and reduction of uterine secretion of prostaglandin F2 alpha of cows in response to recombinant interferon-tau. *J Dairy Sci* 78: 1921-1931, 1995.
411. Minegishi K, Tanaka M, Nishimura O, Tanigaki S, Miyakoshi K, Ishimoto H and Yoshimura Y. Reactive oxygen species mediate leukocyte-endothelium interactions in prostaglandin F2alpha - induced luteolysis in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E1308-E1315, 2002.
412. Minegishi K, Tanaka M, Nishimura O, Tanigaki S, Miyakoshi K, Ishimoto H and Yoshimura Y. Reactive oxygen species mediate leukocyte-endothelium interactions in prostaglandin F2alpha - induced luteolysis in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E1308-E1315, 2002.
413. Miyamoto A, Shirasuna K, Wijayagunawardane MP, Watanabe S, Hayashi M, Yamamoto D, Matsui M and Acosta TJ. Blood flow: a key regulatory component of corpus luteum function in the cow. *Domest Anim Endocrinol* 29: 329-339, 2005.
414. Monget P, Fabre S, Mulsant P, Lecerf F, Elsen JM, Mazerbourg S, Pisselet C and Monniaux D. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domest Anim Endocrinol* 23: 139-154, 2002.
415. Montes GS and Luque EH. Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Acta Anat (Basel)* 133: 192-199, 1988.
416. Moon YS, Dorrington JH and Armstrong DT. Stimulatory action of follicle-stimulating hormone on estradiol-17 beta secretion by hypophysectomized rat ovaries in organ culture. *Endocrinology* 97: 244-247, 1975.
417. Moon YS, Tsang BK, Simpson C and 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: 263-267, 1978.
418. Morales C, Garcia-Pardo L, Reymundo C, Bellido C, Sanchez-Criado JE and Gaytan F. Different patterns of structural luteolysis in the human corpus luteum of menstruation. *Hum Reprod* 15: 2119-2128, 2000.

419. Morales C, Garcia-Pardo L, Reymundo C, Bellido C, Sanchez-Criado JE and Gaytan F. Different patterns of structural luteolysis in the human corpus luteum of menstruation. *Hum Reprod* 15: 2119-2128, 2000.
420. Morishige WK and 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: 260-274, 1974.
421. Morton H. Early pregnancy factor (EPF): a link between fertilization and immunomodulation. *Aust J Biol Sci* 37: 393-407, 1984.
422. Motta AB, Estevez A, Tognetti T, Gimeno MA and Franchi AM. Dual effects of nitric oxide in functional and regressing rat corpus luteum. *Mol Hum Reprod* 7: 43-47, 2001.
423. Mukherjee A, Park-Sarge OK and Mayo KE. Gonadotropins induce rapid phosphorylation of the 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 137: 3234-3245, 1996.
424. Murphy BD. Luteinization. In: *The Ovary*, edited by Leung P.C.K and Adashi EY. San Diego: Elsevier Inc, Academic Press, 2004, p. 185-199.
425. Musicki B, Aten RF and Behrman HR. Inhibition of protein synthesis and hormone-sensitive steroidogenesis in response to hydrogen peroxide in rat luteal cells. *Endocrinology* 134: 588-595, 1994.
426. Musicki B, Aten RF and Behrman HR. Inhibition of protein synthesis and hormone-sensitive steroidogenesis in response to hydrogen peroxide in rat luteal cells. *Endocrinology* 134: 588-595, 1994.
427. Nackley AC, Shea-Eaton W, Lopez D and McLean MP. Repression of the steroidogenic acute regulatory gene by the multifunctional transcription factor Yin Yang 1. *Endocrinology* 143: 1085-1096, 2002.
428. Nackley AC, Shea-Eaton W, Lopez D and McLean MP. Repression of the steroidogenic acute regulatory gene by the multifunctional transcription factor Yin Yang 1. *Endocrinology* 143: 1085-1096, 2002.
429. Naicker S and Bhoola KD. Endothelins: vasoactive modulators of renal function in health and disease. *Pharmacol Ther* 90: 61-88, 2001.
430. Naicker S and Bhoola KD. Endothelins: vasoactive modulators of renal function in health and disease. *Pharmacol Ther* 90: 61-88, 2001.
431. Nakamura T, Takio K, Eto Y, Shibai H, Titani K and Sugino H. Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science* 247: 836-838, 1990.
432. Natraj U and Richards JS. Hormonal regulation, localization, and functional activity of the progesterone receptor in granulosa cells of rat preovulatory follicles. *Endocrinology* 133: 761-769, 1993.
433. Natraj U and Richards JS. Hormonal regulation, localization, and functional activity of the progesterone receptor in granulosa cells of rat preovulatory follicles. *Endocrinology* 133: 761-769, 1993.
434. Nelson SE, Gibori G and Hunzicker-Dunn M. The cAMP-dependent signalling cascade in the two luteal cell types of the pregnant rat corpus luteum. *Mol Cell Endocrinol* 85: 195-203, 1992.
435. Nelson SE, McLean MP, Jayatilak PG and Gibori G. Isolation, characterization, and culture of cell subpopulations forming the pregnant rat corpus luteum. *Endocrinology* 130: 954-966, 1992.
436. Nelson SE, McLean MP, Jayatilak PG and Gibori G. Isolation, characterization, and culture of cell subpopulations forming the pregnant rat corpus luteum. *Endocrinology* 130: 954-966, 1992.

437. Nett TM and Niswender GD. Luteal blood flow and receptors for LH during PGF2 alpha-induced luteolysis: production of PGE2 and PGF2 alpha during early pregnancy. *Acta Vet Scand Suppl* 77: 117-130, 1981.
438. Neuvians TP, Schams D, Berisha B and Pfaffl MW. Involvement of pro-inflammatory cytokines, mediators of inflammation, and basic fibroblast growth factor in prostaglandin F2alpha-induced luteolysis in bovine corpus luteum. *Biol Reprod* 70: 473-480, 2004.
439. Neuvians TP, Schams D, Berisha B and Pfaffl MW. Involvement of pro-inflammatory cytokines, mediators of inflammation, and basic fibroblast growth factor in prostaglandin F2alpha-induced luteolysis in bovine corpus luteum. *Biol Reprod* 70: 473-480, 2004.
440. Nishimura R, Shibaya M, Skarzynski DJ and Okuda K. Progesterone stimulation by LH involves the phospholipase-C pathway in bovine luteal cells. *J Reprod Dev* 50: 257-261, 2004.
441. Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK and McIntush EW. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev* 80: 1-29, 2000.
442. Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK and McIntush EW. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev* 80: 1-29, 2000.
443. Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK and McIntush EW. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev* 80: 1-29, 2000.
444. Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK and McIntush EW. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev* 80: 1-29, 2000.
445. Niswender GD and Nett TM. Corpus luteum and its control in infraprimates species. In: *The Physiology of Reproduction*, edited by Knobil E and Neill JD. New York: Raven Press, 1994, p. 781-816.
446. Niswender GD, Reimers TJ, Diekman MA and Nett TM. Blood flow: a mediator of ovarian function. *Biol Reprod* 14: 64-81, 1976.
447. Niswender GD, Reimers TJ, Diekman MA and Nett TM. Blood flow: a mediator of ovarian function. *Biol Reprod* 14: 64-81, 1976.
448. Niswender GD, Sawyer HR, Chen TT and Endres DB. Action of luteinizing hormone at the luteal cell level. In: *Advances in sex hormone research*, edited by Thomas JA and Singhal RL. Baltimore: Urban & Schwarzenberg, 1980, p. 153-185.
449. Nokelainen P, Peltoketo H, Vihko R and Vihko P. Expression cloning of a novel estrogenic mouse 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketosteroid reductase (m17HSD7), previously described as a prolactin receptor-associated protein (PRAP) in rat. *Mol Endocrinol* 12: 1048-1059, 1998.
450. Nuñez G, Hockenbery D, McDonnell TJ, Sorensen CM and Korsmeyer SJ. Bcl-2 maintains B cell memory. *Nature* 353: 71-73, 1991.
451. O'Neill C. Thrombocytopenia is an initial maternal response to fertilization in mice. *J Reprod Fertil* 73: 559-566, 1985.
452. O'Shea JD and Wright PJ. Regression of the corpus luteum of pregnancy following parturition in the ewe. *Acta Anat (Basel)* 122: 69-76, 1985.
453. Ogren L and Talamantes F. Prolactins of pregnancy and their cellular source. *Int Rev Cytol* 112: 1-65, 1988.
454. Ohashi M, Carr BR and Simpson ER. Lipoprotein-binding sites in human corpus luteum membrane fractions. *Endocrinology* 110: 1477-1482, 1982.
455. Ohtani M, Kobayashi S, Miyamoto A, Hayashi K and Fukui Y. Real-time relationships between intraluteal and plasma concentrations of endothelin, oxytocin, and progesterone during prostaglandin F2alpha-induced luteolysis in the cow. *Biol Reprod* 58: 103-108, 1998.

456. Okano A, Kishi H, Takahashi H and Takahashi M. Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis in cultured porcine luteal cells. *J Reprod Dev* 52: 301-306, 2006.
457. Okuda K, Korzekwa A, Shibaya M, Murakami S, Nishimura R, Tsubouchi M, Woclawek-Potocka I and Skarzynski DJ. Progesterone is a suppressor of apoptosis in bovine luteal cells. *Biol Reprod* 71: 2065-2071, 2004.
458. Okuda K, Korzekwa A, Shibaya M, Murakami S, Nishimura R, Tsubouchi M, Woclawek-Potocka I and Skarzynski DJ. Progesterone is a suppressor of apoptosis in bovine luteal cells. *Biol Reprod* 71: 2065-2071, 2004.
459. Okuda K, Korzekwa A, Shibaya M, Murakami S, Nishimura R, Tsubouchi M, Woclawek-Potocka I and Skarzynski DJ. Progesterone is a suppressor of apoptosis in bovine luteal cells. *Biol Reprod* 71: 2065-2071, 2004.
460. Okuda K, Korzekwa A, Shibaya M, Murakami S, Nishimura R, Tsubouchi M, Woclawek-Potocka I and Skarzynski DJ. Progesterone is a suppressor of apoptosis in bovine luteal cells. *Biol Reprod* 71: 2065-2071, 2004.
461. Okuda K, Sakumoto R, Uenoyama Y, Berisha B, Miyamoto A and Schams D. Tumor necrosis factor alpha receptors in microvascular endothelial cells from bovine corpus luteum. *Biol Reprod* 61: 1017-1022, 1999.
462. Olson KK, Anderson LE, Wiltbank MC and Townson DH. Actions of prostaglandin F2alpha and prolactin on intercellular adhesion molecule-1 expression and monocyte/macrophage accumulation in the rat corpus luteum. *Biol Reprod* 64: 890-897, 2001.
463. Olson KK, Anderson LE, Wiltbank MC and Townson DH. Actions of prostaglandin F2alpha and prolactin on intercellular adhesion molecule-1 expression and monocyte/macrophage accumulation in the rat corpus luteum. *Biol Reprod* 64: 890-897, 2001.
464. Olson KK and Townson DH. Prolactin-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 and the accumulation of monocytes/macrophages during regression of the rat corpus luteum. *Biol Reprod* 62: 1571-1578, 2000.
465. Olson LM, Jones-Burton CM and Jablonka-Shariff A. Nitric oxide decreases estradiol synthesis of rat luteinized ovarian cells: possible role for nitric oxide in functional luteal regression. *Endocrinology* 137: 3531-3539, 1996.
466. Oltvai ZN, Milliman CL and Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609-619, 1993.
467. Oonk RB, Krasnow JS, Beattie WG and Richards JS. Cyclic AMP-dependent and -independent regulation of cholesterol side chain cleavage cytochrome P-450 (P-450_{scc}) in rat ovarian granulosa cells and corpora lutea. cDNA and deduced amino acid sequence of rat P-450_{scc}. *J Biol Chem* 264: 21934-21942, 1989.
468. O'Hara A, Mori T, Taii S, Ban C and 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.
469. Pang CY and Behrman HR. Acute effects of prostaglandin F2 alpha on ovarian and luteal blood flow, luteal gonadotropin uptake in vivo, and gonadotropin binding in vitro. *Endocrinology* 108: 2239-2244, 1981.
470. Papadopoulos V, Dharmarajan AM, Li H, Culty M, Lemay M and Sridaran R. Mitochondrial peripheral-type benzodiazepine receptor expression. Correlation with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist-induced apoptosis in the corpus luteum. *Biochem Pharmacol* 58: 1389-1393, 1999.
471. Parborell F, Irusta G, Vitale A, Gonzalez O, Pecci A and Tesone M. Gonadotropin-releasing hormone antagonist antide inhibits apoptosis of preovulatory follicle cells in rat ovary. *Biol Reprod* 72: 659-666, 2005.

472. Parborell F, Pecci A, Gonzalez O, Vitale A and Tesone M. Effects of a gonadotropin-releasing hormone agonist on rat ovarian follicle apoptosis: Regulation by EGF and the expression of Bcl-2-related genes. *Biol Reprod* 67: 481-486, 2002.
473. Parborell F, Pecci A, Gonzalez O, Vitale A and Tesone M. Effects of a gonadotropin-releasing hormone agonist on rat ovarian follicle apoptosis: Regulation by EGF and the expression of Bcl-2-related genes. *Biol Reprod* 67: 481-486, 2002.
474. Park JI, Park HJ, Choi HS, Lee K, Lee WK and Chun SY. Gonadotropin regulation of NGFI-B messenger ribonucleic acid expression during ovarian follicle development in the rat. *Endocrinology* 142: 3051-3059, 2001.
475. Park OK and Mayo KE. Transient expression of progesterone receptor messenger RNA in ovarian granulosa cells after the preovulatory luteinizing hormone surge. *Mol Endocrinol* 5: 967-978, 1991.
476. Park-Sarge OK, Parmer TG, Gu Y and Gibori G. Does the rat corpus luteum express the progesterone receptor gene? *Endocrinology* 136: 1537-1543, 1995.
477. Parmer TG, McLean MP, Duan WR, Nelson SE, Albarracin CT, Khan I and Gibori G. Hormonal and immunological characterization of the 32 kilodalton ovarian-specific protein. *Endocrinology* 131: 2213-2221, 1992.
478. Parmer TG, McLean MP, Duan WR, Nelson SE, Albarracin CT, Khan I and Gibori G. Hormonal and immunological characterization of the 32 kilodalton ovarian-specific protein. *Endocrinology* 131: 2213-2221, 1992.
479. Pate JL and Condon WA. Effects of serum and lipoproteins on steroidogenesis in cultured bovine luteal cells. *Mol Cell Endocrinol* 28: 551-562, 1982.
480. Pate JL and Landis KP. Immune cells in the corpus luteum: friends or foes? *Reproduction* 122: 665-676, 2001.
481. Pavao M and Traish AM. Estrogen receptor antibodies: specificity and utility in detection, localization and analyses of estrogen receptor alpha and beta. *Steroids* 66: 1-16, 2001.
482. Pedersen RC. Steroidogenesis activator polypeptide (SAP) in the rat ovary and testis. *J Steroid Biochem* 27: 731-735, 1987.
483. Peluffo MC, Bussmann L, Stouffer RL and Tesone M. Expression of caspase-2, -3, -8 and -9 proteins and enzyme activity in the corpus luteum of the rat at different stages during the natural estrous cycle. *Reproduction* 132: 465-475, 2006.
484. Peluffo MC, Bussmann L, Stouffer RL and Tesone M. Expression of caspase-2, -3, -8 and -9 proteins and enzyme activity in the corpus luteum of the rat at different stages during the natural estrous cycle. *Reproduction* 132: 465-475, 2006.
485. Peluffo MC, Young KA and Stouffer RL. Dynamic Expression of Caspase-2, -3, -8, and -9 Proteins and Enzyme Activity, But Not Messenger Ribonucleic Acid, in the Monkey Corpus Luteum during the Menstrual Cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 2327-2335, 2005.
486. Peluffo MC, Young KA and Stouffer RL. Dynamic Expression of Caspase-2, -3, -8, and -9 Proteins and Enzyme Activity, But Not Messenger Ribonucleic Acid, in the Monkey Corpus Luteum during the Menstrual Cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 2327-2335, 2005.
487. Peluffo MC, Young KA and Stouffer RL. Dynamic Expression of Caspase-2, -3, -8, and -9 Proteins and Enzyme Activity, But Not Messenger Ribonucleic Acid, in the Monkey Corpus Luteum during the Menstrual Cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 2327-2335, 2005.
488. Peng L, Arensburg J, Orly J and Payne AH. The murine 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase (3beta-HSD) gene family: a postulated role for 3beta-HSD VI during early pregnancy. *Mol Cell Endocrinol* 187: 213-221, 2002.
489. Peters H and McNatty KP. Ovulation. In: The ovary, edited by Peters H and McNatty KP. Londres: Granada Publishing, 1980, p. 75-79.

490. Petroff MG, Petroff BK and Pate JL. Expression of cytokine messenger ribonucleic acids in the bovine corpus luteum. *Endocrinology* 140: 1018-1021, 1999.
491. Petroff MG, Petroff BK and Pate JL. Mechanisms of cytokine-induced death of cultured bovine luteal cells. *Reproduction* 121: 753-760, 2001.
492. Pharriss BB. The possible vascular regulation of luteal function. *Perspect Biol Med* 13: 434-444, 1970.
493. Pharriss BB, Cornette JC and Gutknecht GD. Vascular control of luteal steroidogenesis. *J Reprod Fertil Suppl* 10: 97-103, 1970.
494. Pharriss BB and Wyngarden LJ. The effect of prostaglandin F 2alpha on the progesterone content of ovaries from pseudopregnant rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 130: 92-94, 1969.
495. Pittman RC, Khoo JC and Steinberg D. Cholesterol esterase in rat adipose tissue and its activation by cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 250: 4505-4511, 1975.
496. Pitzel L, Jarry H and Wuttke W. Effects and interactions of prostaglandin F2 alpha, oxytocin, and cytokines on steroidogenesis of porcine luteal cells. *Endocrinology* 132: 751-756, 1993.
497. Plas-Roser S, Muller B and Aron C. Estradiol involvement in the luteolytic action of LH during the estrous cycle in the rat. *Exp Clin Endocrinol* 92: 145-153, 1988.
498. Porter AG. Protein translocation in apoptosis. *Trends Cell Biol* 9: 394-401, 1999.
499. Prakash BS, Pedina J, Steiner A and Wuttke W. Demonstration of luteotropic responses of human recombinant gamma interferon in porcine corpora lutea using an in-vivo microdialysis system. *J Steroid Biochem Mol Biol* 63: 189-194, 1997.
500. Prenant LA. La valeur morphologique du corps jaune. Son action physiologique et therapeutique possible. *Rev Gen Sci Pures Appl* 9: 646, 1898.
501. Prigent-Tessier A, Tessier C, Hirose-Takamori M, Boyer C, Ferguson-Gottschall S and Gibori G. Rat decidual prolactin. Identification, molecular cloning, and characterization. *J Biol Chem* 274: 37982-37989, 1999.
502. Pru JK, Hendry IR, Davis JS and Rueda BR. Soluble Fas ligand activates the sphingomyelin pathway and induces apoptosis in luteal steroidogenic cells independently of stress-activated p38(MAPK). *Endocrinology* 143: 4350-4357, 2002.
503. Pru JK, Lynch MP, Davis JS and Rueda BR. Signaling mechanisms in tumor necrosis factor alpha-induced death of microvascular endothelial cells of the corpus luteum. *Reprod Biol Endocrinol* 1: 17, 2003.
504. Pru JK, Lynch MP, Davis JS and Rueda BR. Signaling mechanisms in tumor necrosis factor alpha-induced death of microvascular endothelial cells of the corpus luteum. *Reprod Biol Endocrinol* 1: 17, 2003.
505. Pru JK, Lynch MP, Davis JS and Rueda BR. Signaling mechanisms in tumor necrosis factor alpha-induced death of microvascular endothelial cells of the corpus luteum. *Reprod Biol Endocrinol* 1: 17, 2003.
506. Pru JK, Lynch MP, Davis JS and Rueda BR. Signaling mechanisms in tumor necrosis factor alpha-induced death of microvascular endothelial cells of the corpus luteum. *Reprod Biol Endocrinol* 1: 17, 2003.
507. Puryear TK, McLean MP, Khan I and Gibori G. Mechanism for control of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and cytochrome P-450 side chain cleavage message and enzyme in the corpus luteum. *Endocrinology* 126: 2910-2918, 1990.
508. Quatacker JR. Formation of autophagic vacuoles during human corpus luteum involution. *Zellforsch Mikrosk Anat* 122: 479-487, 1971.

509. Quirk SM, Cowan RG, Joshi SG and Henrikson KP. Fas antigen-mediated apoptosis in human granulosa/luteal cells. *Biol Reprod* 52: 279-287, 1995.
510. Quirk SM, Harman RM, Huber SC and Cowan RG. Responsiveness of mouse corpora luteal cells to Fas antigen (CD95)-mediated apoptosis. *Biol Reprod* 63: 49-56, 2000.
511. Quirk SM, Harman RM, Huber SC and Cowan RG. Responsiveness of mouse corpora luteal cells to Fas antigen (CD95)-mediated apoptosis. *Biol Reprod* 63: 49-56, 2000.
512. Rajapaksha WR, McBride M, Robertson L and O'Shaughnessy PJ. Sequence of the bovine HDL-receptor (SR-BI) cDNA and changes in receptor mRNA expression during granulosa cell luteinization in vivo and in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 134: 59-67, 1997.
513. Rajkumar K, Chedrese PJ, Ly H and Murphy BD. Protein kinase C, an endogenous regulator of hormone-induced cyclic AMP induction in porcine luteal cells. *J Endocrinol* 130: 273-280, 1991.
514. Reed JC, Cuddy M, Haldar S, Croce C, Nowell P, Makover D and Bradley K. BCL2-mediated tumorigenicity of a human T-lymphoid cell line: synergy with MYC and inhibition by BCL2 antisense. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 3660-3664, 1990.
515. Reed JC, Stein C, Subasinghe C, Haldar S, Croce CM, Yum S and Cohen J. Antisense-mediated inhibition of BCL2 protooncogene expression and leukemic cell growth and survival: comparisons of phosphodiester and phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Cancer Res* 50: 6565-6570, 1990.
516. Rennert H, Amsterdam A, Billheimer JT and Strauss JF, III. Regulated expression of sterol carrier protein 2 in the ovary: a key role for cyclic AMP. *Biochemistry* 30: 11280-11285, 1991.
517. Reynolds LP, Grazul-Bilska AT and Redmer DA. Angiogenesis in the corpus luteum. *Endocrine* 12: 1-9, 2000.
518. Richards JS, Sharma SC, Falender AE and Lo YH. Expression of FKHR, FKHL1, and AFX genes in the rodent ovary: evidence for regulation by IGF-I, estrogen, and the gonadotropins. *Mol Endocrinol* 16: 580-599, 2002.
519. Riley JC and Behrman HR. In vivo generation of hydrogen peroxide in the rat corpus luteum during luteolysis. *Endocrinology* 128: 1749-1753, 1991.
520. Riley JC and Behrman HR. Oxygen radicals and reactive oxygen species in reproduction. *Proc Soc Exp Biol Med* 198: 781-791, 1991.
521. Risk M and Gibori G. Mechanisms of luteal cell regulation by prolactin. In: Prolactin, edited by Horseman ND. New York: Kluwer Academic, 2001, p. 265-295.
522. Risk M, Shehu A, Mao J, Stocco CO, Goldsmith LT, Bowen-Shauver JM and Gibori G. Cloning and characterization of a 5' regulatory region of the prolactin receptor-associated protein/17{beta} hydroxysteroid dehydrogenase 7 gene. *Endocrinology* 146: 2807-2816, 2005.
523. Risk M, Shehu A, Mao J, Stocco CO, Goldsmith LT, Bowen-Shauver JM and Gibori G. Cloning and characterization of a 5' regulatory region of the prolactin receptor-associated protein/17{beta} hydroxysteroid dehydrogenase 7 gene. *Endocrinology* 146: 2807-2816, 2005.
524. Rivier C, Rivier J and Vale W. Inhibin-mediated feedback control of follicle-stimulating hormone secretion in the female rat. *Science* 234: 205-208, 1986.
525. Robertson D, Burger HG, Sullivan J, Cahir N, Groome N, Poncelet E, Franchimont P, Woodruff T and Mather JP. Biological and immunological characterization of inhibin forms in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 669-676, 1996.
526. Robertson JD, Enoksson M, Suomela M, Zhivotovsky B and Orrenius S. Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 277: 29803-29809, 2002.

527. Robertson JD, Enoksson M, Suomela M, Zhivotovsky B and Orrenius S. Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 277: 29803-29809, 2002.
528. Robker RL and Richards JS. Hormonal control of the cell cycle in ovarian cells: proliferation versus differentiation. *Biol Reprod* 59: 476-482, 1998.
529. Robker RL and Richards JS. Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: a coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27Kip1. *Mol Endocrinol* 12: 924-940, 1998.
530. Robker RL, Russell DL, Espey LL, Lydon JP, O'Malley BW and Richards JS. Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4689-4694, 2000.
531. Roby KF, Son DS and Terranova PF. Alterations of events related to ovarian function in tumor necrosis factor receptor type I knockout mice. *Biol Reprod* 61: 1616-1621, 1999.
532. Roby KF and Terranova PF. Partial purification and characterization of an endothelial cell growth regulator from the bovine ovary. *J Reprod Fertil* 89: 231-242, 1990.
533. Rock J and Bartlett MK. Biopsy studies of human endometrium: criteria of dating and information about amenorrhea, menorrhagia, and time of ovulation. *J Am Med Assoc* 108: 2022-2028, 1937.
534. Rodger FE, Fraser HM, Krajewski S and Illingworth PJ. Production of the proto-oncogene BAX does not vary with changing in luteal function in women. *Mol Hum Reprod* 4: 27-32, 1998.
535. Rodger FE, Fraser HM, Krajewski S and Illingworth PJ. Production of the proto-oncogene BAX does not vary with changing in luteal function in women. *Mol Hum Reprod* 4: 27-32, 1998.
536. Rosiansky-Sultan M, Klipper E, Spanel-Borowski K and Meidan R. Inverse relationship between nitric oxide synthases and endothelin-1 synthesis in bovine corpus luteum: interactions at the level of luteal endothelial cell. *Endocrinology* 147: 5228-5235, 2006.
537. Rothchild I. The regulation of the mammalian corpus luteum. *Recent Prog Horm Res* 37: 183-298, 1981.
538. Roughton SA, Lareu RR, Bittles AH and Dharmarajan AM. Fas and Fas ligand messenger ribonucleic acid and protein expression in the rat corpus luteum during apoptosis-mediated luteolysis. *Biol Reprod* 60: 797-804, 1999.
539. Rueda BR, Hendry IR, Hendry III WJ, Stormshak F, Slayden OD and Davis JS. Decreased progesterone levels and progesterone receptor antagonists promote apoptotic cell death in bovine luteal cells. *Biol Reprod* 62: 269-276, 2000.
540. Rueda BR, Hendry IR, Hendry III WJ, Stormshak F, Slayden OD and Davis JS. Decreased progesterone levels and progesterone receptor antagonists promote apoptotic cell death in bovine luteal cells. *Biol Reprod* 62: 269-276, 2000.
541. Rueda BR, Hendry IR, Tilly JL and Hamernik DL. Accumulation of caspase-3 messenger ribonucleic acid and induction of caspase activity in the ovine corpus luteum following prostaglandin F₂alpha treatment in vivo. *Biol Reprod* 60: 1087-1092, 1999.
542. Rueda BR, Hendry IR, Tilly JL and Hamernik DL. Accumulation of caspase-3 messenger ribonucleic acid and induction of caspase activity in the ovine corpus luteum following prostaglandin F₂alpha treatment in vivo. *Biol Reprod* 60: 1087-1092, 1999.
543. Rueda BR, Hendry IR, Tilly JL and Hamernik DL. Accumulation of caspase-3 messenger ribonucleic acid and induction of caspase activity in the ovine corpus luteum following prostaglandin F₂alpha treatment in vivo. *Biol Reprod* 60: 1087-1092, 1999.

544. Rueda BR, Hendry IR, Tilly JL and Hamernik DL. Accumulation of caspase-3 messenger ribonucleic acid and induction of caspase activity in the ovine corpus luteum following prostaglandin F₂alpha treatment in vivo. *Biol Reprod* 60: 1087-1092, 1999.
545. Rueda BR, Hendry IR, Tilly JL and Hamernik DL. Accumulation of caspase-3 messenger ribonucleic acid and induction of caspase activity in the ovine corpus luteum following prostaglandin F₂alpha treatment in vivo. *Biol Reprod* 60: 1087-1092, 1999.
546. Rueda BR, Hendry IR, Tilly JL and Hamernik DL. Accumulation of caspase-3 messenger ribonucleic acid and induction of caspase activity in the ovine corpus luteum following prostaglandin F₂alpha treatment in vivo. *Biol Reprod* 60: 1087-1092, 1999.
547. Rueda BR, Hendry IR, Tilly JL and Hamernik DL. Accumulation of caspase-3 messenger ribonucleic acid and induction of caspase activity in the ovine corpus luteum following prostaglandin F₂alpha treatment in vivo. *Biol Reprod* 60: 1087-1092, 1999.
548. Rueda BR, Tilly KI, Botros IW, Jolly PD, Hansen TR, Hoyer PB and 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: 186-193, 1997.
549. Rueda BR, Tilly KI, Botros IW, Jolly PD, Hansen TR, Hoyer PB and 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: 186-193, 1997.
550. Rueda BR, Tilly KI, Botros IW, Jolly PD, Hansen TR, Hoyer PB and 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: 186-193, 1997.
551. Rueda BR, Tilly KI, Botros IW, Jolly PD, Hansen TR, Hoyer PB and 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: 186-193, 1997.
552. Rueda BR, Tilly KI, Botros IW, Jolly PD, Hansen TR, Hoyer PB and 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: 186-193, 1997.
553. Rueda BR, Tilly KI, Botros IW, Jolly PD, Hansen TR, Hoyer PB and 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: 186-193, 1997.
554. Rueda BR, Tilly KI, Botros IW, Jolly PD, Hansen TR, Hoyer PB and 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: 186-193, 1997.
555. Russell DL and Richards JS. Differentiation-dependent prolactin responsiveness and stat (signal transducers and activators of transcription) signaling in rat ovarian cells. *Mol Endocrinol* 13: 2049-2064, 1999.
556. Sakumoto R, Berisha B, Kawate N, Schams D and Okuda K. Tumor necrosis factor-alpha and its receptor in bovine corpus luteum throughout the estrous cycle. *Biol Reprod* 62: 192-199, 2000.
557. Sakumoto R, Murakami S, Kishi H, Iga K, Okano A and Okuda K. Tumor necrosis factor-alpha and its receptor in the corpus luteum of pregnant cows. *Mol Reprod Dev* 55: 406-411, 2000.
558. Salvador LM, Maizels E, Hales DB, Miyamoto E, Yamamoto H and Hunzicker-Dunn M. Acute signaling by the LH receptor is independent of protein kinase C activation. *Endocrinology* 143: 2986-2994, 2002.
559. Sanders SL and Stouffer RL. Localization of steroidogenic enzymes in macaque luteal tissue during the menstrual cycle and simulated early pregnancy: immunohistochemical evidence supporting the two-cell model for estrogen production in the primate corpus luteum. *Biol Reprod* 56: 1077-1087, 1997.

560. Sanders SL and Stouffer RL. Localization of steroidogenic enzymes in macaque luteal tissue during the menstrual cycle and simulated early pregnancy: immunohistochemical evidence supporting the two-cell model for estrogen production in the primate corpus luteum. *Biol Reprod* 56: 1077-1087, 1997.
561. Sanders SL, Stouffer RL and Brannian JD. Androgen production by monkey luteal cell subpopulations at different stages of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 591-596, 1996.
562. Sandhoff TW and McLean MP. Hormonal regulation of steroidogenic acute regulatory (StAR) protein messenger ribonucleic acid expression in the rat ovary. *Endocrine* 4: 259-267, 1996.
563. Sandhoff TW, Hales DB, Hales KH and McLean MP. Transcriptional regulation of the rat steroidogenic acute regulatory protein gene by steroidogenic factor 1. *Endocrinology* 139: 4820-4831, 1998.
564. Sandhoff TW and McLean MP. Repression of the rat steroidogenic acute regulatory (StAR) protein gene by PGF α is modulated by the negative transcription factor DAX-1. *Endocrine* 10: 83-91, 1999.
565. Sandhoff TW and McLean MP. Repression of the rat steroidogenic acute regulatory (StAR) protein gene by PGF α is modulated by the negative transcription factor DAX-1. *Endocrine* 10: 83-91, 1999.
566. Sandhoff TW and McLean MP. Repression of the rat steroidogenic acute regulatory (StAR) protein gene by PGF α is modulated by the negative transcription factor DAX-1. *Endocrine* 10: 83-91, 1999.
567. Santana P, Llanes L, Hernandez I, Gallardo G, Quintana J, Gonzalez J, Estevez F, Ruiz dG and Fanjul LF. Ceramide mediates tumor necrosis factor effects on P450-aromatase activity in cultured granulosa cells. *Endocrinology* 136: 2345-2348, 1995.
568. Santana P, Llanes L, Hernandez I, Gonzalez-Robayna I, Tabraue C, Gonzalez-Reyes J, Quintana J, Estevez F, Ruiz de Galarreta CM and Fanjul LF. Interleukin-1 beta stimulates sphingomyelin hydrolysis in cultured granulosa cells: evidence for a regulatory role of ceramide on progesterone and prostaglandin biosynthesis. *Endocrinology* 137: 2480-2489, 1996.
569. Saragüeta P, Krimer ARD, Charreau EH and Tesone M. Insulin regulation of steroidogenic activity in rat culture luteal cells. *J Steroid Biochem* 32: 393-397, 1989.
570. Saunders PT, Millar MR, Williams K, Macpherson S, Harkiss D, Anderson RA, Orr B, Groome NP, Scobie G and Fraser HM. Differential expression of estrogen receptor-alpha and -beta and androgen receptor in the ovaries of marmosets and humans. *Biol Reprod* 63: 1098-1105, 2000.
571. Sawada M and Carlson JC. Superoxide radical production in plasma membrane samples from regressing rat corpora lutea. *Can J Physiol Pharmacol* 67: 465-471, 1989.
572. Sawada M and 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.
573. Sawada M and 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.
574. Sawyer HR, Niswender KD, Braden TD and Niswender GD. Nuclear changes in ovine luteal cells in response to PGF α . *Domest Anim Endocrinol* 7: 229-237, 1990.
575. Sawyer HR, Niswender KD, Braden TD and Niswender GD. Nuclear changes in ovine luteal cells in response to PGF α . *Domest Anim Endocrinol* 7: 229-237, 1990.
576. Schomberg DW, Coudert SP and Short RV. Effects of bovine luteinizing hormone and human chorionic gonadotrophin on the bovine corpus luteum in vivo. *J Reprod Fertil* 14: 277-285, 1967.

577. Schoonmaker JN, Bergman KS, Steiner RA and Karsch FJ. Estradiol-induced luteal regression in the rhesus monkey: evidence for an extraovarian site of action. *Endocrinology* 110: 1708-1715, 1982.
578. Schuler LA, Langenberg KK, Gwynne JT and Strauss JF, III. High density lipoprotein utilization by dispersed rat luteal cells. *Biochim Biophys Acta* 664: 583-601, 1981.
579. Seedorf U, Ellinghaus P and Roch NJ. Sterol carrier protein-2. *Biochim Biophys Acta* 1486: 45-54, 2000.
580. Sekar N and Veldhuis JD. Concerted transcriptional activation of the low density lipoprotein receptor gene by insulin and luteinizing hormone in cultured porcine granulosa-luteal cells: possible convergence of protein kinase a, phosphatidylinositol 3-kinase, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Endocrinology* 142: 2921-2928, 2001.
581. Sharma SC and Richards JS. Regulation of AP1 (Jun/Fos) factor expression and activation in ovarian granulosa cells. Relation of JunD and Fra2 to terminal differentiation. *J Biol Chem* 275: 33718-33728, 2000.
582. Sherman BM and Korenman SG. Measurement of plasma LH, FSH, estradiol and progesterone in disorders of the human menstrual cycle: the short luteal phase. *J Clin Endocrinol Metab* 38: 89-93, 1974.
583. Sherwood OD, Crnekovic VE, Gordon WL and Rutherford JE. Radioimmunoassay of relaxin throughout pregnancy and during parturition in the rat. *Endocrinology* 107: 691-698, 1980.
584. Sherwood OD, Crnekovic VE, Gordon WL and Rutherford JE. Radioimmunoassay of relaxin throughout pregnancy and during parturition in the rat. *Endocrinology* 107: 691-698, 1980.
585. Shikone T, Yamoto M, Kokawa K, Yamashita K, Nishimori K and Nakano R. Apoptosis of human corpora lutea during cyclic luteal regression and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 2376-2380, 1996.
586. Shikone T, Yamoto M, Kokawa K, Yamashita K, Nishimori K and Nakano R. Apoptosis of human corpora lutea during cyclic luteal regression and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 2376-2380, 1996.
587. Shikone T, Yamoto M, Kokawa K, Yamashita K, Nishimori K and Nakano R. Apoptosis of human corpora lutea during cyclic luteal regression and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 2376-2380, 1996.
588. Shikone T, Yamoto M, Kokawa K, Yamashita K, Nishimori K and Nakano R. Apoptosis of human corpora lutea during cyclic luteal regression and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 2376-2380, 1996.
589. Shikone T, Yamoto M, Kokawa K, Yamashita K, Nishimori K and Nakano R. Apoptosis of human corpora lutea during cyclic luteal regression and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 2376-2380, 1996.
590. Shirasuna K, Asaoka H, Acosta TJ, Wijayagunawardane MP, Matsui M, Ohtani M and Miyamoto A. Endothelin-1 within the Corpus Luteum during Spontaneous Luteolysis in the Cow: Local Interaction with Prostaglandin F₂alpha and Angiotensin II. *J Cardiovasc Pharmacol* 44: S252-S255, 2004.
591. Shirasuna K, Shimizu T, Hayashi KG, Nagai K, Matsui M and Miyamoto A. Positive association, in local release, of luteal oxytocin with endothelin 1 and prostaglandin F₂alpha during spontaneous luteolysis in the cow: a possible intermediary role for luteolytic cascade within the corpus luteum. *Biol Reprod* 76: 965-970, 2007.
592. Shirasuna K, Watanabe S, Oki N, Wijayagunawardane MP, Matsui M, Ohtani M and Miyamoto A. A cooperative action of endothelin-1 with prostaglandin F₂alpha on luteal function in the cow. *Domest Anim Endocrinol* 31: 186-196, 2006.

593. Sholl SA, Orsini MW and Hitchins DJ. Estrogen synthesis and metabolism in the hamster blastocyst, uterus and liver near the time of implantation. *J Steroid Biochem* 19: 1153-1161, 1983.
594. Simmons KR, Caffrey JL, Phillips JL, Abel JH, Jr. and Niswender GD. A simple method for preparing suspensions of luteal cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 152: 366-371, 1976.
595. Sirois J, Boerboom D and Sayasith K. Prostaglandin Biosynthesis and Action in the Ovary. In: *The Ovary*, edited by Leung P.C.K and Adashi EY. San Diego: Elsevier Inc, Academic Press, 2004, p. 233-247.
596. Skarzynski DJ, Jaroszewski JJ and Okuda K. Role of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide in luteolysis in cattle. *Domest Anim Endocrinol* 29: 340-346, 2005.
597. Skarzynski DJ, Jaroszewski JJ and Okuda K. Role of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide in luteolysis in cattle. *Domest Anim Endocrinol* 29: 340-346, 2005.
598. Skarzynski DJ, Woclawek-Potocka I, Korzekwa A, Bah MM, Piotrowska K, Barszczewska B and Okuda K. Infusion of exogenous tumor necrosis factor dose dependently alters the length of the luteal phase in cattle: differential responses to treatment with indomethacin and L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor. *Biol Reprod* 76: 619-627, 2007.
599. Slotta KH, Rushing H and Fels E. Reindarstellung der hormone aus dem corpus luteum. *Berich Dtsch Chem Gesellschaft* 67: 1270, 1934.
600. Smith MF, Ricke WA, Bakke LJ, Dow MP and Smith GW. Ovarian tissue remodeling: role of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Mol Cell Endocrinol* 191: 45-56, 2002.
601. Smith MS, Freeman ME and Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96: 219-226, 1975.
602. Smith MS, Freeman ME and Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96: 219-226, 1975.
603. Smith MS, Freeman ME and Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96: 219-226, 1975.
604. Smith MS, Freeman ME and Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96: 219-226, 1975.
605. Smith MS and Neill JD. Termination at midpregnancy of the two daily surges of plasma prolactin initiated by mating in the rat. *Endocrinology* 98: 696-701, 1976.
606. Soares MJ, Faria TN, Roby KF and Deb S. Pregnancy and the prolactin family of hormones: coordination of anterior pituitary, uterine, and placental expression. *Endocr Rev* 12: 402-423, 1991.
607. Soules MR, McLachlan RI, Ek M, Dahl KD, Cohen NL and Bremner WJ. Luteal phase deficiency: characterization of reproductive hormones over the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 69: 804-812, 1989.
608. Sridaran R and Gibori G. Intraovarian localization of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin stimulation of testosterone and estradiol synthesis in the pregnant rat. *Endocrinology* 112: 1770-1776, 1983.
609. Sridaran R, Lee MA, Haynes L, Srivastava RK, Ghose M, Sridaran G and Smith CJ. GnRH action on luteal steroidogenesis during pregnancy. *Steroids* 64: 618-623, 1999.
610. Sridaran R, Philip GH, Li H, Culty M, Liu Z, Stocco DM and Papadopoulos V. GnRH agonist treatment decreases progesterone synthesis, luteal peripheral benzodiazepine receptor mRNA, ligand binding and steroidogenic acute regulatory protein expression during pregnancy. *J Mol Endocrinol* 22: 45-54, 1999.

611. Sterneck E, Tessarollo L and Johnson PF. An essential role for C/EBPbeta in female reproduction. *Genes Dev* 11: 2153-2162, 1997.
612. Sterneck E, Tessarollo L and Johnson PF. An essential role for C/EBPbeta in female reproduction. *Genes Dev* 11: 2153-2162, 1997.
613. Stocco C. In vivo and in vitro inhibition of cyp19 gene expression by prostaglandin F2alpha in murine luteal cells: implication of GATA-4. *Endocrinology* 145: 4957-4966, 2004.
614. Stocco C. In vivo and in vitro inhibition of cyp19 gene expression by prostaglandin F2alpha in murine luteal cells: implication of GATA-4. *Endocrinology* 145: 4957-4966, 2004.
615. Stocco C, Callegari E and Gibori G. Opposite effect of prolactin and prostaglandin F(2 alpha) on the expression of luteal genes as revealed by rat cDNA expression array. *Endocrinology* 142: 4158-4161, 2001.
616. Stocco C, Callegari E and Gibori G. Opposite effect of prolactin and prostaglandin F(2 alpha) on the expression of luteal genes as revealed by rat cDNA expression array. *Endocrinology* 142: 4158-4161, 2001.
617. Stocco C, Callegari E and Gibori G. Opposite effect of prolactin and prostaglandin F(2 alpha) on the expression of luteal genes as revealed by rat cDNA expression array. *Endocrinology* 142: 4158-4161, 2001.
618. Stocco C, Djiane J and Gibori G. Prostaglandin F(2alpha) (PGF(2alpha)) and prolactin signaling: PGF(2alpha)-mediated inhibition of prolactin receptor expression in the Corpus luteum. *Endocrinology* 144: 3301-3305, 2003.
619. Stocco C, Telleria C and Gibori G. The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function and Regression. *Endocr Rev* 2006.
620. Stocco C, Telleria C and Gibori G. The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function and Regression. *Endocr Rev* 2006.
621. Stocco C, Telleria C and Gibori G. The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function and Regression. *Endocr Rev* 2006.
622. Stocco C, Telleria C and Gibori G. The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function and Regression. *Endocr Rev* 2006.
623. Stocco C, Telleria C and Gibori G. The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function and Regression. *Endocr Rev* 2006.
624. Stocco C, Telleria C and Gibori G. The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function and Regression. *Endocr Rev* 2006.
625. Stocco C, Telleria C and Gibori G. The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function and Regression. *Endocr Rev* 2006.
626. Stocco C, Telleria C and Gibori G. The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function and Regression. *Endocr Rev* 2006.
627. Stocco C, Telleria C and Gibori G. The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function and Regression. *Endocr Rev* 2006.
628. Stocco C, Telleria C and Gibori G. The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function and Regression. *Endocr Rev* 2006.
629. Stocco C, Telleria C and Gibori G. The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function and Regression. *Endocr Rev* 2006.
630. Stocco C, Telleria C and Gibori G. The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function and Regression. *Endocr Rev* 2006.

631. Stocco C, Telleria C and Gibori G. The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function and Regression. *Endocr Rev* 2006.
632. Stocco C, Telleria C and Gibori G. The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function and Regression. *Endocr Rev* 2006.
633. Stocco C, Telleria C and Gibori G. The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function and Regression. *Endocr Rev* 2006.
634. Stocco C, Telleria C and Gibori G. The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function and Regression. *Endocr Rev* 2006.
635. Stocco C, Telleria C and Gibori G. The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function and Regression. *Endocr Rev* 2006.
636. Stocco C, Telleria C and Gibori G. The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function and Regression. *Endocr Rev* 2006.
637. Stocco C, Telleria C and Gibori G. The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function and Regression. *Endocr Rev* 2006.
638. Stocco CO, Chedrese J and Deis RP. Luteal expression of cytochrome P450 side-chain cleavage, steroidogenic acute regulatory protein, 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase genes in late pregnant rats: effect of luteinizing hormone and RU486. *Biol Reprod* 65: 1114-1119, 2001.
639. Stocco CO and Deis RP. Luteolytic effect of LH: inhibition of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and stimulation of 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase luteal activities in late pregnant rats. *J Endocrinol* 150: 423-429, 1996.
640. Stocco CO and Deis RP. Luteolytic effect of LH: inhibition of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and stimulation of 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase luteal activities in late pregnant rats. *J Endocrinol* 150: 423-429, 1996.
641. Stocco CO and Deis RP. Luteolytic effect of LH: inhibition of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and stimulation of 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase luteal activities in late pregnant rats. *J Endocrinol* 150: 423-429, 1996.
642. Stocco CO and Deis RP. Participation of intraluteal progesterone and prostaglandin F2 alpha in LH-induced luteolysis in pregnant rat. *J Endocrinol* 156: 253-259, 1998.
643. Stocco CO and Deis RP. Luteinizing hormone inhibits conversion of pregnenolone to progesterone in luteal cells from rats on day 19 of pregnancy. *Biol Reprod* 60: 729-732, 1999.
644. Stocco CO, Lau LF and Gibori G. A calcium/calmodulin-dependent activation of ERK1/2 mediates JunD phosphorylation and induction of nur77 and 20alpha-hsd genes by prostaglandin F2alpha in ovarian cells. *J Biol Chem* 277: 3293-3302, 2002.
645. Stocco CO, Lau LF and Gibori G. A calcium/calmodulin-dependent activation of ERK1/2 mediates JunD phosphorylation and induction of nur77 and 20alpha-hsd genes by prostaglandin F2alpha in ovarian cells. *J Biol Chem* 277: 3293-3302, 2002.
646. Stocco CO, Lau LF and Gibori G. A calcium/calmodulin-dependent activation of ERK1/2 mediates JunD phosphorylation and induction of nur77 and 20alpha-hsd genes by prostaglandin F2alpha in ovarian cells. *J Biol Chem* 277: 3293-3302, 2002.
647. Stocco CO, Lau LF and Gibori G. A calcium/calmodulin-dependent activation of ERK1/2 mediates JunD phosphorylation and induction of nur77 and 20alpha-hsd genes by prostaglandin F2alpha in ovarian cells. *J Biol Chem* 277: 3293-3302, 2002.
648. Stocco CO, Lau LF and Gibori G. A calcium/calmodulin-dependent activation of ERK1/2 mediates JunD phosphorylation and induction of nur77 and 20alpha-hsd genes by prostaglandin F2alpha in ovarian cells. *J Biol Chem* 277: 3293-3302, 2002.

649. Stocco CO, Zhong L, Sugimoto Y, Ichikawa A, Lau LF and Gibori G. Prostaglandin F2alpha-induced expression of 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase involves the transcription factor NUR77. *J Biol Chem* 275: 37202-37211, 2000.
650. Stocco CO, Zhong L, Sugimoto Y, Ichikawa A, Lau LF and Gibori G. Prostaglandin F2alpha-induced expression of 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase involves the transcription factor NUR77. *J Biol Chem* 275: 37202-37211, 2000.
651. Stocco CO, Zhong L, Sugimoto Y, Ichikawa A, Lau LF and Gibori G. Prostaglandin F2alpha-induced expression of 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase involves the transcription factor NUR77. *J Biol Chem* 275: 37202-37211, 2000.
652. Stocco CO, Zhong L, Sugimoto Y, Ichikawa A, Lau LF and Gibori G. Prostaglandin F2alpha-induced expression of 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase involves the transcription factor NUR77. *J Biol Chem* 275: 37202-37211, 2000.
653. Stouffer RL. Progesterone as a mediator of gonadotrophin action in the corpus luteum: beyond steroidogenesis. *Hum Reprod Update* 9: 99-117, 2003.
654. Stouffer RL. Progesterone as a mediator of gonadotrophin action in the corpus luteum: beyond steroidogenesis. *Hum Reprod Update* 9: 99-117, 2003.
655. Stouffer RL. Progesterone as a mediator of gonadotrophin action in the corpus luteum: beyond steroidogenesis. *Hum Reprod Update* 9: 99-117, 2003.
656. Stouffer RL. Progesterone as a mediator of gonadotrophin action in the corpus luteum: beyond steroidogenesis. *Hum Reprod Update* 9: 99-117, 2003.
657. Stouffer RL. The structure, function and regulation of the corpus luteum. In: *Physiology of Reproduction*, edited by Neill JD. San Diego, California: Elsevier, 2006.
658. Strauss JF, III, Schuler LA, Rosenblum MF and Tanaka T. Cholesterol metabolism by ovarian tissue. *Adv Lipid Res* 18: 99-157, 1981.
659. Strauss JF, III and Stambaugh RL. Induction of 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in rat corpora lutea of pregnancy by prostaglandin F-2 alpha. *Prostaglandins* 5: 73-85, 1974.
660. Strott CA, Cargille CM, Ross GT and Lipsett MB. The short luteal phase. *J Clin Endocrinol Metab* 30: 246-251, 1970.
661. Sugawara T, Holt JA, Driscoll D, Strauss JFI, Lin D, Miller WL, Patterson D, Clancy KP, Hart IM, Clark BJ and Stocco DM. Human steroidogenic acute regulatory protein: functional activity in COS-1 cells, tissue-specific expression, and mapping of the gene to 8p11-2 and pseudogene to chromosome 13. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 4778-4782, 1995.
662. Sugden PH. Signalling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. *Ann Med* 33: 611-622, 2001.
663. Sugino N, Suzuki T, Kashida S, Karube A, Takiguchi S and Kato H. Expression of Bcl-2 and Bax in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy: regulation by human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4379-4386, 2000.
664. Sugino N, Suzuki T, Kashida S, Karube A, Takiguchi S and Kato H. Expression of Bcl-2 and Bax in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy: regulation by human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4379-4386, 2000.
665. Sugino N, Suzuki T, Kashida S, Karube A, Takiguchi S and Kato H. Expression of Bcl-2 and Bax in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy: regulation by human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4379-4386, 2000.
666. Sugino N, Suzuki T, Kashida S, Karube A, Takiguchi S and Kato H. Expression of Bcl-2 and Bax in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy: regulation by human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4379-4386, 2000.

667. Sugino N, Telleria CM and Gibori G. Progesterone inhibits 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase expression in the rat corpus luteum through the glucocorticoid receptor. *Endocrinology* 138: 4497-4500, 1997.
668. Sugino N, Telleria CM and Gibori G. Progesterone inhibits 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase expression in the rat corpus luteum through the glucocorticoid receptor. *Endocrinology* 138: 4497-4500, 1997.
669. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Brenner C, Larochette N, Prevost MC, Alzari PM and Kroemer G. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med* 189: 381-394, 1999.
670. Suter J, Hendry IR, Ndjountche L, Obholz K, Pru JK, Davis JS and Rueda BR. Mediators of interferon gamma-initiated signaling in bovine luteal cells. *Biol Reprod* 64: 1481-1486, 2001.
671. Suter J, Hendry IR, Ndjountche L, Obholz K, Pru JK, Davis JS and Rueda BR. Mediators of interferon gamma-initiated signaling in bovine luteal cells. *Biol Reprod* 64: 1481-1486, 2001.
672. Suzuki T, Sasano H, Takaya R, Fukaya T, Yajima A, Date F and Nagura H. Leukocytes in normal-cycling human ovaries: immunohistochemical distribution and characterization. *Hum Reprod* 13: 2186-2191, 1998.
673. Svensson EC, Markstrom E, Shao R, Andersson M and Billig H. Progesterone receptor antagonists Org 31710 and RU 486 increase apoptosis in human periovulatory granulosa cells. *Fertil Steril* 76: 1225-1231, 2001.
674. Svensson EC, Markstrom E, Shao R, Andersson M and Billig H. Progesterone receptor antagonists Org 31710 and RU 486 increase apoptosis in human periovulatory granulosa cells. *Fertil Steril* 76: 1225-1231, 2001.
675. Svensson EC, Markstrom E, Shao R, Andersson M and Billig H. Progesterone receptor antagonists Org 31710 and RU 486 increase apoptosis in human periovulatory granulosa cells. *Fertil Steril* 76: 1225-1231, 2001.
676. Svensson EC, Markstrom E, Shao R, Andersson M and Billig H. Progesterone receptor antagonists Org 31710 and RU 486 increase apoptosis in human periovulatory granulosa cells. *Fertil Steril* 76: 1225-1231, 2001.
677. Tai CJ, Kang SK, Tzeng CR and Leung PC. Adenosine triphosphate activates mitogen-activated protein kinase in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 142: 1554-1560, 2001.
678. Tai CJ, Kang SK, Tzeng CR and Leung PC. Adenosine triphosphate activates mitogen-activated protein kinase in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 142: 1554-1560, 2001.
679. Takiguchi S, Sugino N, Esato K, Karube-Harada A, Sakata A, Nakamura Y, Ishikawa H and Kato H. Differential regulation of apoptosis in the corpus luteum of pregnancy and newly formed corpus luteum after parturition in rats. *Biol Reprod* 70: 313-318, 2004.
680. Takiguchi S, Sugino N, Esato K, Karube-Harada A, Sakata A, Nakamura Y, Ishikawa H and Kato H. Differential regulation of apoptosis in the corpus luteum of pregnancy and newly formed corpus luteum after parturition in rats. *Biol Reprod* 70: 313-318, 2004.
681. Takiguchi S, Sugino N, Esato K, Karube-Harada A, Sakata A, Nakamura Y, Ishikawa H and Kato H. Differential regulation of apoptosis in the corpus luteum of pregnancy and newly formed corpus luteum after parturition in rats. *Biol Reprod* 70: 313-318, 2004.
682. Takiguchi S, Sugino N, Esato K, Karube-Harada A, Sakata A, Nakamura Y, Ishikawa H and Kato H. Differential regulation of apoptosis in the corpus luteum of pregnancy and newly formed corpus luteum after parturition in rats. *Biol Reprod* 70: 313-318, 2004.
683. Takiguchi S, Sugino N, Esato K, Karube-Harada A, Sakata A, Nakamura Y, Ishikawa H and Kato H. Differential regulation of apoptosis in the corpus luteum of pregnancy and newly formed corpus luteum after parturition in rats. *Biol Reprod* 70: 313-318, 2004.

684. Tamura H and Greenwald GS. Angiogenesis and its hormonal control in the corpus luteum of the pregnant rat. *Biol Reprod* 36: 1149-1154, 1987.
685. Taniguchi H, Yokomizo Y and Okuda K. Fas-Fas ligand system mediates luteal cell death in bovine corpus luteum. *Biol Reprod* 66: 754-759, 2002.
686. Taniguchi H, Yokomizo Y and Okuda K. Fas-Fas ligand system mediates luteal cell death in bovine corpus luteum. *Biol Reprod* 66: 754-759, 2002.
687. Taniguchi H, Yokomizo Y and Okuda K. Fas-Fas ligand system mediates luteal cell death in bovine corpus luteum. *Biol Reprod* 66: 754-759, 2002.
688. Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A and Tanaka N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol* 19: 623-655, 2001.
689. Taya K and Greenwald GS. In vivo and in vitro ovarian steroidogenesis in the pregnant rat. *Biol Reprod* 25: 683-691, 1981.
690. Taya K and Greenwald GS. In vivo and in vitro ovarian steroidogenesis in the long term hypophysectomized rat. *Endocrinology* 110: 390-397, 1982.
691. Taya K and Greenwald GS. In vivo and in vitro ovarian steroidogenesis in the long term hypophysectomized rat. *Endocrinology* 110: 390-397, 1982.
692. Tedeschi C, Hazum E, Kokia E, Ricciarelli E, Adashi EY and Payne DW. Endothelin-1 as a luteinization inhibitor: inhibition of rat granulosa cell progesterone accumulation via selective modulation of key steroidogenic steps affecting both progesterone formation and degradation. *Endocrinology* 131: 2476-2478, 1992.
693. Telleria CM and Deis RP. Effect of RU486 on ovarian progesterone production at pro-oestrus and during pregnancy: a possible dual regulation of the biosynthesis of progesterone. *J Reprod Fertil* 102: 379-384, 1994.
694. Telleria CM, Goyeneche AA, Cavicchia JC, Stati AO and Deis RP. Apoptosis induced by antigestagen RU486 in rat corpus luteum of pregnancy. *Endocrine* 15: 147-155, 2001.
695. Telleria CM, Goyeneche AA, Cavicchia JC, Stati AO and Deis RP. Apoptosis induced by antigestagen RU486 in rat corpus luteum of pregnancy. *Endocrine* 15: 147-155, 2001.
696. Telleria CM, Goyeneche AA, Cavicchia JC, Stati AO and Deis RP. Apoptosis induced by antigestagen RU486 in rat corpus luteum of pregnancy. *Endocrine* 15: 147-155, 2001.
697. Telleria CM, Parmer TG, Zhong L, Clarke DL, Albarracin CT, Duan WR, Linzer DI and Gibori G. The different forms of the prolactin receptor in the rat corpus luteum: developmental expression and hormonal regulation in pregnancy. *Endocrinology* 138: 4812-4820, 1997.
698. Telleria CM, Parmer TG, Zhong L, Clarke DL, Albarracin CT, Duan WR, Linzer DI and Gibori G. The different forms of the prolactin receptor in the rat corpus luteum: developmental expression and hormonal regulation in pregnancy. *Endocrinology* 138: 4812-4820, 1997.
699. Telleria CM, Stocco CO, Stati AO and Deis RP. Progesterone receptor is not required for progesterone action in the rat corpus luteum of pregnancy. *Steroids* 64: 760-766, 1999.
700. Telleria CM, Stocco CO, Stati AO and Deis RP. Progesterone receptor is not required for progesterone action in the rat corpus luteum of pregnancy. *Steroids* 64: 760-766, 1999.
701. Telleria CM, Stocco CO, Stati AO and Deis RP. Progesterone receptor is not required for progesterone action in the rat corpus luteum of pregnancy. *Steroids* 64: 760-766, 1999.
702. Telleria CM, Stocco CO, Stati AO and Deis RP. Progesterone receptor is not required for progesterone action in the rat corpus luteum of pregnancy. *Steroids* 64: 760-766, 1999.

703. Telleria CM, Zhong L, Deb S, Srivastava RK, Park KS, Sugino N, Park-Sarge OK and Gibori G. Differential expression of the estrogen receptors alpha and beta in the rat corpus luteum of pregnancy: regulation by prolactin and placental lactogens. *Endocrinology* 139: 2432-2442, 1998.
704. Telleria CM, Zhong L, Deb S, Srivastava RK, Park KS, Sugino N, Park-Sarge OK and Gibori G. Differential expression of the estrogen receptors alpha and beta in the rat corpus luteum of pregnancy: regulation by prolactin and placental lactogens. *Endocrinology* 139: 2432-2442, 1998.
705. Telleria CM, Zhong L, Deb S, Srivastava RK, Park KS, Sugino N, Park-Sarge OK and Gibori G. Differential expression of the estrogen receptors alpha and beta in the rat corpus luteum of pregnancy: regulation by prolactin and placental lactogens. *Endocrinology* 139: 2432-2442, 1998.
706. Terranova PF, Hunter VJ, Roby KF and Hunt JS. Tumor necrosis factor-alpha in the female reproductive tract. *Proc Soc Exp Biol Med* 209: 325-342, 1995.
707. Tesone M, Ladenheim RG, Chiauzzi VA and Charreau EH. Effect of prolactin on the steroidogenic response of rat luteal cells. *Mol Cell Endocrinol* 36: 187-194, 1984.
708. Tesone M, Stouffer RL, Borman SM, Hennebold JD and Molskness TA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) production by the monkey corpus luteum during the menstrual cycle: isoform-selective messenger RNA expression in vivo and hypoxia-regulated protein secretion in vitro. *Biol Reprod* 73: 927-934, 2005.
709. Tessier C, Deb S, Prigent-Tessier A, Ferguson-Gottschall S, Gibori GB, Shiu RP and Gibori G. Estrogen receptors alpha and beta in rat decidua cells: cell-specific expression and differential regulation by steroid hormones and prolactin. *Endocrinology* 141: 3842-3851, 2000.
710. Tessier C, Prigent-Tessier A, Ferguson-Gottschall S, Gu Y and Gibori G. PRL antiapoptotic effect in the rat decidua involves the PI3K/protein kinase B-mediated inhibition of caspase-3 activity. *Endocrinology* 142: 4086-4094, 2001.
711. Tessier C, Prigent-Tessier A, Ferguson-Gottschall S, Gu Y and Gibori G. PRL antiapoptotic effect in the rat decidua involves the PI3K/protein kinase B-mediated inhibition of caspase-3 activity. *Endocrinology* 142: 4086-4094, 2001.
712. Thibault C, Levasseur MC and Hunter RHF. *Reproduction in Mammals and Man*. Ellipses Editorial, 1993.
713. Tilly JL, Pru JK and Rueda BR. Apoptosis in Ovarian Development, function, and failure. In: *The Ovary*, edited by Leung P.C.K and Adashi E.Y. San Diego: Elsevier Inc, Academic Press, 2004, p. 321-352.
714. Tilly JL, Tilly KI, Kenton ML and Johnson AL. Expression of members of the bcl-2 gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-xlong messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 136: 232-241, 1995.
715. Tognetti T, Estevez A, Luchetti CG, Sander V, Franchi AM and Motta AB. Relationship between endothelin 1 and nitric oxide system in the corpus luteum regression. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 69: 359-364, 2003.
716. Townson DH, O'Connor CL and Pru JK. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and distribution of immune cell populations in the bovine corpus luteum throughout the estrous cycle. *Biol Reprod* 66: 361-366, 2002.
717. Townson DH, Wang XJ, Keyes PL, Kostyo JL and Stocco DM. Expression of the steroidogenic acute regulatory protein in the corpus luteum of the rabbit: dependence upon the luteotropic hormone, estradiol-17 beta. *Biol Reprod* 55: 868-874, 1996.
718. Trzeciak WH and Boyd GS. Activation of cholesteryl esterase in bovine adrenal cortex. *Eur J Biochem* 46: 201-207, 1974.
719. Tsai SJ and Wiltbank MC. Differential effects of prostaglandin F2alpha on in vitro luteinized bovine granulosa cells. *Reproduction* 122: 245-253, 2001.

720. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E and Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228: 1440-1443, 1985.
721. Tsutsumi Y and Kamoshida S. Pitfalls and caveats in histochemically demonstrating apoptosis. *Acta Histochem Cytochem* 36: 271-280, 2003.
722. Uma J, Muraly P, Verma-Kumar S and Medhamurthy R. Determination of onset of apoptosis in granulosa cells of the preovulatory follicles in the bonnet monkey (*Macaca radiata*): correlation with mitogen-activated protein kinase activities. *Biol Reprod* 69: 1379-1387, 2003.
723. Usadi RS and Fritz MA. Luteal Dysfunction. In: *The Ovary*, edited by Leung P.C.K and Adashi EY. San Diego: Elsevier Inc, Academic Press, 2004, p. 523-540.
724. Vale W, Hsueh AJ and Rivier C. The inhibin/activin family of hormones and growth factors. In: *Peptide Growth Factors and Their Receptors II*, edited by Sporn MB and Roberts AB. New York: Springer Verlag, 1990, p. 211-248.
725. Vanderhyden BC and Tonary AM. Differential regulation of progesterone and estradiol production by mouse cumulus and mural granulosa cells by A factor(s) secreted by the oocyte. *Biol Reprod* 53: 1243-1250, 1995.
726. Vanhaesebroeck B, Reed JC, De Valck D, Grooten J, Miyashita T, Tanaka S, Beyaert R, Van Roy F and Fiers W. Effect of bcl-2 proto-oncogene expression on cellular sensitivity to tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity. *Oncogene* 8: 1075-1081, 1993.
727. Vaskivuo TE, Ottander U, Oduwole O, Isomaa V, Vihko P, Olofsson JI and Tapanainen JS. Role of apoptosis, apoptosis-related factors and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human corpus luteum regression. *Mol Cell Endocrinol* 194: 191-200, 2002.
728. Vaskivuo TE, Ottander U, Oduwole O, Isomaa V, Vihko P, Olofsson JI and Tapanainen JS. Role of apoptosis, apoptosis-related factors and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human corpus luteum regression. *Mol Cell Endocrinol* 194: 191-200, 2002.
729. Vaskivuo TE, Ottander U, Oduwole O, Isomaa V, Vihko P, Olofsson JI and Tapanainen JS. Role of apoptosis, apoptosis-related factors and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human corpus luteum regression. *Mol Cell Endocrinol* 194: 191-200, 2002.
730. Vega M, Urrutia L, Iniguez G, Gabler F, Devoto L and Johnson MC. Nitric oxide induces apoptosis in the human corpus luteum in vitro. *Mol Hum Reprod* 6: 681-687, 2000.
731. Veitia RA, Gluckman E, Fellous M and Soulier J. Recovery of female fertility after chemotherapy, irradiation, and bone marrow allograft: further evidence against massive oocyte regeneration by bone marrow-derived germline stem cells. *Stem Cells* 25: 1334-1335, 2007.
732. Vonnahme KA, Redmer DA, Borowczyk E, Bilski JJ, Luther JS, Johnson ML, Reynolds LP and Grazul-Bilska AT. Vascular composition, apoptosis, and expression of angiogenic factors in the corpus luteum during prostaglandin F2alpha-induced regression in sheep. *Reproduction* 131: 1115-1126, 2006.
733. Wade RL, Van Andel RA, Rice SG, Banka CL and Dyer CA. Hepatic lipase deficiency attenuates mouse ovarian progesterone production leading to decreased ovulation and reduced litter size. *Biol Reprod* 66: 1076-1082, 2002.
734. Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV and Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 17: 331-367, 1999.
735. Wang C, Hsueh AJ and Erickson GF. Induction of functional prolactin receptors by follicle-stimulating hormone in rat granulosa cells in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 254: 11330-11336, 1979.
736. Wang CY, Mayo MW and Baldwin AS, Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 274: 784-787, 1996.

737. Wang HZ, Lu SH, Han XJ, Zhou W, Sheng WX, Sun ZD and Gong YT. Inhibitory effect of interferon and tumor necrosis factor on human luteal function in vitro. *Fertil Steril* 58: 941-945, 1992.
738. Wang HZ, Lu SH, Han XJ, Zhou W, Sheng WX, Sun ZD and Gong YT. Inhibitory effect of interferon and tumor necrosis factor on human luteal function in vitro. *Fertil Steril* 58: 941-945, 1992.
739. Wang L, Miura M, Bergeron L, Zhu H and Yuan J. Ich-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell* 78: 739-750, 1994.
740. Warshaw ML, Johnson DC, Khan I, Eckstein B and Gibori G. Placental secretion of androgens in the rat. *Endocrinology* 119: 2642-2648, 1986.
741. Weems YS, Lennon E, Uchima T, Raney A, Goto K, Ong A, Zaleski H and Weems CW. Is nitric oxide luteolytic or antiluteolytic? *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 78: 129-138, 2005.
742. Weiland U, Haendeler J, Ihling C, Albus U, Scholz W, Ruetten H, Zeiher AM and Dimmeler S. Inhibition of endogenous nitric oxide synthase potentiates ischemia-reperfusion-induced myocardial apoptosis via a caspase-3 dependent pathway. *Cardiovasc Res* 45: 671-678, 2000.
743. Weist WG, Kidwell WR and Bologh JrK. Progesterone catabolism in the rat ovary: A regulatory mechanism for progestational potency during pregnancy. *Endocrinology* 82: 844-852, 1968.
744. Williams. *Textbook of Endocrinology*. 1998.
745. Williams MT and Marsh JM. Estradiol inhibition of luteinizing hormone-stimulated progesterone synthesis in isolated bovine luteal cells. *Endocrinology* 103: 1611-1618, 1978.
746. Wiltbank J and Casida L. Alteration of ovarian activity by hysterectomy. *J Anim Sci* 15: 1956.
747. Wright MF, Sayre B, Keith Inskip EK and Flores JA. Prostaglandin F(2alpha) regulation of the bovine corpus luteum endothelin system during the early and midluteal phase. *Biol Reprod* 65: 1710-1717, 2001.
748. Wright MF, Sayre B, Keith Inskip EK and Flores JA. Prostaglandin F(2alpha) regulation of the bovine corpus luteum endothelin system during the early and midluteal phase. *Biol Reprod* 65: 1710-1717, 2001.
749. Wu M, Lee H, Bellas RE, Schauer SL, Arsura M, Katz D, FitzGerald MJ, Rothstein TL, Sherr DH and Sonenshein GE. Inhibition of NF-kappaB/Rel induces apoptosis of murine B cells. *EMBO J* 15: 4682-4690, 1996.
750. Wu X, Yao K and Carlson JC. Plasma membrane changes in the rat corpus luteum induced by oxygen radical generation. *Endocrinology* 133: 491-495, 1993.
751. Wulff C, Dickson SE, Duncan WC and Fraser HM. Angiogenesis in the human corpus luteum: simulated early pregnancy by HCG treatment is associated with both angiogenesis and vessel stabilization. *Hum Reprod* 16: 2515-2524, 2001.
752. Wulff C, Wilson H, Largue P, Duncan WC, Armstrong DG and Fraser HM. Angiogenesis in the human corpus luteum: localization and changes in angiopoietins, tie-2, and vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4302-4309, 2000.
753. Yacobi K, Wojtowicz A, Tsafiriri A and Gross A. Gonadotropins enhance caspase-3 and -7 activity and apoptosis in the theca-interstitial cells of rat preovulatory follicles in culture. *Endocrinology* 145: 1943-1951, 2004.
754. Yadav VK, Lakshmi G and Medhamurthy R. Prostaglandin F2alpha-mediated activation of apoptotic signaling cascades in the corpus luteum during apoptosis: involvement of caspase-activated DNase. *J Biol Chem* 280: 10357-10367, 2005.

755. Yadav VK, Lakshmi G and Medhamurthy R. Prostaglandin F2alpha-mediated activation of apoptotic signaling cascades in the corpus luteum during apoptosis: involvement of caspase-activated DNase. *J Biol Chem* 280: 10357-10367, 2005.
756. Yadav VK, Lakshmi G and Medhamurthy R. Prostaglandin F2alpha-mediated activation of apoptotic signaling cascades in the corpus luteum during apoptosis: involvement of caspase-activated DNase. *J Biol Chem* 280: 10357-10367, 2005.
757. Yadav VK, Lakshmi G and Medhamurthy R. Prostaglandin F2alpha-mediated activation of apoptotic signaling cascades in the corpus luteum during apoptosis: involvement of caspase-activated DNase. *J Biol Chem* 280: 10357-10367, 2005.
758. Yadav VK, Lakshmi G and Medhamurthy R. Prostaglandin F2alpha-mediated activation of apoptotic signaling cascades in the corpus luteum during apoptosis: involvement of caspase-activated DNase. *J Biol Chem* 280: 10357-10367, 2005.
759. Yadav VK, Lakshmi G and Medhamurthy R. Prostaglandin F2alpha-mediated activation of apoptotic signaling cascades in the corpus luteum during apoptosis: involvement of caspase-activated DNase. *J Biol Chem* 280: 10357-10367, 2005.
760. Yadav VK, Lakshmi G and Medhamurthy R. Prostaglandin F2alpha-mediated activation of apoptotic signaling cascades in the corpus luteum during apoptosis: involvement of caspase-activated DNase. *J Biol Chem* 280: 10357-10367, 2005.
761. Yadav VK, Lakshmi G and Medhamurthy R. Prostaglandin F2alpha-mediated activation of apoptotic signaling cascades in the corpus luteum during apoptosis: involvement of caspase-activated DNase. *J Biol Chem* 280: 10357-10367, 2005.
762. Yadav VK, Lakshmi G and Medhamurthy R. Prostaglandin F2alpha-mediated activation of apoptotic signaling cascades in the corpus luteum during apoptosis: involvement of caspase-activated DNase. *J Biol Chem* 280: 10357-10367, 2005.
763. Yadav VK, Lakshmi G and Medhamurthy R. Prostaglandin F2alpha-mediated activation of apoptotic signaling cascades in the corpus luteum during apoptosis: involvement of caspase-activated DNase. *J Biol Chem* 280: 10357-10367, 2005.
764. Yadav VK, Lakshmi G and Medhamurthy R. Prostaglandin F2alpha-mediated activation of apoptotic signaling cascades in the corpus luteum during apoptosis: involvement of caspase-activated DNase. *J Biol Chem* 280: 10357-10367, 2005.
765. Yadav VK, Sudhagar RR and Medhamurthy R. Apoptosis during spontaneous and prostaglandin F(2alpha)-induced luteal regression in the buffalo cow (*Bubalus bubalis*): involvement of mitogen-activated protein kinases. *Biol Reprod* 67: 752-759, 2002.
766. Yamamoto H, Endo T, Kiya T, Goto T, Sagae S, Ito E, Watanabe H and Kudo R. Activation of phospholipase D by prostaglandin F2 alpha in rat luteal cells and effects of inhibitors of arachidonic acid metabolism. *Prostaglandins* 50: 201-211, 1995.
767. Yan Z, Hunter V, Weed J, Hutchison S, Lyles R and Terranova P. Tumor necrosis factor-alpha alters steroidogenesis and stimulates proliferation of human ovarian granulosa cells in vitro. *Fertil Steril* 59: 332-338, 1993.
768. Yazawa T, Mizutani T, Yamada K, Kawata H, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, Shou Z and Miyamoto K. Involvement of cyclic adenosine 5'-monophosphate response element-binding protein, steroidogenic factor 1, and Dax-1 in the regulation of gonadotropin-inducible ovarian transcription factor 1 gene expression by follicle-stimulating hormone in ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 144: 1920-1930, 2003.
769. Yoshinaga K. Ovarian progesterin secretion in lactating rats: effect of intrabursal injection of prolactin antiserum, prolactin and LH. *Endocrinology* 94: 829-834, 1974.
770. Young FM, Illingworth PJ, Lunn SF, Harrison DJ and Fraser HM. Cell death during luteal regression in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *J Reprod Fertil* 111: 109-119, 1997.

771. Young FM, Illingworth PJ, Lunn SF, Harrison DJ and Fraser HM. Cell death during luteal regression in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *J Reprod Fertil* 111: 109-119, 1997.
772. Young JE, Friedman CI and Danforth DR. Interleukin-1 beta modulates prostaglandin and progesterone production by primate luteal cells in vitro. *Biol Reprod* 56: 663-667, 1997.
773. Young JE, Friedman CI and Danforth DR. Interleukin-1 beta modulates prostaglandin and progesterone production by primate luteal cells in vitro. *Biol Reprod* 56: 663-667, 1997.
774. Young JR and Jaffe RB. Strength-duration characteristics of estrogen effects on gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in women. II. Effects of varying concentrations of estradiol. *J Clin Endocrinol Metab* 42: 432-442, 1976.
775. Young KA, Hennebold JD and Stouffer RL. Dynamic expression of mRNAs and proteins for matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in the primate corpus luteum during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 8: 833-840, 2002.
776. Young KA, Hennebold JD and Stouffer RL. Dynamic expression of mRNAs and proteins for matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in the primate corpus luteum during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 8: 833-840, 2002.
777. Young KA, Hennebold JD and Stouffer RL. Dynamic expression of mRNAs and proteins for matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in the primate corpus luteum during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 8: 833-840, 2002.
778. Young KA and Stouffer RL. Gonadotropin and steroid regulation of matrix metalloproteinases and their endogenous tissue inhibitors in the developed corpus luteum of the rhesus monkey during the menstrual cycle. *Biol Reprod* 70: 244-252, 2004.
779. Young KA and Stouffer RL. Gonadotropin and steroid regulation of matrix metalloproteinases and their endogenous tissue inhibitors in the developed corpus luteum of the rhesus monkey during the menstrual cycle. *Biol Reprod* 70: 244-252, 2004.
780. Young KA and Stouffer RL. Gonadotropin and steroid regulation of matrix metalloproteinases and their endogenous tissue inhibitors in the developed corpus luteum of the rhesus monkey during the menstrual cycle. *Biol Reprod* 70: 244-252, 2004.
781. Young KA and Stouffer RL. Gonadotropin and steroid regulation of matrix metalloproteinases and their endogenous tissue inhibitors in the developed corpus luteum of the rhesus monkey during the menstrual cycle. *Biol Reprod* 70: 244-252, 2004.
782. Young KA and Stouffer RL. Gonadotropin and steroid regulation of matrix metalloproteinases and their endogenous tissue inhibitors in the developed corpus luteum of the rhesus monkey during the menstrual cycle. *Biol Reprod* 70: 244-252, 2004.
783. Young KA and Stouffer RL. Gonadotropin and steroid regulation of matrix metalloproteinases and their endogenous tissue inhibitors in the developed corpus luteum of the rhesus monkey during the menstrual cycle. *Biol Reprod* 70: 244-252, 2004.
784. Young KA, Tumlinson B and Stouffer RL. ADAMTS-1/METH-1 and TIMP-3 expression in the primate corpus luteum: divergent patterns and stage-dependent regulation during the natural menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 10: 559-565, 2004.
785. Young KA, Tumlinson B and Stouffer RL. ADAMTS-1/METH-1 and TIMP-3 expression in the primate corpus luteum: divergent patterns and stage-dependent regulation during the natural menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 10: 559-565, 2004.
786. Yuan W and Giudice LC. Programmed cell death in human ovary is a function of follicle and corpus luteum status. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 3148-3155, 1997.
787. Yuan W and Giudice LC. Programmed cell death in human ovary is a function of follicle and corpus luteum status. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 3148-3155, 1997.

788. Yuan W and Giudice LC. Programmed cell death in human ovary is a function of follicle and corpus luteum status. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 3148-3155, 1997.
789. Zaidi J, Jurkovic D, Campbell S, Collins W, McGregor A and Tan SL. Luteinized unruptured follicle: morphology, endocrine function and blood flow changes during the menstrual cycle. *Hum Reprod* 10: 44-49, 1995.
790. Zeleznik AJ, Midgley AR, Jr. and 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: 818-825, 1974.
791. Zeleznik AJ, Schuler HM and Reichert LE, Jr. Gonadotropin-binding sites in the rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotropin to the preovulatory follicle. *Endocrinology* 109: 356-362, 1981.
792. Zhang B, Yan L, Tsang PC and Moses MA. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) expression and regulation by tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) in the bovine corpus luteum. *Mol Reprod Dev* 70: 122-132, 2005.
793. Zhao Y, Burbach JA, Roby KF, Terranova PF and Brannian JD. Macrophages are the major source of tumor necrosis factor alpha in the porcine corpus luteum. *Biol Reprod* 59: 1385-1391, 1998.
794. Zhao Y, Burbach JA, Roby KF, Terranova PF and Brannian JD. Macrophages are the major source of tumor necrosis factor alpha in the porcine corpus luteum. *Biol Reprod* 59: 1385-1391, 1998.
795. Zhivotovsky B, Samali A, Gahm A and Orrenius S. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death Differ* 6: 644-651, 1999.
796. Zhong L, Parmer TG, Robertson MC and Gibori G. Prolactin-mediated inhibition of 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase gene expression and the tyrosine kinase system. *Biochem Biophys Res Commun* 235: 587-592, 1997.
797. Zhong L, Parmer TG, Robertson MC and Gibori G. Prolactin-mediated inhibition of 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase gene expression and the tyrosine kinase system. *Biochem Biophys Res Commun* 235: 587-592, 1997.
798. Zhong L, Parmer TG, Robertson MC and Gibori G. Prolactin-mediated inhibition of 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase gene expression and the tyrosine kinase system. *Biochem Biophys Res Commun* 235: 587-592, 1997.
799. Zhong L, Parmer TG, Robertson MC and Gibori G. Prolactin-mediated inhibition of 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase gene expression and the tyrosine kinase system. *Biochem Biophys Res Commun* 235: 587-592, 1997.
800. Zhong L, Parmer TG, Robertson MC and Gibori G. Prolactin-mediated inhibition of 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase gene expression and the tyrosine kinase system. *Biochem Biophys Res Commun* 235: 587-592, 1997.