

Tesis Doctoral

Regulación de la luteólisis funcional y estructural. Rol de la esfingosina 1-fosfato (S1P) y del sistema Notch

Hernández, Silvia Fátima

2012

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

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

Cita tipo APA:

Hernández, Silvia Fátima. (2012). Regulación de la luteólisis funcional y estructural. Rol de la esfingosina 1-fosfato (S1P) y del sistema Notch. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Hernández, Silvia Fátima. "Regulación de la luteólisis funcional y estructural. Rol de la esfingosina 1-fosfato (S1P) y del sistema Notch". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**Regulación de la luteólisis funcional y estructural. Rol de la esfingosina
1- fosfato (S1P) y del sistema Notch**

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

**MEDICA VETERINARIA
SILVIA FATIMA HERNANDEZ**

Director de tesis: Dra. Marta Tesone

Consejero de estudios: Dra. Marta Tesone

Lugar de trabajo: Laboratorio de Fisiología Ovárica. Instituto de Biología y
Medicina Experimental (IByME) –CONICET

Buenos Aires, 2012

REGULACIÓN DE LA LUTEÓLISIS FUNCIONAL Y ESTRUCTURAL. ROL DE LA ESFINGOSINA 1- FOSFATO (S1P) Y DEL SISTEMA NOTCH

Resumen

El primer capítulo de esta tesis se diseñó con el objetivo de estudiar si la administración local de S1P en el ovario de ratas preñadas bloquea efectivamente la luteólisis inducida por prostaglandina F2 alfa (PGF2 α).

Se utilizaron ratas preñadas en el día 19 de la gestación a las cuales se les administró en forma local S1P o su vehículo y dos horas después una dosis luteolítica de PGF2 α . Los animales se sacrificaron a las 0, 4 y 36 hs de la PGF2 α . Se midió la actividad de las caspasas que contribuyen a los eventos iniciales (caspasa -2, -8 y -9) y finales (caspasa-3) de la apoptosis en grupos de CLs de cada animal. Se evaluó también la expresión de las formas fosforiladas de AKT y ERK y los niveles del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) mediante la técnica de ELISA. Además se estudió la muerte celular por la técnica de ME y TUNEL y la funcionalidad luteal midiendo como parámetro la progesterona (P4) luteal.

La actividad de la caspasas -2, -3 y -8 aumentó significativamente a las 4 horas de la inyección de PGF2 α , no así la actividad de caspasa -9. Además aumentó el número de células apoptóticas. De forma contraria la expresión de pAKT y TNF- α y el contenido de P4 luteal disminuyó considerablemente.

El tratamiento con S1P pudo prevenir el incremento en la actividad de las caspasas -2, -8 y -3 inducido por PGF2 α , redujo el número de células apoptóticas, restauró la funcionalidad luteal y aumentó la expresión de pAKT, pERK y TNF- α .

El tratamiento con PGF2 α incrementó el número de células luteales con signos avanzados de apoptosis, (por ejemplo: fragmentación nuclear, condensación de la cromatina y la presencia de cuerpos apoptóticos) a las 36 horas de la PGF2 α . En cambio S1P pudo suprimir estos efectos y además aumentó la densidad vascular en los CL.

Estos resultados demuestran, por primera vez, que la administración in vivo de S1P es capaz de bloquear la acción luteolítica de la PGF2 α en ratas preñadas.

El segundo capítulo de esta tesis se diseñó con el objetivo de estudiar la expresión y la localización celular de los receptores Notch1, Notch4 y el ligando Dll4 en CL de ratas durante la gestación y la luteólisis inducida por PGF2 α .

También estudiamos el contenido de P4 sérica y de proteínas luteales relacionadas a la apoptosis luego de la administración local de un inhibidor de esta vía llamado DAPT (N-[N-(3,5-difluorophenacetyl- L-alanyl)]-S-phenylglycine t-butyl ester).

Se detectó marca específica de los receptores NOTCH1 y 4 principalmente en las células luteales grandes y pequeñas. Además la inmunomarcación fue evidente en los núcleos de las células luteales, de forma coincidente con el hecho de que el dominio intracelular de Notch (NICD) una vez activo se transloca al núcleo. Además, se detectó marca citoplasmática difusa para DLL4 en las células luteales grandes y pequeñas, coincidiendo con el hecho de que Dll4 se somete a la degradación proteolítica después de unión al receptor.

La expresión del ARNm de Notch1, Notch4 y Dll4 en CL aislados en el día 19 de preñez se redujo significativamente después de la administración de PGF2 α . En forma coincidente, la PGF2 α disminuyó el fragmento activo de los receptores NOTCH1 y 4, por el contrario, no se detectaron cambios significativos en los niveles proteicos del ligando DLL4.

La administración intraovárica de DAPT disminuyó los niveles séricos de P4, aumentó los niveles del fragmento activo de la caspasa-3 y la relación BAX: BCL2 24 horas después del tratamiento.

También se demostró que la inhibición *in vitro* de la síntesis de P4 en CL de ratas preñadas con aminoglutetimida (inhibidor específico de la enzima P450 $_{sc}$) disminuyó el contenido proteico de NOTCH1, pAKT, y pERK. Sin embargo no se observaron diferencias significativas en los niveles proteicos de NOTCH4 y el factor de transcripción HES1.

Estos resultados respaldan el rol luteotrópico de la vía de señalización de Notch para promover la viabilidad celular y la esteroidogénesis luteal, y sugieren que la hormona

luteolítica $PGF2\alpha$ puede actuar, en parte, disminuyendo la expresión de algunos miembros del sistema Notch.

Palabras claves: Cuerpo lúteo; Luteólisis; Preñez; Apoptosis; Esfingosina 1-fosfato; Notch

“REGULATION OF FUNCTIONAL AND STRUCTURAL LUTEOLYSIS. ROL OF ESPHINGOSINE-1-PHOSPHATE (S1P) AND NOTCH SIGNALING”

Summary

The first chapter of this thesis was designed to study if local administration of the antiapoptotic agent sphingosine 1-phosphate (S1P) to pregnant rats effectively blocks the luteolytic action of prostaglandin F-2alpha (PGF2 α).

On day 19 of pregnancy, 2 hr before systemic PGF2 α administration, rats were injected intrabursa with either S1P or vehicle and euthanized at 0, 4 and 36 hr after PGF2 α injection. The activity of four caspases, which contribute to the initial (caspase-2, -8, and -9) and final (caspase-3) events in apoptosis was measured. The expression of the phosphorylated form of AKT (pAKT), ERK (pERK) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) was analyzed by ELISA. In addition, cell death was evaluated by TUNEL technique and electronic microscopy. We also examined luteal progesterone.

The activity of caspase-2, -3, and -8 was significantly greater by 4 hr after PGF2 α , but not the caspase-9 activity and the number of apoptotic cells in CL was higher. In contrast, expression of pAKT and TNF- α decreased significantly. Administration of S1P suppressed these effects, decreasing caspase activities and increasing pAKT, pERK and TNF- α expression. The administration of S1P also significantly decreased the percentage of luteal apoptotic cells induced by PGF2 α .

PGF2 α treatment increased the prevalence of luteal cells with advanced signs of apoptosis (i.e., multiple nuclear fragments, chromatin condensation, or apoptotic bodies). S1P treatment suppressed these changes and increased the blood vessel density.

These results suggest for the first time that S1P blocks the luteolytic effect of the PGF2 α in pregnant rats.

The second chapter of this thesis was designed to investigate the expression and cell localization of NOTCH1, NOTCH4, and the delta-like ligand DLL4 in corpus luteum (CL) from rats during pregnancy and PGF2 α -induced luteolysis. We also examined serum progesterone (P4) and CL proteins related to apoptosis after local administration of the Notch inhibitor N-[N-(3,5-difluorophenacetyl- L-alanyl)]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT).

Specific staining for NOTCH1 and NOTCH4 receptors was detected predominantly in large and small luteal cells. Furthermore, in line with the fact that the notch intracellular domain (NICD) is translocated to the nucleus, where it regulates gene expression, staining was evident in the nuclei of luteal cells. In addition, we detected diffuse cytoplasmic immunostaining for DLL4 in small and large luteal cells, in accordance with the fact that DLL4 undergoes proteolytic degradation after receptor binding.

The mRNA expression of Notch1, Notch4, and Dll4 in CL isolated on Day 19 of pregnancy decreased significantly after administration of PGF2 α . Consistent with the mRNA results, administration of PGF2 α to pregnant rats on Day 19 of pregnancy decreased the protein fragment corresponding to the cleaved forms of NOTCH1/4 CL receptors. In contrast, no significant changes were detected in protein levels for the ligand DLL4.

The local intrabursal administration of DAPT decreased serum P4 levels and increased luteal levels of active caspase 3 and the BAX:BCL2 ratio 24 hr after the treatment.

In addition we demonstrated that *in vitro* treatment of pregnant rat CL with aminoglutethimide (blocker of cytochrome P450_{scc}), decreased luteal levels of NOTCH1, pAKT and pERK. In contrast, no significant changes were detected in protein levels for the receptor NOTCH4 and the transcriptional factor HES1.

These results support a luteotropic role for Notch signaling to promote luteal cell viability and steroidogenesis, and they suggest that the luteolytic hormone PGF2 α may act in part by reducing the expression of some Notch system members.

Keywords: Corpus luteum; Luteolysis; Pregnancy; Apoptosis; Sphingosine 1-phosphate; Notch

Agradecimientos

A Sully especialmente por haber confiado en mí y darme la posibilidad de ser parte de su laboratorio.

A Marina, por los comienzos, el tiempo compartido, su apoyo y hospitalidad en Oregon. Mil gracias!

A mis compañeras de laboratorio, Dalhia, Diana, Fer, Gri y Leo por hacerme sentir parte del grupo desde el principio y por estar siempre dispuestas a ayudarme en todo lo que necesité. Gracias chicas!

A Cami y Nati por ponerle onda y hacer divertidos los almuerzos.

Al laboratorio 261: Mariela, Analía, Carla, Gaby, Rosa Inés y Juani por los momentos compartidos, seminarios, consejos etc.

A los laboratorios del primer piso por los préstamos y las ayuditas. Especialmete a Cachi, Agus y Romi.

A la gente del bioterio.

A la ANPCYT y a CONICET por las becas otorgadas.

Al IBYME por darme un lugar para desarrollar mi tesis.

A la UBA por la formación doctoral.

Al grupo de escritura de la biblio (Lucas, Lara, Analía, Vani, Carla entre otros) por el intercambio de ideas y por hacer ameno el tiempo en la biblio.

A los galectinos y a los chicos de Norberto y las NK por hacer divertidos los días en el IBYME.

A mis amigas de Canals y Río Cuarto, gracias por estar.

A Ceci mi gran amiga, por estar siempre incondicionalmente.

A Tini y Ale, por su amistad.

A mi familia de Buenos Aires, especialmente a Eva, Nelly y Francisco, por hospedarme y ayudarme en todo lo que necesité.

A mi mamá, por estar siempre a mi lado, acompañarme en cada cambio que he hecho, en cada mudanza, en cada ocurrencia, gracias por seguir siempre de pié a pesar de todo. A mis hermanos: Ceci y Ale, gracias por estar, a mis sobrinos Celi y Mau por ser la alegría de mi vida.

A Iván, por que conocerte me cambió la vida de una manera hermosa. Gracias por darme siempre ánimos cuando las cosas no me salen, por creer en mí, escucharme, apoyarme y buscarle una vuelta a todo con muchas ganas siempre.

Gracias por hacerme parte de tu trabajo, involucrarme, enseñarme y hacerme sentir capaz de lograr lo que me proponga.

*A mi papá, que desde algún lugar
me cuida y me guía*

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

Local effects of the sphingosine 1-phosphate on prostaglandin F2alpha-induced luteolysis in the pregnant rat.

Hernandez F, Peluffo MC, Bas D, Stouffer RL, Tesone M. Mol Reprod Dev. 2009 Dec;76(12):1153-64.

Role of the DLL4-NOTCH system in PGF2alpha-induced luteolysis in the pregnant rat.

Hernandez F, Peluffo MC, Stouffer RL, Irusta G, Tesone M. Biol Reprod. 2011 May;84(5):859-65.

Abreviaturas

μg	Microgramo
μl	Microlitro
μM	Micromolar
3βHSD	3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa
AC	Adenil ciclasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Akt	Kinasa de serina treonina
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de varianza
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
ASM	Esfingomielinasa ácida
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
BrEt	Bromuro de etidio
C1P	Ceramida-1 fosfato
CERK	Ceramida quinasa
CL	Cuerpo lúteo
CLs	Cuerpos lúteos
DAB	Diaminobenzidina
DAG	Diacil glicerol
DMSO	Dimetil sulfóxido
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EG-VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular derivado de glándula endócrina
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
ET-1	Endotelina -1
FN	Fibronectina
FSH	Hormona folículo estimulante
GDF-9	Factor diferenciador del crecimiento-9

GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas
GSI	Inhibidor de gamma secretasa
hCG	Gonadotrofina coriónica humana
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
IAP	Proteína inhibidora de la apoptosis
IHQ	Inmunohistoquímica
ip	Intra peritoneal
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
JNK	quinasa del extremo N-terminal de c-Jun
kDa	Kilodalton
LH	Hormona Luteinizante
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
ME	Microscopía electrónica
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
M-MLV	Moloney-Murine Leukemia Virus
MMP	Metaloproteasa
NEXT	Truncamiento extracelular de Notch
ng	Nanogramo
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NICD	Dominio intracelular de Notch
nm	Nanómetro
NO	Óxido nítrico
P4	Progesterona
P450scc	Enzima de clivaje de la cadena lateral del colesterol
PARP	Poli ADP ribosa polimerasa

PBR	Receptor periférico de benzodiazepina
PBS	Buffer fosfato salino
PDE4D	Fosfodiesterasa 4
PGE	Prostaglandina E
PGF2α	Prostaglandina F 2 alfa
PKA	Proteína quinasa A
PKB	Proteína quinasa B
PLC	Fosfolipasa C
PMRs	Receptores de membrana putativos
PRL	Prolactina
Rb	Retinoblastoma
RFU	Unidad de fluorescencia relativa
RIA	Radioinmunoensayo
R-LH	Receptor de LH
RT-PCR	Reacción de la Cadena de Polimerasa en Transcripción Reversa
SCP-2	Proteína transportadora de colesterol 2
SMAD	Proteína efectora intracelular
SphK	Esfingosina quinasa
SPT	Serin palmitoil transferasa
StAR	Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda
TBS-T	Tris buffer salino tween
TGF	Factor de crecimiento transformante
Tie-1	Receptor tirosin quinasa 1
Tie-2	Receptor tirosin quinasa 2
TIMP	Inhibidores de metaloproteasas
TNF	Factor de necrosis tumoral
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Nick End Labeling
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular

Índice

INTRODUCCIÓN.....	21
1. El ovario.....	22
2. Foliculogénesis.....	23
2.1. Regulación del desarrollo folicular.....	28
2.1.a. Eje hipotálamo-hipofisario-gonadal.....	28
2.1.b. Retroalimentación positiva y negativa.....	28
2.2. Selección del folículo dominante.....	29
3. Ovulación.....	30
4. Ciclo estral.....	31
5. El cuerpo lúteo.....	33
5.1. Formación del CL.....	34
5.1.1. Efectos genómicos e intracelulares del pico de LH.....	34
5.1.2. Salida de las células de la granulosa del ciclo proliferativo.....	35
5.1.3. Rol del ovocito en la luteinización.....	36
5.1.4. Cambios estructurales.....	36
5.1.5. Desarrollo de vasos sanguíneos.....	38
5.2. Esteroidogénesis luteal.....	40
5.2.1. Captación y movilización de colesterol intracelular.....	40
5.2.2. Biosíntesis de progesterona.....	41
5.2.3. Control molecular de la secreción de progesterona.....	42
5.2.4. Regulación crónica de la secreción de progesterona.....	43
5.2.5. Regulación aguda de la secreción de progesterona.....	43
5.2.6. Biosíntesis de andrógenos y estradiol por las células del cuerpo lúteo.....	45
5.3. Regulación hormonal del cuerpo lúteo.....	45
5.3.1. LH.....	45
5.3.2. PRL.....	46
5.3.3. Estradiol.....	46
5.3.4. Rol de la progesterona.....	46
5.4. Receptores de progesterona.....	47

6. Tipos de CL.....	48
7. Luteólisis.....	50
7.1. Luteólisis funcional, rol de la Prostaglandina F2 alfa (PGF2 α).....	50
7.2. Luteólisis estructural.....	52
8. Apoptosis.....	53
8.1. Vía extrínseca de la apoptosis.....	55
8.2. Vía intrínseca de la apoptosis.....	56
8.3. Apoptosis y CL.....	59
9. Rol de las células del sistema inmune en CL y en la luteólisis.....	59
10. Esfingolípidos: El rol del S1P.....	63
10.1. Estructura y metabolismo de los esfingolípidos.....	63
10.2. Regulación del destino tisular por los esfingolípidos.....	66
10.3. Mecanismos de señalización activados por ceramida y ceramida 1 fosfato (C1P).....	71
10.4. S1P en el sistema reproductivo.....	72
11. Vía de Señalización de Notch.....	73
11.1. Familia Delta-Serrate-Lag.....	73
11.2. Familia Notch.....	75
11.3. Clivajes proteolíticos de Notch.....	77
11.4. Complejo transcripcional de NICD.....	79
11.5. Implicancias de la vía de señalización de Notch.....	80
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	85
Hipótesis. Capítulo I.....	86
Objetivo general.....	86
Objetivos específicos.....	86
Hipótesis. Capítulo II.....	88
Objetivo general.....	88
Objetivos específicos.....	88
MATERIALES Y MÉTODOS.....	90
1. Animales.....	91
1.1. Tratamientos de los animales Capítulo I.....	91

• Experimentos con ratas tratadas con S1P o su solución vehículo.....	91
1.2. Tratamientos de los animales Capítulo II.....	92
• Experimentos con ratas preñadas.....	92
• Experimentos con ratas tratadas con DAPT o su solución vehículo.....	92
• Experimentos con ratas tratadas con PGF2 α o su solución vehículo.....	92
2. Aislamiento de los CLs.....	92
3. Metodología utilizada en el capítulo I.....	93
3.1. Microscopía electrónica.....	93
3.2. Técnica de Tunnel.....	93
3.3. Extracción de proteínas luteales.....	94
3.4. Actividad de Caspasas.....	94
3.5. Enzimoimmunoanálisis (ELISA).....	94
3.6. Extracción de esteroides y radioinmunoensayo de P4 en tejido luteal (RIA).....	95
3.7. Inmunohistoquímica.....	96
3.8. Western Blot.....	96
3.9. Análisis estadístico de los datos.....	97
4. Metodología utilizada en el capítulo II.....	98
4.1. Inmunohistoquímica.....	98
4.2. Extracción de ARN.....	98
4.3. Transcripción reversa.....	100
4.3. PCR en tiempo real.....	100
4.3. Western Blot.....	100
4.4. Extracción de esteroides y RIA de P4 de suero.....	101
4.5. Extracción de ADN de CLs y análisis de fragmentación de ADN.....	101
4.6. Electroforesis en geles de agarosa y cuantificación de la fragmentación del ADN.....	102
4.7. Cultivo de CL.....	102
4.7.1. Inhibición de la síntesis de esteroides <i>in vitro</i>	102
4.7.2. Inhibición de la vía de señalización de Notch <i>in vitro</i>	102
4.7.3. Medición de P4 de medios condicionados.....	103
4.7.4. Análisis estadístico de los datos.....	103

RESULTADOS.....	105
Capítulo I	
1. Efecto <i>in vivo</i> de la administración intraovárica de S1P previo a la inyección de una dosis luteolítica de PGF2 α en ratas preñadas	106
1.1. Efecto de S1P y PGF2 α sobre la ultra estructura del CL, el número de células apoptóticas y la densidad vascular.....	106
1.2. Efecto de S1P y PGF2 α sobre la funcionalidad del CL de preñez.....	114
1.3. Efecto de S1P y PGF2 α sobre la expresión de proteínas relacionadas a la apoptosis.....	115
1.4. Estudio de los cambios en las vías de transducción de señales:	118
1.4.a Niveles de AKT fosforilado.....	118
1.4.b Niveles de ERK fosforilado	121
1.4.c Niveles de TNF- α	123
Capítulo II	
1. Expresión de miembros de la familia Notch en ovarios de ratas preñadas.....	124
1.1. Localización de NOTCH1, NOTCH4 y DLL4.....	124
1.2. Niveles de ARNm de Notch1, Notch4 y Dll4 durante la preñez y posparto.....	127
2. Expresión de miembros de la familia Notch durante la luteólisis inducida por PGF2 α	129
2.1. Niveles de ARNm de Notch1, Notch4 y Dll4.....	129
2.2. Niveles proteicos de Notch1, Notch4 y Dll4.....	132
3. Efecto de la administración local de un inhibidor de la vía de Notch (DAPT) en ratas preñadas sobre:.....	135
3.1. Los niveles luteales de los receptores Notch1 y Notch4.....	135
3.2. La esteroidogénesis luteal.....	137
3.3. La fragmentación nuclear del ADN.....	138
3.4. La expresión de proteínas pro y anti-apoptóticas:.....	140
3.4.a. Niveles proteicos del fragmento activo de caspasa-3.....	140
3.4.b. Niveles proteicos de BAX y BCL2.....	143
4. Efecto <i>in vitro</i> de la inhibición de la síntesis de P4 luteal y de la vía de Notch en cultivo de CLs sobre:.....	145

4.1. La esteroidogénesis luteal.....	145
4.2. Los niveles proteicos de los NICD de Notch1, Notch4 y del factor de transcripción Hes1.....	147
4.3. Los niveles proteicos de ERK y AKT fosforilados.....	150
DISCUSIÓN.....	152
1. Rol de S1P en el CL de preñez.....	153
2. Rol de la vía de señalización de Notch en el CL.....	160
RESUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.....	165
CONCLUSIÓN GENERAL.....	170
BIBLIOGRAFÍA.....	172

Introducción



1. El ovario

El ovario de mamíferos es un órgano que tiene como principal función la de producir, almacenar, desarrollar y liberar los ovocitos formados durante la vida embrionaria o fetal, como gametas completamente competentes para ser fertilizadas y para permitir el desarrollo embrionario (función gametogénica). Es además el principal portador de las células secretoras de hormonas femeninas que desarrollan y mantienen los caracteres sexuales secundarios de la hembra y preparan a los órganos reproductivos accesorios para la preñez y el nacimiento de la cría, generando un ambiente propicio para la implantación y desarrollo del cigoto (función endocrina)[1]. La función final del ovario es la de permitir la propagación de la especie [2].

Durante la vida adulta la superficie del ovario es nodular y se encuentra cubierta por una capa monoestratificada de células cúbicas ó poliédricas, llamada epitelio germinal [3]. 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 corteza 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 [4] (Figura 1).

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

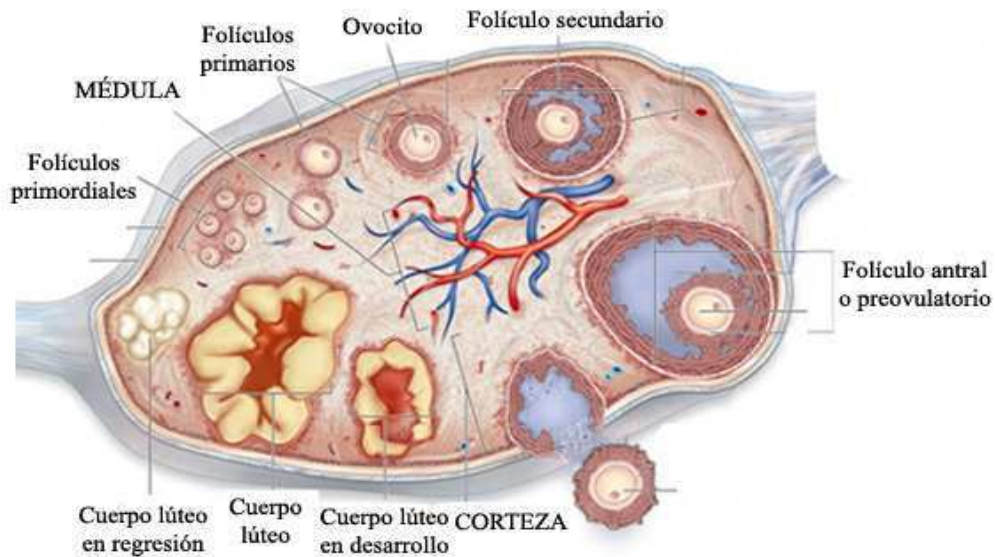


Figura 1: Estructura del ovario y desarrollo folicular. Adaptado de McGraw Hill Companies.

2. Foliculogénesis

El proceso de foliculogénesis se define como el crecimiento de los folículos a través de los distintos estadios del desarrollo, desde el momento que emergen del reservorio folicular hasta su ovulación o su atresia. Este proceso es llevado a cabo en la corteza del ovario.

Debido al continuo crecimiento y a la regresión de los folículos, la relación volumen/contenido del ovario, se encuentra en constante cambio [1]. Los ovarios de los mamíferos contienen a los folículos como unidades funcionales. Hasta ahora se creía que el número total de folículos ováricos era determinado en forma temprana en la vida del individuo, y la depleción de este pool, llevaba a la senescencia de la vida reproductiva [2]. Actualmente esta doctrina, que sostenía que los mamíferos perdían su capacidad de generar células germinales durante su vida adulta, se encuentra en amplio debate [5;6]. Johnson et al mostraron la existencia de células germinales mitóticamente activas en ovarios de ratones juveniles y adultos, sugiriendo la presencia de estas células capaces de proliferar en el ovario del mamífero postnatal. Sin embargo, estos estudios aún no han sido confirmados y existen trabajos que plantean controversias respecto a esta nueva posibilidad [6-9].

Para cada especie se encuentran diferencias en el número de folículos formados durante la ovogénesis. Al nacimiento, el ovario contiene alrededor de 20.000, 160.000 o 1.000.000 de

folículos en ratas, ovejas y humanos respectivamente [1]. En la mayoría de los mamíferos antes del nacimiento, las ovogonias son transformadas en ovocitos primarios. Esta transición de ovogonia a ovocito está determinada por el cese del proceso de mitosis que sufren las células primordiales germinales y la entrada en la fase meiótica: profase, en la cual los ovocitos quedan arrestados. Luego de este proceso, los ovocitos se rodean de una capa única de células foliculares aplanadas, llamadas pregranulosa. En esta fase, las superficies del ovocito y de las células foliculares envolventes son lisas y están en estrecho contacto. Las células de la pregranulosa se encuentran envueltas en la llamada lámina basal que separa a este tipo celular de todo elemento que la rodea, entre ellos vasos sanguíneos, capilares y nervios [10].

Los folículos primordiales (Figura 2), se encuentran principalmente en la periferia de la corteza, inmediatamente por debajo de la túnica albugínea y constituyen la reserva de folículos en reposo, los cuales serán progresivamente eliminados durante la vida reproductiva. Aparecen en el humano aproximadamente en la semana 16 de embarazo y su formación terminaría aproximadamente en la semana sexta luego del nacimiento [11]. Para que estos folículos primordiales inicien su crecimiento, es necesaria una compleja interacción entre factores estimulatorios e inhibitorios.

Estos folículos continuamente abandonan el reservorio para convertirse en folículos primarios (Figura 2). Esta transición implica ciertas modificaciones citológicas en el ovocito, en las células foliculares y en 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 la cual, mediante el proceso de mitosis, origina las células de granulosa que formarán posteriormente un epitelio estratificado. Entre el ovocito y las células de granulosa circundantes, se originan espacios donde se deposita una sustancia que representa el inicio de la zona pelúcida, mucopolisacáridos secretados por las células de la granulosa, que más tarde originarán un halo translúcido que rodea al ovocito. La zona pelúcida está formada por tres glicoproteínas y su adquisición es una característica del folículo preantral primario. Se sabe que ratones knockout de proteínas que componen la zona pelúcida son infértiles o subfértiles [12].

A medida que los folículos aumentan de tamaño, van desplazándose gradualmente hacia el interior de la corteza. A través de sucesivas divisiones mitóticas de las células de granulosa, el folículo primario unilaminar pasa a un estadio preantral, multilaminado (con dos o más capas de células de la granulosa rodeando al ovocito), denominado folículo secundario o folículo preantral (Figura 2). Estos folículos poseen una o dos arteriolas que terminan en una red vascular fuera de la lámina basal, y por lo tanto, el folículo entra en contacto directo con factores que se encuentran en la circulación [13]. En este estadio las células de la granulosa conforman una población homogénea y adquieren receptores de alta afinidad para la hormona folículo estimulante (FSH) y hormonas esteroideas [14]. Recientemente se ha reportado la importancia de un factor derivado del ovocito llamado GDF-9 (Factor Diferenciador del Crecimiento-9), el cual, junto con la hormona FSH regularían el desarrollo folicular y la atresia durante la transición del estadio preantral a antral temprano [15]. Por lo tanto la presencia del receptor de FSH en este estadio folicular, sería necesario para su posterior desarrollo. Simultáneamente con la proliferación de estas células, se desarrolla alrededor del folículo otra capa de células originadas del estroma que forma la teca folicular. La aparición del estrato tecal se asocia con la adquisición de la vascularización del folículo. A medida que se forman los capilares, las células teca-intersticiales parecen comenzar la diferenciación con la adquisición de los receptores de LH (Hormona Luteinizante) y la capacidad de biosíntesis de esteroides. La capa tecal se diferencia en una interna y otra externa, la cual está compuesta principalmente por tejido conectivo. Numerosos vasos pequeños penetran en la teca externa para proporcionar un rico plexo capilar a la teca interna y dado que los capilares no penetran la membrana basal, la capa de células de granulosa permanece avascular durante todo el crecimiento del folículo. Como consecuencia de este aumento de la vascularidad, el folículo aumenta su exposición a factores que circulan por la sangre [16].

Es interesante destacar que el establecimiento de la red de capilares coincide con un periodo de crecimiento y diferenciación del folículo [17]. Al aumentar el folículo de tamaño, se termina de formar la zona pelúcida. Las células de la granulosa mantienen contacto con el ovocito a través de proyecciones citoplasmáticas que penetran en la zona pelúcida y establecen contacto con la membrana celular del ovocito. 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.

Con la aparición de la cavidad antral, el folículo se convierte en folículo terciario o folículo antral (Figura 2), y esta fase se denomina fase antral. Se forma, entonces, una cavidad: el antro folicular, rodeado de células de la granulosa murales, localizadas en la periferia, conteniendo en el interior el fluido folicular. El folículo antral está tapizado por un epitelio estratificado de células granulosas que presentan un engrosamiento localizado en uno de sus lados llamado células del cúmulus (Figura 2), las que se encuentran unidas entre sí y al ovocito mediante uniones estrechas (gap). 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 cúmulus, permanecen unidas a él, formando la corona radiata, envoltura celular laxa que persiste alrededor del ovocito aún después de la ovulación.

La aparición de los receptores de LH en las células de la granulosa ocurre durante la transición del folículo antral hacia el folículo preovulatorio, debido a la estimulación de FSH [18]. Este paso es fundamental para que el folículo progrese hacia el paso final, la ovulación.

Los folículos preovulatorios (Figura 2) son aquellos que han alcanzado los estadios finales de crecimiento y maduración del folículo antral y han adquirido la habilidad para ovular ante los adecuados niveles de gonadotrofina LH ó la administración de hCG. Es interesante destacar que los receptores a LH no se encuentran expresados de forma homogénea en estos folículos, sino que los mismos presentan un gradiente de expresión que disminuye desde las capas externas de la granulosa hacia la células del cúmulus [18;19]. El caso más extremo es el de las células del cúmulus de ratón, donde los receptores a LH son indetectables [20]. Por esta razón, el reinicio de la meiosis inducida por LH y la expansión de las células del cúmulus requeridas para la ovulación, serían eventos mediados por las células de la granulosa murales [21;22].

Por otra parte, los folículos preovulatorios se caracterizan por una baja tasa mitótica de las células foliculares y una alta relación estrógenos/andrógenos y estrógenos/progesterona en el fluido folicular.

Desde el momento en que el folículo ha sido seleccionado para la ovulación, el mismo comienza a crecer notablemente en tamaño. Las células de la granulosa sufren transformaciones morfológicas como ser el aumento de su volumen [23]. A este folículo destinado a ovular, se lo denomina folículo dominante [24].

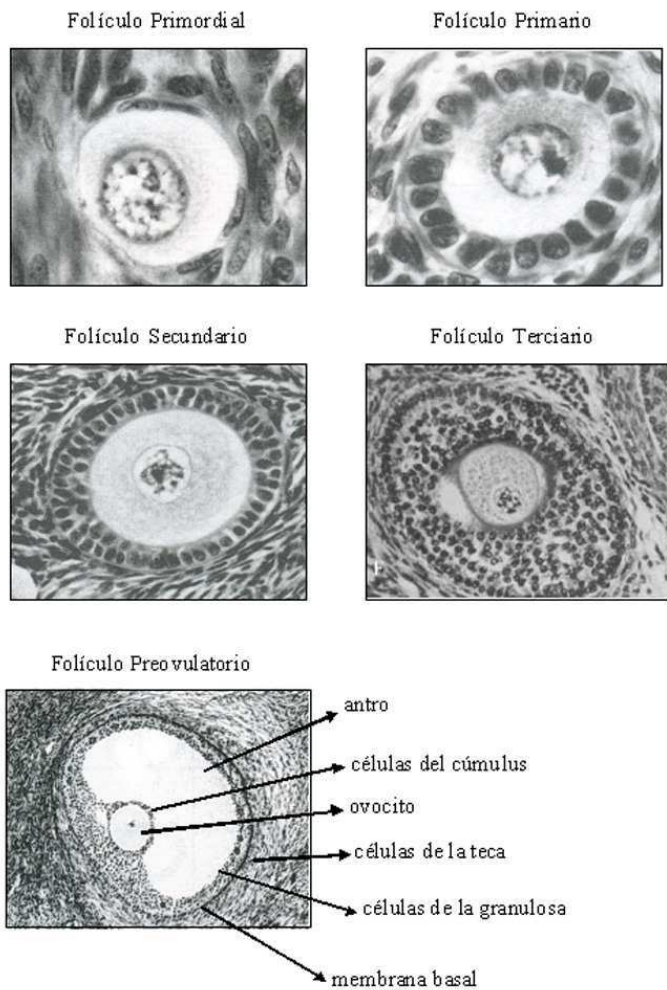


Figura 2: Estadios del desarrollo folicular. (Modificado de Thibault y col. 1993) [1].

2.1. Regulación del desarrollo folicular

2.1.a. Eje hipotálamo-hipofisario-gonadal

El hipotálamo juega un papel clave en la regulación hormonal de la función reproductiva femenina. El folículo destinado a ser ovulado inicia una secuencia coordinada de eventos que controlan el ciclo estral, el cual está regulado por el sistema hipotálamo-hipofisario. El hipotálamo se conecta con la hipófisis a través del sistema porta hipofisario sirviendo este de conducto para transportar hormonas del cerebro a la hipófisis. El principal factor liberador del hipotálamo que regula la función reproductiva es la GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas). Esta hormona actúa sobre los receptores presentes en los gonadotropos de la hipófisis (células productoras de gonadotropinas) y estimula la secreción de LH y FSH. Estas hormonas se liberan en forma coordinada para regular el crecimiento folicular, la ovulación y la vida del CL. La secreción de LH y FSH por parte de la hipófisis se encuentra regulada por los estrógenos y progestágenos [25].

2.1.b. Retroalimentación positiva y negativa

Los mecanismos de retroalimentación involucran esteroides gonadales y compuestos no esteroideos (inhibina, activina y follistatina). La síntesis de estrógenos está modulada por mecanismos de retroalimentación que actúan sobre las gonadotrofinas liberadas por la hipófisis. La secreción de FSH está regulada negativamente por los estrógenos [25]. 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 gonadotrofina. Para que se produzca el pico preovulatorio de LH tanto en el humano como en roedores los estrógenos deben alcanzar un valor promedio de 200 pg/ml [26].

Por otro lado, la presencia de compuestos no esteroideos presentes en el fluido folicular influye en la liberación de las gonadotrofinas. La inhibina es una proteína sintetizada por las células de la granulosa, que inhibe la liberación de FSH de la hipófisis [27]. Esta proteína pertenece a la familia de péptidos relacionados estructuralmente con el TGF- β (factor de crecimiento transformante β) y está formada por dos subunidades, α y β que se encuentran unidas por puentes disulfuro. Mientras que otro miembro de esta familia

formado por dos subunidades β , la activina, estimula la liberación de FSH. Al igual que las inhibinas, el efecto de las activinas sobre la liberación de FSH es independiente de GnRH [28]. 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, conduciendo a una estimulación neta de la secreción de FSH. La folistatina es una proteína que se une a la activina y restringe su biodisponibilidad, por lo tanto inhibe y/o disminuye la liberación de FSH [29].

2.2. Selección del folículo dominante

El reclutamiento cíclico y selección de los folículos representa un proceso continuo, que eventualmente llega a la formación de uno o más folículos preovulatorios, cuyo número varía en cada especie. En los primeros días del ciclo menstrual en la mujer, aumentan los niveles circulantes de FSH, como consecuencia, una cohorte de folículos antrales escapa de la apoptosis que los llevaría a la atresia folicular. Dentro de este grupo, alrededor de 10 folículos antrales crecen más rápido y producen altos niveles de estrógenos e inhibina, seleccionándose entre éstos el folículo dominante.

A pesar de que no se conoce exactamente por qué un folículo emerge como dominante, se postula que éste posee una mayor sensibilidad a FSH, debido a una mayor expresión de receptores de FSH y/o LH. Asociado a este proceso, el estradiol y los factores de crecimiento locales ejercen un efecto permisivo, amplificando la acción de la FSH en los folículos que están madurando. Sin embargo, el aumento de estradiol e inhibina, también ejerce una retroalimentación negativa sobre la liberación de FSH a nivel hipotálamo-hipófisis, lo cual evita que otros folículos sigan desarrollándose [2;30].

Además, la disminución de FSH provocaría un descenso de la actividad de la aromatasas dependiente de FSH (que es la que transforma andrógenos a estrógenos) lo que limita, como consecuencia, la disponibilidad de estrógenos en los folículos menos maduros. Esto llevaría a la disminución de la proliferación de las células de granulosa y al aumento de andrógenos, provocando una atresia irreversible.

El folículo dominante debe retener una sensibilidad única a la FSH y de esa manera aumentar la proliferación de sus células de granulosa, logrando así tener una mayor

cantidad de receptores para esta gonadotropina. Los folículos seleccionados tendrán de esta manera un aumento de estrógenos mucho mayor que los folículos restantes. Además, estos folículos seleccionados tendrán una mayor cantidad de células de granulosa y una mayor vasculatura tecal, permitiendo una entrada preferencial de FSH. Por lo tanto, los folículos dominantes no sólo tienen la ventaja de tener mayor número de receptores para FSH sino que además poseen una gran vasculatura que permite un fácil acceso para esta hormona.

En la rata, bajo el estímulo de FSH y en presencia de estrógenos, las células expresan receptores para LH y prolactina, los cuales van aumentando hasta llegar a valores máximos antes de la ovulación [31;32]. El aumento de estrógenos provoca, por un mecanismo de retroalimentación positiva, la estimulación del pico preovulatorio de LH. Estos procesos, actuando en forma sincronizada, permitirían la selección de los folículos dominantes hasta llegar a la ovulación [2].

Por otro lado, se ha postulado, que el folículo dominante produce factores atretogénicos que inhiben el desarrollo de los folículos vecinos o subordinados [2;33].

3. Ovulación

A medida que se acerca la mitad del ciclo, hay un ascenso notable de estrógenos por sobre el umbral, estimulando, por un mecanismo de retroalimentación positiva, un pico de gonadotropinas, principalmente de LH y en menor medida de FSH. Junto a circunstancias únicas del microambiente, el pico de LH es el gatillo para que el folículo dominante ovule y origine un cuerpo lúteo en cada ciclo menstrual en humanos o un número que difiere en el ciclo estral de roedores y otros mamíferos.

Luego del pico preovulatorio de LH, la síntesis de estradiol declina considerablemente, mientras que se produce un aumento notable en la producción de progesterona estimulada por la misma LH [34]. Las células de la granulosa cercanas a la lámina basal, comienzan a soltarse debido a la desaparición de las uniones estrechas (gap) que las mantenían unidas. El único sitio donde estas uniones no se ven alteradas, es en aquellas células que están formando parte de la corona radiata.

También en este proceso existe un componente mecánico dado por el rápido aumento del tamaño folicular, luego del cual el folículo ovárico emerge desde la corteza ovárica. Otro prerequisite para la ruptura folicular es la digestión proteolítica de la pared folicular, y se

sabe que se activan colagenasas para la disolución de la membrana basal y el tejido tecal asociado a la ovulación. Las prostaglandinas de la serie E y F (PGE y PGF 2α) son algunos de los componentes involucrados en la degradación de la pared folicular [35].

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

4. El ciclo estral

El término estro fue utilizado por primera vez por Heape en el año 1900 como adaptación de la palabra griega oistros, para describir en animales el período durante el cual la hembra está dispuesta a recibir al macho en coito fecundante (Freeman 1994). También usó el término anestrus para describir a la temporada reproductiva en la cual las gónadas están en reposo.

El período anterior al estro, lo denominó proestrus, y es el momento en el cual el animal entra en celo. En ausencia de concepción, el estro es seguido por el metaestrus, también conocido como diestro I. El período siguiente, diestro II, varía en duración de acuerdo a las especies y es el tiempo durante el cual los tejidos reproductivos para la recepción del óvulo fertilizado luego del coito en el estrus.

De acuerdo con la presentación de ciclos estrales las especies se clasifican en:

Monoéstricas: presentan un solo ciclo estral al año (por ejemplo perras).

Poliéstricas continuas: presentan ciclos estrales durante todo el año (por ejemplo cerda, vaca etc.)

Poliéstricas estacionales: presentan varios ciclos estrales durante el año, pero confinados a una estación reproductiva, (por ejemplo: oveja, yegua etc.)

De acuerdo con la espontaneidad de la ovulación, las especies se clasifican en:

Especies de ovulación espontánea: vaca, yegua, oveja, perra y cerda.

Especies de ovulación inducida por cópula: gata y coneja.

La rata de laboratorio es un mamífero no estacional, de ovulación espontánea y poliéstrica. Es decir, el ciclo ovárico ocurre durante todo el año y la ovulación no depende del estímulo

de la cópula. El inicio de la pubertad en la rata hembra es la consecuencia de una cascada de eventos que siguen al establecimiento de la liberación pulsátil de la LH luego de la cuarta semana postnatal (aproximadamente treinta días de edad) que conduce a la maduración del ovario [36]. Antes de ese período, el aparato reproductivo se encuentra inactivo. Este cambio en la liberación de LH es evidente entre ocho y nueve días antes del primer proestro, a este período de cambios en la liberación de LH se lo considera anestro [37]. La ovulación en ratas laboratorio se produce en las hembras adultas jóvenes cada cuatro o cinco días durante todo el año.

La duración normal del ciclo estral ha sido investigada a lo largo de varias décadas. Long y Evans en 1922 utilizaron aproximadamente 2000 ratas jóvenes adultas producto de los descendientes de cruces entre diversas hembras blancas y grises salvajes capturadas en Berkeley, California, alimentadas con restos de comida y otros suplementos, incluyendo hígado crudo. Ellos encontraron diferencias individuales marcadas, con longitudes de ciclo entre 3 y 38 días, pero, con exclusión de los de más de 8 días, el promedio fue de 4,8 días, estos resultados fueron corroborados, posteriormente, por otros investigadores [38].

Sobre la base de frotis vaginal, la duración de los componentes individuales del ciclo estral de las ratas con un ciclo de cuatro o cinco días son: proestro, con una duración de doce a catorce horas; estro: de veinticinco a veintisiete horas; metaestro: seis horas a ocho; y diestro: cincuenta y cinco-cincuenta y siete horas [39].

Sin embargo, como se señaló anteriormente, muchos autores se refieren al día del ciclo, en el cual cada período tiene su propio día, y los de un ciclo de cinco días por lo general, muestran un día extra de cornificación vaginal (día extra de estro) o un día extra de la infiltración de leucocitos (día extra de diestro) [38].

Etapa	Características fisiológicas	Citología vaginal
<i>Diestro</i>	Las secreciones del ovario preparan al tracto reproductivo para recibir al ovocito fecundado	Caracterizado por la presencia de gran cantidad de ovocitos
<i>Proestro</i>	Período en el cuál la rata está entrando en el estro	Predominan las células epiteliales nucleadas, y en ocasiones algunas células cornificadas.
<i>Estro</i>	Receptividad sexual	Ampliamente caracterizada por células epiteliales cornificadas, de forma irregular. Ausencia de

<i>Metaestro</i>	Corto período de recuperación (si no hay fertilización) en el cual, si no hay fertilización el tracto reproductivo recupera su morfología	leucocitos Pequeños leucocitos y pocas células nucleadas o cornificadas
<i>Anestro</i>	Período del ciclo no reproductivo en la hembra. Los ovarios están en reposo y no hay actividad sexual	

Tabla 1: *Etapas del ciclo estral y sus características.*

5. El cuerpo lúteo

El cuerpo lúteo (CL) es una glándula endocrina transitoria formada por las células foliculares remanentes del folículo que ha sido ovulado. Su principal función es la de secretar progesterona, la cual tiene numerosas funciones, entre ellas, la preparación del útero para el período de preñez o embarazo y la regulación de las contracciones del oviducto para el transporte del ovocito al útero. Por lo tanto, la formación del cuerpo lúteo en mamíferos, se considera un evento esencial para la supervivencia e implantación del embrión. Este proceso se inicia mediante numerosos cambios bioquímicos y morfológicos que sufren las células de la teca interna y las células de la granulosa de los folículos preovulatorios, llamado luteinización. Luego de un corto periodo de tiempo el CL regresiona permitiendo así que un nuevo ciclo comience, sin embargo si la implantación ocurre se activan mecanismos complejos para mantener la función luteal durante la gestación.

La hormona LH es la responsable de inhibir el crecimiento de las células foliculares y de producir el escape del ciclo celular. Un gran número de genes son rápidamente inducidos por el pico de LH de forma transitoria, por lo que se creen estarían involucrados en los procesos de ovulación y luteinización, entre ellos se encuentra 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 [40-42].

También la LH induce la expresión de distintos miembros de la superfamilia de las metaloproteasas (MMPs) y de factores involucrados en la angiogénesis como el VEGF y las angiopoyetinas [43;44].

Como se mencionó anteriormente, la principal función del CL es sintetizar y secretar P4. También el CL es capaz de producir otros esteroides dependiendo de la especie y estado reproductivo.

5.1. Formación del CL

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 [45;46]. Las células que van a sufrir este proceso escapan del ciclo celular y dejan de dividirse sufriendo una reprogramación génica irreversible.

5.1.1. Efectos genómicos e intracelulares del pico de LH

La FSH incrementa la producción de estradiol por los folículos seleccionados y también induce la expresión del receptor de LH (LH-R) que alcanza su máximo nivel de expresión en las células de la granulosa del folículo preovulatorio [47].

En la mitad del ciclo menstrual, el incremento en los niveles de estradiol causa el aumento en la secreción de LH (y FSH), también conocido como pico preovulatorio de gonadotrofinas. En el folículo preovulatorio maduro, la activación del receptor de LH por el pico de LH induce la ovulación e inicia el proceso de diferenciación de las células de la granulosa y de la teca en células luteales.

La señalización del receptor de LH es mediante proteínas G (proteínas de unión a GTP) compuestas por subunidades α , β , y γ . El receptor de LH se acopla particularmente a la proteína G α estimuladora (Gas), si bien se ha demostrado que puede unirse a la proteína Gi, G13 y Gq/11 [48]. El receptor de LH es capaz de generar dos tipos principales de señalización: la primera es mediante la adenilciclase (AC) para producir AMPc y la otra activa la fosfolipasa C (PLC), moviliza fosfoinosítidos e incrementa el calcio (Ca^{2+}) intracelular. La proteína Gas es responsable de la activación de la AC que produce AMPc, que activa a la proteína quinasa dependiente de AMPc, PKA. Una vez que PKA se activa se dirige al núcleo donde fosforila factores de transcripción, entre los cuales podemos mencionar a la proteína de unión al elemento respondedor de AMPc "cAMP response element-binding" (CREB). CREB es fosforilado en la Serina 133 por PKA permitiendo el reclutamiento de coactivadores, incluyendo a la proteína de unión a CREB (CBP/p300). CREB a su vez, se une a ciertas secuencias de ADN llamadas "elementos de respuesta a

AMPC" (cAMP Response Element), mediante los cuales incrementa o reduce la transcripción "corriente abajo" regulada por estos genes [49;50].

Tanto en células de la granulosa como en células luteales, el AMPc es rápidamente degradado por fosfodiesterasas. En células de la granulosa la fosfodiesterasa, PDE4D, regula los niveles de AMPc. [51].

Los mecanismos moleculares por los cuales la LH estimula la vía de fosfolipasa C (PLC)/fosfoinosítidos no están claramente determinados. En células de la granulosa de ratas, se demostró que solo las células con una alta densidad de receptores responden a la LH activando la cascada de inositol fosfato además de la de AMPc [52]. Lo que sugiere que solo las células de la granulosa de folículos preovulatorios responden a la LH con un aumento en la producción de los fosfoinosítidos. Se ha propuesto que la liberación de las subunidades β y γ de la proteína G, luego de la activación de la $G\alpha$, lleva a la liberación de PLC- β . La PLC- β hidroliza al fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP_2) resultando en la formación de inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El IP3 induce la liberación de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} y el DAG conjuntamente con el Ca^{2+} activan la vía de proteína quinasa C (PKC). El rol de PKC en mediar el efecto de LH está dado por el hecho de que la acción de LH puede ser mimetizada por dosis sub óptimas de LH mas un activador de PKC [53]. La LH también estimula las vías de ERK1/2 o MAPK en células de la granulosa. El efecto de la LH sobre la fosforilación de ERK puede ser rápido y transitorio, o retrasado y sostenido. El incremento temprano en la fosforilación de ERK1/2 es dependiente de la activación de PKA, y no depende de la activación de PKC. Esta activación rápida y transitoria ocurre en células de la granulosa inmadura con bajos niveles de receptores de LH. En células de la granulosa de folículos preovulatorios, que expresan altos niveles de LH, la activación de ERK es sostenida y dependiente tanto de PKA como de PKC.

5.1.2. Salida de las células de la granulosa del ciclo proliferativo

La hormona FSH estimula la proliferación de las células de la granulosa, dando como resultado el incremento en el tamaño folicular. Luego de la oleada de LH, las células de la granulosa dejan de dividirse y salen del ciclo proliferativo.

Las células de la granulosa se las encuentra arrestadas predominantemente en el estadio de G0/G1. El cese de la proliferación celular durante la luteinización está asociado a la pérdida progresiva de reguladores positivos del ciclo celular, incluyendo a ciclinas y la quinasa dependiente de ciclina 2: Cdk2 y al incremento en la expresión de inhibidores de Cdk como p21^{cip1} y p27^{kip130}.

5.1.3. Rol del ovocito en la luteinización

Moléculas regulatorias derivadas del ovocito actúan en el folículo para inhibir la prematura luteinización y limitar la biosíntesis de P4 [54].

Estudios *in vitro* demostraron que miembros de la familia de TGF, incluyendo TGF- β , activinas, inhibinas, BMPs, factores de diferenciación y crecimiento (GDFs), y la hormona antimulleriana median las acciones anti luteinizantes del ovocito. La señalización de TGFs a través de la cascada serina treonina kinasa resulta en la translocación del citoplasma al núcleo de proteínas efectoras intracelulares llamadas SMAD [55]. Ratones knockout condicionados para SMAD4 y activina A en células de la granulosa, luteinizan prematuramente [56]. Los ovarios de estos animales mutantes para dicho gen, tienen mayor número de CL, de marcadores luteales y producen altas cantidades de progesterona. Sugiriendo que SMAD4 y activina A previenen la luteinización prematura de células de la granulosa durante el desarrollo folicular.

5.1.4. Cambios estructurales

Dos tipos celulares pueden ser encontrados en el CL, células luteales grandes y células luteales pequeñas. Notablemente, aunque este tipo celular es el principal componente funcional del CL, representan menos del 30% del total de las células. El resto está compuesto por células endoteliales, periendoteliales y células del sistema inmune. En rumiantes, humanos y roedores las células luteales difieren en la cantidad de P4 que producen, siendo las luteales grandes las que más P4 producen. En humanos y animales domésticos la LH incrementa la producción de P4 por parte de las luteales pequeñas y no por las luteales grandes. En ratas ambos tipos celulares responden a la LH incrementando su producción.

Mientras las células del folículo ovulado se diferencian en luteales, alteraciones a nivel tisular son necesarias para establecer la red vascular del CL, entre las alteraciones se

encuentran la degradación de la membrana basal folicular, el establecimiento de la matriz extracelular y el desarrollo de nuevos capilares, siendo este último esencial para poder transferir grandes cantidades de P4 a la circulación general. Cuando termina este proceso, cada célula luteal se encuentra en contacto directo con varios capilares, brindando al CL uno de las más altas tasas de flujo sanguíneo del organismo.

Luego de la ovulación, la membrana basal que separa las células tecaes de las de la granulosa del folículo ovulado es desintegrada y los capilares presentes en la teca se expanden dentro de la granulosa avascular. Laminina, colagenasa tipo IV, fibronectina y proteoglicanos son los mayores componentes de la matriz extracelular del folículo. Estos componentes son clivados por metaloproteasas MMP, siendo estas importantes en la formación del CL, porque clivan al colágeno tipo IV. En el ovario de rata, MMP-2 está presente en la granulosa, teca, y células luteales, mientras que la MMP-9 se localiza solamente en la membrana plasmática de las células luteales [57]. En ratones, la MMP-19 en células de la granulosa y tecaes incrementa su expresión entre 5 y 10 veces luego de la activación del receptor de LH [58].

La matriz extracelular (ECM) luteal consiste de componentes proteicos (colágeno, fibronectina y laminina) y no proteicos (proteoglicanos y glicoproteínas) estos componentes proveen una arquitectura para mantener a las células juntas.

La laminina y el colágeno IV son escasos en la granulosa del folículo pero pasan a ser abundantemente expresados en el CL de primates y roedores. En el CL de rata, el colágeno tipo IV y la laminina son detectados en la capa de células de la granulosa 6 horas antes de la ovulación.

Las células interactúan con la matriz extracelular a través de los receptores de superficie llamadas integrinas, estas incrementan su expresión durante la luteinización debido a la acción estimuladora de LH.

La interacción de estas integrinas y componentes de ECM juega un rol importante en modular la supervivencia, crecimiento y esteroidogénesis de células luteales en diversas especies. Por ejemplo la diferenciación de las células de la granulosa en luteales *in vitro* es promovida por fibronectina o laminina y bloqueada por un anticuerpo contra integrina [59].

Entonces la ECM actúa no solo como una plataforma sino que también modula la función luteal a través de la presencia de receptores de superficie de membrana en las células.

La matriz extracelular ECM es constantemente renovada, y el equilibrio entre la síntesis y degradación de la ECM es crítico. Las células luteales expresan no solo proteínas MMP, sino también inhibidores de metaloproteasas tisulares (TIMP), que inhiben la actividad de las metaloproteasas. La relación entre MMP y TIMP es importante para mantener un microambiente extracelular favorable para la diferenciación de las células foliculares en células luteales. Si el balance entre MMP: TIMP es alterado a favor de la actividad de MMP, el desarrollo normal y función del CL es afectado.

5.1.5. Desarrollo de vasos sanguíneos

El desarrollo de nuevos vasos sanguíneos en el CL en desarrollo involucra la proliferación de células endoteliales, expansión de los capilares y la maduración capilar.

La densa red de capilares que se forman durante la luteinización, suministra eficientemente nutrientes, hormonas y lipoproteínas de unión al colesterol a las células luteales y aporta un mecanismo para la rápida y eficiente salida de P4 a la circulación sistémica. En la rata, los nuevos capilares pueden ser encontrados dentro de las primeras 16 horas luego de la ovulación. La regulación molecular de la angiogénesis en el CL es compleja, e incluye reguladores entre los que se encuentran el factor de crecimiento del endotelio vascular VEGF, el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), Factor de Crecimiento Endotelial derivado de Glándulas Endócrinas (EG-VEGF) y las angiopoyetinas.

El VEGF promueve la diferenciación, proliferación, supervivencia, migración, tubulogénesis y permeabilidad vascular en células endoteliales. En primates y roedores VEGF se expresa en células de la granulosa sólo en el estadio preovulatorio; y luego de la ovulación las células luteales continúan expresando VEGF. El VEGF de origen luteal es estimulado por LH, estradiol y IGF-1.

La importancia del VEGF en la vascularización del CL ha sido demostrada mediante el uso de un anticuerpo anti VEGF. La administración de anticuerpos anti VEGF, anti el receptor de VEGF, o receptor soluble truncado de VEGF inhibe la actividad de VEGF. La administración de este tipo de compuestos a roedores antes de la ovulación inhibe la angiogénesis y el desarrollo luteal [60-63].

La administración de un anticuerpo contra el receptor de VEGF a ratones en la etapa de preñez temprana, induce la regresión de los vasos sanguíneos del CL como consecuencia de la eliminación de las células endoteliales que se desprenden de la membrana basal vascular, lo que sugiere que el VEGF no sólo es necesario para la luteinización, sino que también es fundamental para la funcionalidad y mantenimiento de los vasos sanguíneos luteales durante el embarazo [64].

El EG-VEGF también llamado Prokinectin-1 (PK-1) es un regulador angiogénico expresado exclusivamente en glándulas esteroideogénicas. De forma similar al VEGF promueve la proliferación, supervivencia y quimiotaxis de células endoteliales, sin embargo su acción se limita a tejidos endócrinos [65;66]. Dentro del ovario se encuentra altamente expresado durante el desarrollo folicular y el CL, siendo baja su expresión durante el estadio temprano del desarrollo luteal y aumentando desde la etapa media- luteal hasta la fase luteal tardía cuando la expresión de VEGF es considerablemente reducida [67].

El patrón de expresión de VEGF y EG-VEGF apoyan la idea que la actividad de VEGF es más importante para la formación del plexo capilar luteal, mientras que ambos factores son necesarios para mantener la estructura de los capilares en la fase luteal media a tardía.

El bFGF fue el primer factor angiogénico identificado en el ovario. Es producido por las células luteales esteroideogénicas y las células endoteliales en rata y en humanos [68]. El bFGF estimula la proliferación y motilidad de las células endoteliales y el tratamiento con anticuerpos anti bFGF suprime la actividad proliferativa de las células endoteliales en extractos luteales de vacas, ovejas y cerdas, sin embargo la eliminación del gen de bFGF en ratones no resultó en disrupción o pérdida de la fertilidad [69].

Las angiopoyetinas (Ang) también son críticas para la angiogénesis y la integridad de los vasos sanguíneos. Ang-1 y Ang-2 se unen a un receptor común llamado Tie-2; sin embargo mientras la Ang-1 estimula la ramificación (“sprouting”) y maduración de los vasos sanguíneos, Ang-2 inhibe este efecto actuando como un inhibidor competitivo al unirse al receptor Tie-2, sin activar los mecanismos de señalización [70].

Ratones knockout para Tie-2 y Ang-1 son letales en el desarrollo embrionario, sin embargo los ratones knockout para Ang-2 se desarrollan normalmente y son fértiles.

El receptor de Tie-2 se localiza exclusivamente en células endoteliales y es altamente expresado durante la fase luteal temprana y durante el rescate luteal. Ang-1 se expresa uniformemente en células luteales y endoteliales de manera uniforme a lo largo de la etapa luteal en humanos. En contraste Ang-2 es fuertemente expresado en una minoría de células luteales y endoteliales en forma simple o en clústeres [44]. La activación del R-LH incrementa la expresión de Ang-1 en células luteales humanas y en células de la granulosa en macacos.

En ratas, el VEGF es abundante en el centro del CL en desarrollo, incluyendo regiones donde los vasos sanguíneos todavía no se han desarrollado. En cambio los transcritos de Ang-1 se asocian a los vasos sanguíneos y aparecen seguidos o coinciden con el crecimiento de los vasos sanguíneos en el CL temprano.

El patrón de expresión de Ang-2, sugiere que este factor juega un rol clave en los sitios de invasión vascular. Inicialmente, los transcritos de Ang-2 están agrupados en estrecha asociación a los vasos sanguíneos en la teca interna del folículo preovulatorio tardío, luego de la oleada de LH, Ang-2 se vuelve abundante en los vasos que invaden el CL en desarrollo, sugiriendo que Ang-2 colabora con VEGF en la invasión y brote de los vasos sanguíneos, bloqueando los efectos de Ang-1 sobre la maduración y estabilización vascular y permitiendo la plasticidad vascular necesaria para que VEGF pueda ejercer su función. Luego de la formación tubular, Ang-1 recluta a las células peri endoteliales para promover la maduración vascular y mantener la integridad vascular [71].

5.2. Esteroidogénesis luteal

La principal actividad esteroidogénica de las células de la granulosa está dada por la conversión de andrógenos en estrógenos. En cambio, las células luteales producen grandes cantidades de P4. Como todos los esteroides, la P4 se sintetiza a partir del colesterol, por lo tanto la regulación de la captación y el almacenamiento de colesterol forman parte integral en la síntesis de P4. Durante la luteinización, las células adquieren la capacidad de captar y guardar colesterol y expresan varias proteínas asociadas a la movilización de colesterol intracelular.

5.2.1. Captación y movilización del colesterol

Si bien hay tres fuentes potenciales de colesterol que pueden contribuir al pool necesario para las células esteroidogénicas (síntesis *de novo*, hidrólisis de los ésteres de colesterol almacenados y lipoproteínas exógenas) es mayoritariamente aceptado que las lipoproteínas son la mayor fuente de colesterol en células luteales. El colesterol luteal es provisto por la vía de endocitosis de lipoproteínas de bajo peso molecular ricas en colesterol (LDL) a través de su receptor (LDL-R), o por la captación selectiva de ésteres de colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) a través del vía del receptor scavenger (SR-BI). En consecuencia, HDL y LHL estimulan la producción de P4 en cultivo de células luteales humanas y de ratas [72].

Debido a su naturaleza hidrofóbica, el colesterol no puede difundir libremente en el citosol y llegar a la mitocondria donde ocurre el primer paso enzimático en la síntesis de P4. Se ha visto que varias proteínas participan en el movimiento intracelular de colesterol en las células esteroidogénicas. Entre estas proteínas, se encuentra la proteína transportadora de colesterol 2 (SCP-2). Se considera que SCP-2 desempeña un papel importante en la movilización del colesterol en el citoplasma [73]. El estradiol y la LH aumentan la expresión de esta proteína en las células luteales [74;75]. Además la expresión de SCP-2 en el CL está estrechamente relacionada a la producción de P4 [74].

Una vez que el colesterol alcanza la membrana mitocondrial externa, se transporta a la membrana mitocondrial interna a través del espacio de intermembrana acuoso por la acción de al menos dos proteínas: la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda StAR y el receptor periférico de benzodiazepinas (PBR).

5.2.2. Biosíntesis de progesterona

La transformación de colesterol en P4 comienza cuando el colesterol se encuentra en la membrana mitocondrial interna.

La síntesis de P4 es la más simple de todas las vías esteroidogénicas y solo están involucradas dos enzimas. La primera modificación del colesterol ocurre en la membrana mitocondrial interna donde la molécula es convertida a pregnenolona por la enzima de clivaje de la cadena lateral del colesterol (P450_{scc}). La conversión de pregnenolona en progesterona ocurre en el retículo endoplasmático y es catalizado por la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β HSD) (Figura 3). La expresión de ambas enzimas y de

las organelas que las contienen incrementa durante la formación del CL permitiendo la secreción de grandes cantidades de P4. Ambas enzimas permanecen altamente expresadas en el CL a lo largo de la preñez.

En roedores el nivel de P4 secretada no solo depende de la cantidad sintetizada por el CL, sino que también de la expresión de la enzima 20 alfa hidroxisteroide deshidrogenasa 20 α HSD que cataliza la conversión de P4 en un una progestina inactiva, la 20 alfa dihidroxiprogesterona (20 α -DHP) (Figura 3). Una vez que esta enzima se expresa, la secreción de P4 desciende y la 20 α -DHP pasa a ser el principal esteroide secretado por las células luteales, aumentando en roedores la expresión de su enzima hacia el final de la gestación, permitiendo la disminución de la P4 sérica y dando lugar al comienzo del parto.

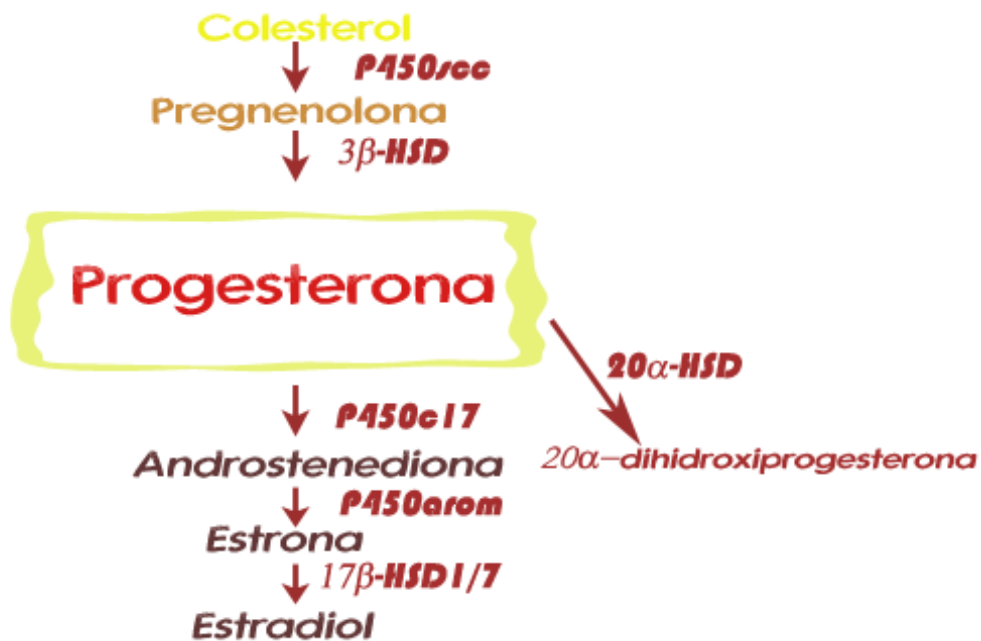


Figura 3: Esteroidogénesis luteal.

5.2.3. Control molecular de la secreción de P4

El control de la síntesis de la P4 en el CL es complejo, dada la presencia de dos tipos de células esteroidogénicas, distintas tanto morfológica como bioquímicamente [45].

En la oveja, las células luteales pequeñas (SLC) miden 12-20 μ m de diámetro, son originadas a partir de las células tecaes del folículo ovulado, tienen receptores de LH, y responden a LH o AMPc aumentando entre 5 y 15 veces en la secreción de P4, además

contienen numerosas gotas lipídicas. Las células luteales grandes (LLC) ($> 20 \mu\text{m}$) se originan de células de la granulosa, secretan altas concentraciones basales de P4, y aunque los receptores de LH están presentes, no responden a la LH o al AMPc con el aumento en la secreción de P4. Las LLC contienen receptores de $\text{PGF2}\alpha$ y responden a esta hormona con la activación de, por lo menos, dos vías de segundos mensajeros. La activación de la proteína quinasa C (PKC) se traduce en disminución de la secreción de P4. El aumento de las concentraciones de calcio libre intracelular [76] deriva del aumento en la unión de la $\text{PGF2}\alpha$ a su receptor, induciendo apoptosis y muerte celular. Las células luteales esteroidogénicas contienen una amplia gama de receptores para hormonas reguladoras y otros factores que pueden o no ser de tipo específico.

En la rata ambos tipos celulares producen P4, la secreción basal en las LLC es significativamente mayor que en las SLC; las LLC contienen más lípidos, secretan más andrógenos y estradiol y unen LH y PRL de forma más efectiva que las SLC. A pesar de esto, contrariamente a lo que ocurre en la oveja, ambos tipos celulares responden a la estimulación con LH con un incremento similar en la producción de P4.

5.2.4 Regulación crónica de la secreción de progesterona

Se sabe desde hace mucho tiempo que la LH es esencial para la función normal del CL en los animales domésticos. Muchas de las acciones de la LH en las células luteales han sido dilucidadas, así como los efectos agudos y a largo plazo de esta hormona en la esteroidogénesis luteal han sido demostrados. La estimulación por LH es esencial para adquirir la capacidad esteroidogénica a largo plazo de las células luteales, incluyendo el mantenimiento de cantidades normales de ARNm de la $3\beta\text{-HSD}$, P450_{scc} y StAR [77].

La $\text{PGF2}\alpha$ induce una disminución marcada en la secreción de P4 por parte del CL *in vivo* y en las células luteales grandes *in vitro*, mediado por la vía de la PKC. El tratamiento con $\text{PGF2}\alpha$ también tiene efectos a largo plazo: disminución de la expresión luteal del ARNm del receptor de LH, el receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), StAR , y $3\beta\text{-HSD}$, mientras que el ARNm que codifica para el receptor de la lipoproteína de alta densidad (HDL) y P450_{scc} no se ven alterados [77].

5.2.5. Regulación aguda de la secreción de P4

Tanto la LH como la $\text{PGF2}\alpha$ regulan la secreción aguda de P4 al afectar el transporte de colesterol en la membrana mitocondrial interna y, a largo plazo, mediante la regulación de las concentraciones de ARNm que codifican para receptores, transporte de proteínas y enzimas esteroidogénicas. El paso limitante en la biosíntesis de la P4 es el transporte del colesterol a la membrana mitocondrial interna, siendo este el lugar principal de la regulación hormonal aguda. Al menos tres proteínas esenciales han sido identificadas por estar involucrados en el transporte de colesterol desde el exterior a la membrana mitocondrial interna: StAR, PBR y endozepina, el ligando natural para PBR

La StAR es un componente indispensable en este proceso y se expresa en los tejidos esteroidogénicos, en respuesta a agentes que estimulan la producción de esteroides. Las mutaciones en el gen de StAR en humanos generan hiperplasia suprarrenal congénita lipoidea, en el que la biosíntesis de las hormonas esteroides se ve gravemente comprometida. El ratón mutante para StAR tiene un fenotipo que es idéntico a la enfermedad humana. La expresión de esta proteína es sensible a los agentes que inducen e inhiben la biosíntesis de esteroides [78]. Esta proteína se sintetiza como un precursor de 37 kDa que es transportado del citoplasma a la mitocondria donde se cliva en dos formas de 30 kDa, una ácida y una básica. Además contiene sitios de fosforilación para PKC y PKA. La fosforilación por PKA está relacionada con aumentos en la secreción de esteroides, en cambio los sitios de fosforilación de PKC están involucrados en la disminución del transporte de colesterol y de la esteroidogénesis que se produce tras su activación [79].

Los PBR también desempeñan un papel importante en el transporte de colesterol. Se encuentran localizados entre las membranas mitocondriales interna y externa, presumiblemente podrían funcionar a modo de poro permitiendo el paso del colesterol. Dicha proteína posee también sitios de fosforilación para PKA, aumentando de esta manera el transporte de colesterol. El ligando natural para PBR, endozepina, también parece ser crucial para regular el transporte de colesterol. La supresión selectiva de esta molécula inhibe la estimulación por hormona trófica en células MA-10 (células tumorales de Leydig) y reduce la esteroidogénesis basal en una línea de células tumorales de Leydig con secreción constitutiva de esteroides (R2C) [77].

Niswender y col. (2002) propusieron a StAR como molécula que actúa en el transporte de colesterol citosólico, con dirección hacia la membrana mitocondrial, con la que interactúa para proporcionar el colesterol a los PBR, que funcionarían como transportadores de colesterol a la membrana mitocondrial interna [77].

La técnica de transferencia de energía entre fluorocromos (FRET) se utilizó para demostrar que StAR y PBR interactúan en la membrana mitocondrial [80]. En el año 2007 se utilizó la técnica de “Bioluminescence Resonance Energy Transfer” (BRET) para demostrar la asociación entre la StAR, receptores PBR y endozepina, pero contrariamente a lo esperado, no encontraron evidencias de asociación entre ellos [79].

5.2.6. Biosíntesis de andrógenos y estradiol por las células del CL

En roedores y primates, el CL produce cantidades significativas de andrógenos y estrógenos. La conversión de progestinas en andrógenos es mediado por la enzima P45017 α -hydroxylase/C17-20 lyase también llamada CYP17. Si bien esta enzima se expresa en el CL de primates y roedores, su distribución difiere entre especies; mientras que las células luteales grandes y pequeñas de la rata expresan CYP17, en humanos sólo las células derivadas de la teca; producen andrógenos. Los andrógenos son convertidos en estrógenos por la acción de la citocromo P450 aromataasa, la cual se expresa en el CL de roedores y primates [81;82].

5.3. Regulación hormonal del CL

Uno de los cambios más importantes que tiene lugar en el proceso de luteinización es la alteración de la sensibilidad celular a las señales externas que permiten a las células luteales responder a un nuevo conjunto de hormonas. En general la funcionalidad del CL es controlado por la interacción de hormonas tróficas secretadas por la pituitaria, el propio CL, la decidua y la placenta.

5.3.1. LH

En humanos y primates no humanos esta hormona es esencial y suficiente para la estimulación y el mantenimiento de la función luteal. El tratamiento de monas con antagonistas de GnRH (que bloquean la secreción de LH por la hipófisis) disminuye la producción de P4 por el CL y por lo tanto decrece la P4 sérica [83].

En roedores la LH aumenta la captación de colesterol y estimula la síntesis de andrógenos [84].

5.3.2. Prolactina (PRL)

La PRL también contribuye a la síntesis de P4 por el CL, pero no es suficiente para mantener la esteroidogénesis por sí misma y depende de la exposición previa del CL a la LH. En el CL de rata, la PRL incrementa la expresión del receptor de LH, facilita los efectos luteotróficos del estradiol, estimulando la expresión del receptor de estrógenos [85].

Esta hormona, también ejerce sus efectos aumentando la captación de colesterol por parte de las células luteales, y por lo tanto, incrementando la producción de P4.

5.3.3. Estradiol

En roedores el estradiol actúa como agente luteotrófico que estimula la síntesis de P4, la vascularización y la hipertrofia del CL. Se ha demostrado que esta hormona media la acción de la LH en el CL de rata y que el estradiol puede mantener el CL en ausencia de LH [86;87]. Los principales factores luteotróficos en la rata son la PRL y el estradiol, y estas dos hormonas actúan de forma sinérgica en la estimulación de la secreción de P4.

En contraste en primates se ha visto que el estradiol está relacionado al proceso de involución del CL. La administración intra ovárica de estradiol induce luteólisis funcional prematura en monos [88]. No está claro si esta actúa directamente sobre las células luteales o indirectamente reduciendo la liberación de LH por la hipófisis y por lo tanto privando al CL de un adecuado soporte gonadotrófico.

5.3.4. Rol de la progesterona

La P4 es producida en grandes cantidades por el CL y actúa no solo en tejidos como el endometrio, la glándula mamaria y el cerebro, sino que también localmente regulando la función ovárica: la mitosis y la apoptosis de las células de la granulosa, la ovulación y el funcionamiento luteal.

Una serie de hallazgos sugieren que la P4 puede promover su propia síntesis en varias especies, sin embargo los mecanismos celulares y acciones específicas de la P4 en el CL no son conocidas. En humanos la P4 contribuye al mantenimiento de la función luteal en la preñez temprana, y la depleción de la misma causa degeneración funcional y estructural

prematura en el CL de macacas. También esta hormona es crítica para el desarrollo y mantenimiento del CL durante el ciclo y protege al CL de rata de la muerte celular [89].

5.4. Receptores de Progesterona (PR)

La unión de P4 a PR clásicos altera la transcripción de genes específicos. Los eventos mediados por el receptor clásico de P4 son relativamente lentos pero producen respuestas fisiológicas de larga duración. Alternativamente ciertos efectos producidos por la P4 son muy rápidos y se sugiere que resultan de la unión a receptores de membrana [90].

La incubación de células luteales de rata con R5020 (progestina sintética) incrementa la producción de P4 de manera dosis dependiente. Esta hormona regula negativamente la expresión de la 20α HSD, enzima involucrada en el catabolismo de P4 y su expresión es un marcador de regresión luteal. Además la administración de P4 a ratas previene la apoptosis del CL [89;91].

Si bien las células luteales de primates y animales domésticos expresan el receptor clásico de P4 (PR), técnicas inmunohistoquímicas y de amplificación de ADNc no fueron capaces de detectar estos receptores en CL de rata. Por lo tanto en su ausencia es posible considerar que en esta especie están presentes vías de señalización alternativas.

Cai y Stocco [92] demostraron que las membranas de las células luteales de rata unen P4 de manera específica y que el CL expresa proteínas previamente identificadas como receptores de membrana putativos (PMRs), también demostraron que dos de estas proteínas se localizan en membranas luteales y que su expresión es regulada durante la preñez de forma que coincide con la capacidad del CL para sintetizar P4. Asimismo observaron mediante RT-PCR una distribución tisular no homogénea de PMRs en la rata, con sólo unos pocos tejidos que expresan grandes cantidades de más de un subtipo. En el CL, se observó que la expresión de ARNm y proteínas PMRs está regulada durante la preñez. En particular, los estudios indican que cada PMR parece ser regulada de forma independiente. Mientras que $Pmr\beta$ se mantiene casi constante a lo largo de la gestación, la expresión de $Pmr\alpha$ y $Pmr\gamma$ incrementa con la gestación avanzada. Por el contrario, un patrón muy diferente se observó hacia el final de la preñez, cuando $Pmr\alpha$ y β disminuye drásticamente justo antes del parto, y los niveles de ARNm de $Pmr\gamma$ se mantuvieron constantes. La cuantificación de los niveles de ARNm demostró que $Pmr\gamma$ se expresa en niveles muy bajos, lo que sugiere que

puede que no contribuya a regular la función lútea de manera fisiológica. Los análisis de las secuencias de aminoácidos de los PMR de rata, indican que estos receptores son proteínas transmembrana. Se encontró que el $PRM\alpha$ y el $PMR\beta$ comparten un alto grado de homología, mientras que mucha menos homología se observa entre estos receptores y el $PMR\gamma$. Hallazgos similares han sido reportados en los PMR humanos y de ratón [92].

También demostraron que la PRL, la mayor hormona luteotrófica en la rata, regula la expresión de estos receptores putativos de membrana en el CL [92].

En ratones deficientes de los receptores clásicos de P4, a pesar de la ausencia de ovulación, la luteinización es normal [93], sugiriendo que el receptor clásico de P4 no afecta ni la formación ni la función del CL. Esto implica, además, un papel importante para los receptores de progesterona no clásicos en el mantenimiento de la función del CL en roedores.

En la oveja los receptores de membrana PMR se expresan en tejidos reproductivos, tienen 350 aminoácidos, siete pasos de membrana y un peso aproximado de 40 kDa. Estos receptores tienen un 83% de homología con los receptores de membrana de rata. Unen $3H$ progesterona que solo es desplazada por P4 y por 17α hidroxiprogesterona en exceso. Además de expresarse en CL, estos receptores también se los puede encontrar en el hipotálamo y en la hipófisis [90].

6. Tipos de CL en ratas

La ovulación se produce inmediatamente después del parto en ratas preñadas, por lo tanto dos tipos diferentes de CL se encuentran presentes en el ovario: uno es el CL de la preñez (CLP) y el otro es el recién formado después del parto (NCL) [94].

CLP en general sufre regresión. Por el contrario, el NCL es sensible a las señales ambientales, como por ejemplo la lactancia. Después del parto, el CL está expuesto a dos tipos ambientales distintos: la lactancia o la no lactancia, estando la regresión luteal regulada, de manera distinta en ambas situaciones. Los niveles séricos de PRL se encuentran elevados a causa de la succión de las crías, en ratas lactantes. Por otro lado, en ratas no lactantes, la ovulación ocurre cada 4 días con picos preovulatorios de PRL.

La PRL puede actuar de forma luteotrófica o luteolítica, pudiendo incrementar la producción de P4 en el CL de preñez e inducir apoptosis en los CLs de ratas ciclando [94].

Takiguchi y col. (2004) observaron que la apoptosis en el CL en ratas lactantes y no lactantes y la disminución gradual en el peso de los CLs luego del parto contribuyen en parte a la regresión estructural de los CLP luego del parto, a pesar de la lactancia [94]. Además la ausencia de lactancia, parecería que facilitó la regresión luteal, estando los CLs disminuidos en tamaño comparados a ratas lactantes en el día 7 posparto. (Figura 8).

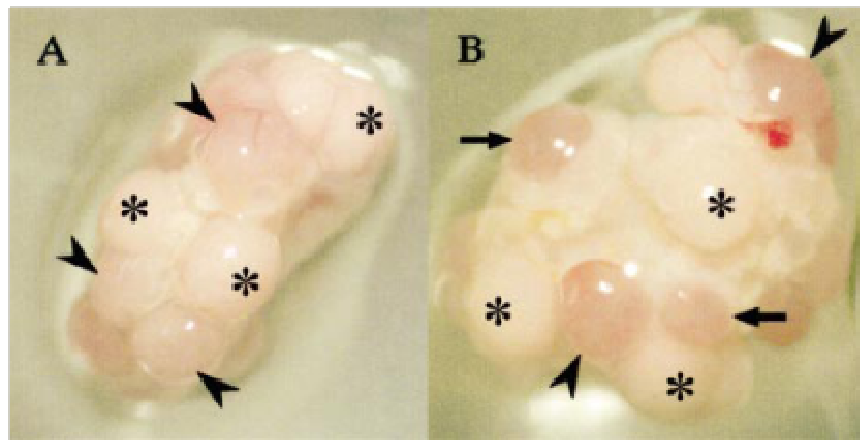


Figura 8: Fotografías estereoscópicas de ovarios de ratas post-parto. A) ovario de rata lactante en el día 7 post-parto. Hay dos diferentes tipos de CL: CL de la preñez (CLP, asteriscos) y CL recién formado después de la primera ovulación posparto (NCL, puntas de flecha). B) ovario derivado de rata no lactante en el día 7 después del parto. Hay tres tipos diferentes de CL: CLP (asteriscos), NCL formado después de la primera ovulación posparto (puntas de flecha) y NCL formado después de la ovulación posparto segundo (flechas) Tomado de Takiguchi y col. (2004) [94].

7. Luteólisis

Se define como el proceso por el cual el CL cesa en su función, en particular la de producir P4. Este proceso juega un rol importante en la reproducción porque la P4 suprime la secreción de FSH y LH previniendo el desarrollo de un nuevo folículo preovulatorio. Por lo tanto, la luteólisis termina con cada ciclo reproductivo femenino a través del decrecimiento de la secreción de P4 y permite la continuación de un nuevo desarrollo folicular. Por lo tanto la luteólisis se asocia a un mecanismo que incrementa la eficiencia reproductiva; si la hembra no concibe seguido a la ovulación, la remoción del CL permite que un nuevo ciclo ovárico comience y con ello una nueva oportunidad de concebir. En roedores, así como en otras especies donde la única fuente de P4 es el CL durante la preñez, la luteólisis juega un rol importante porque la disminución de la P4 es un hecho clave para que el parto ocurra. Durante la luteólisis normal, dos eventos muy relacionados ocurren: primero, se pierde la capacidad de sintetizar y secretar P4 (regresión funcional), este evento es seguido por la muerte de células luteales y pérdida de la integridad vascular del CL (regresión estructural).

7.1. Luteólisis funcional, rol de la Prostaglandina F2 alfa (PGF2 α)

Los primeros estudios en luteólisis demostraron que la histerectomía en cobayos causaba persistencia anormal del CL. Efectos similares fueron observados en ovejas, vacas, yeguas, hámster, conejos y en ratas [95].

El factor que media el efecto luteolítico del útero fue identificado como prostaglandina F2 α [96]. El rol de la PGF2 α en la inhibición del CL funcional al final de la preñez fue demostrado en roedores que no expresan el receptor de PGF2 α . En estos animales mutantes, la producción de P4 durante el final de la preñez es extendida y como consecuencia el parto no ocurre [97].

Contrariamente a lo que sucede en roedores y rumiantes, en los primates el útero no afecta la vida del CL. La regresión luteal parece estar relacionada a un agotamiento en la capacidad del CL en responder a los efectos de la LH [83;98]. Por lo tanto, el tratamiento de monas con altas dosis de LH, prolongó la vida del CL más allá del tiempo estipulado para la regresión luteal [98]. Otra hipótesis sugiere que la luteólisis es iniciada por factores autócrinos/ parácrinos producidos dentro del CL. La oxitocina inyectada en el CL humano causa disminución de la P4 sérica y aumenta la producción de PGF2 α [99]. Por lo tanto se

cree que el estradiol, la PGF2 α y la oxitocina actúan como agentes luteolíticos en el CL de los primates.

En el CL la PGF2 α se une a receptores acoplados a proteínas Gq. La activación de este receptor lleva a la producción de inositol trifosfato y DAG mediado por PLC, seguido de un aumento en el Ca²⁺ intracelular y aumento de la actividad de PKC. Además algunos trabajos evidenciaron que en células luteales la PGF2 α activa la vía de fosfolipasa D produciendo ácido fosfatídico y la activación de la vía de MAPK.

En roedores una de las principales acciones de la PGF2 α es inactivar la secreción de P4. Este efecto, en parte, es mediado por la inducción de la enzima 20 α HSD [46]. Al final de la preñez, en la rata, el CL secreta 20 α HSD en vez de P4. La administración de PGF2 α a ratas preñadas, incrementa la expresión del gen de esta enzima. PGF2 α también reduce el transporte de colesterol en el ovario, a través del decrecimiento en SCP-2 [100] y en la StAR [101]. La administración de PGF2 α en el día 19 de preñez también reduce la actividad de la 3 β HSD. Además, la PGF2 α , previene la biosíntesis de P4 mediada por LH y por PRL. La acción anti-LH involucra dos acciones interrelacionadas: el bloqueo de la acumulación de AMPc inducida por LH y la inhibición de la respuesta de las células luteales al AMPc [102;103] (Figura 4).

La PGF2 α asimismo inhibe la expresión de los receptores de PRL y la señalización de PRL a través de la vía de JAK/STAT, estimulando la expresión de supresores, entre ellos el supresor de la señalización de citoquinas-3 (SOCS3) que inhibe la señalización de Jak/Stat y previene la activación de Stat5 inducida por PRL [104]. La PGF2 α también reduce la síntesis de P4 a través de la supresión en la producción de estradiol por inhibición de aromatasas luteales [105].

Las endotelinas constituyen una familia de péptidos secretados principalmente por las células endoteliales. Endotelina-1 (ET-1) es secretada por las células endoteliales y actúa localmente de manera autócrina- parácrina. Los niveles luteales de ET-1 se encuentran hormonalmente regulados a través del ciclo reproductivo con un incremento con el inicio de la luteólisis. La PGF2 α acrecienta la producción de ET-1 por parte de las células endoteliales del CL. El incremento en ET-1 participa en la disminución de la P4 a través de la inhibición de la biosíntesis de esta hormona mediada por la LH [106;107].

Las especies reactivas del oxígeno (ERO o ROS por “reactive oxygen species”) incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos tanto inorgánicos como orgánicos. Son generalmente moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada. Estas especies se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y tienen un importante papel en la señalización celular. La regresión luteal, tanto natural como inducida por $\text{PGF2}\alpha$, se asocia con una acumulación de ROS y/o disminución de las enzimas protectoras y vitaminas antioxidantes [108;109]. Si bien se ha visto que la $\text{PGF2}\alpha$ causa un aumento en las ROS en células luteales de rata *in vitro*, y causa un incremento del peróxido de hidrógeno en el CL en regresión *in vivo*, las células inmunes son la principal fuente de ROS en el CL en regresión [110].

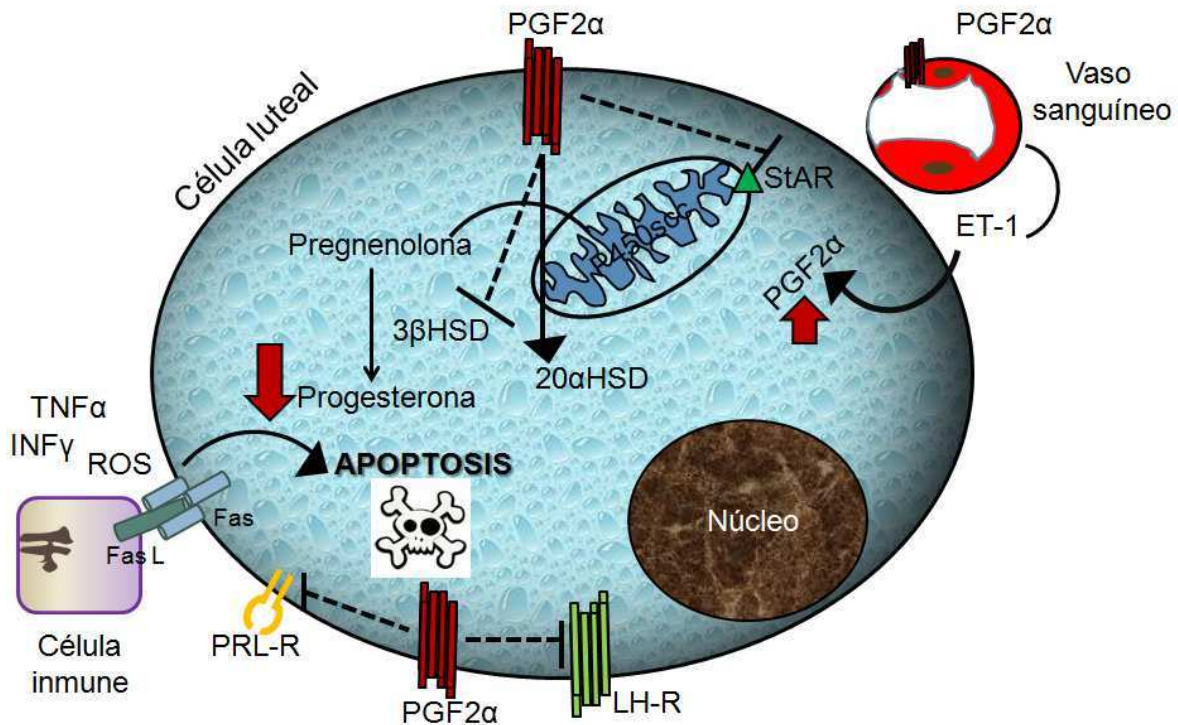


Figura 4: Representación esquemática de la luteólisis. Modificada de *Reproductive endocrinology* 2009.

7.2. Luteólisis estructural

La regresión estructural del CL se caracteriza por la disminución en el tamaño y peso de la glándula, la cual se convierte en una cicatriz en el estroma ovárico llamada cuerpo albicans,

que es reabsorbida y reemplazada por tejido ovárico. Uno de los principales eventos que caracteriza la regresión estructural del CL es la muerte por apoptosis de las células luteales y de las células vasculares del CL. La activación de este proceso puede darse por la vía externa (extrínseca) o interna (intrínseca) de la apoptosis, estos eventos convergen en una maquinaria de destrucción celular que involucra a una serie de proteasas llamadas caspasas. Estas proteínas juegan un rol clave en la apoptosis siendo su activación un evento crítico en este proceso. Estas proteasas regulan la destrucción de proteínas celulares como por ejemplo PARP (poly ADP- ribosa polimerasa), lamininas y fodrininas que contribuyen a los cambios morfológicos observados en células apoptóticas [111-113].

8. Apoptosis

La apoptosis es una forma de muerte celular regulada genéticamente que tiene como objetivo eliminar células redundantes, dañadas, senescentes o infectadas. Así, los organismos han desarrollado un mecanismo de suicidio celular denominado apoptosis [114]. Este programa genético es vital para el desarrollo normal, para el mantenimiento de la homeostasis y para un sistema inmune efectivo. No es asombroso entonces, que la alteración en este proceso implique numerosas patologías que abarcan desde desórdenes degenerativos hasta autoinmunidad y cáncer [115;116].

Cabe destacar que la denominación muerte celular programada abarca numerosos procesos de muerte celular que comparten alguna de las características que poseen las células que mueren por apoptosis

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

Otros cambios que ocurren durante la apoptosis, son aquellos que involucran al núcleo de la célula. Una de las características es la fragmentación que sufre el ADN como consecuencia

de la activación de señales intracelulares que concluyen en la activación de endonucleasas produciendo clivajes en el ADN de forma regular entre las unidades nucleosomales. Como resultado de esta activación se generan fragmentos en un tamaño múltiplo de 180 pares de bases lo que constituye un patrón característico de este proceso [117].

En este proceso de muerte celular, intervienen una serie de proteasas que están presentes en la mayoría de los tipos celulares en forma de zimógenos, llamadas caspasas. Las caspasas son cisteín- proteasas que clivan en residuos de aspartato, varios cientos de sustratos celulares [113]. Han sido descritos dos mecanismos de activación de las caspasas. Uno de ellos, el extrínseco, se dispara al activarse los llamados “receptores de muerte”, que están situados en la superficie celular [118]. El otro, el intrínseco, es provocado por diversas formas de estrés, como ser una inadecuada provisión de citoquinas o daño intracelular, e involucra principalmente a la mitocondria. Durante el estrés, la decisión de la célula de provocar o no su suicidio, depende principalmente de las proteínas de la familia de Bcl-2. Los miembros de esta familia, con funciones opuestas, pro o anti-apoptóticas, integran señales que reciben de otras células y censan el daño intracelular para determinar si disparan la activación de las caspasas [116].

Dentro de las caspasas, existe un grupo denominado “ejecutoras” (caspasa -3, -6 y -7) que son capaces de actuar sobre sustratos intracelulares. Para ello, sus zimógenos (procaspasas), deben ser clivados proteolíticamente por las caspasas “iniciadoras”, como la caspasa -8, -9 o -10. Contrariamente a las caspasas ejecutoras, las caspasas iniciadoras tienen un dominio largo y su activación se dispara por la dimerización de los zimógenos a través de una proteína adaptadora [119] (Figura 5 y 6).

La caspasa-3 es la principal caspasa efectora [120]. Se sintetiza como una pro-enzima de 33 kDa que, luego de su activación, es clivada generando un fragmento activo de 11 kDa y un intermediario de 20 kDa. Este último a su vez, es nuevamente clivado generando el segundo fragmento activo de 17 kDa [121]. Existe un número limitado de sustratos que son clivados por la caspasa-3 durante el proceso de apoptosis. Entre ellos, podemos destacar la proteína PARP (poli-ADP ribosa polimerasa) [122] y actina [123] los cuales son inhibidores de la enzima DNAasa I, endonucleasa responsable de la fragmentación del ADN durante el proceso de apoptosis [124]. Por otro lado la caspasa-7 posee sustratos en común con la caspasa-3.

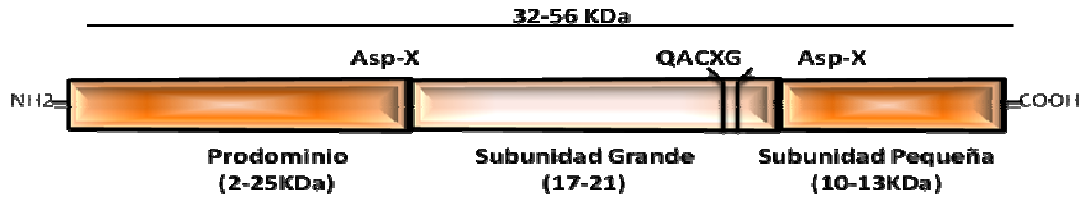


Figura 5: Estructura básica de las caspasas conteniendo los dominios: prodominio, subunidad grande, subunidad pequeña y región conectora.

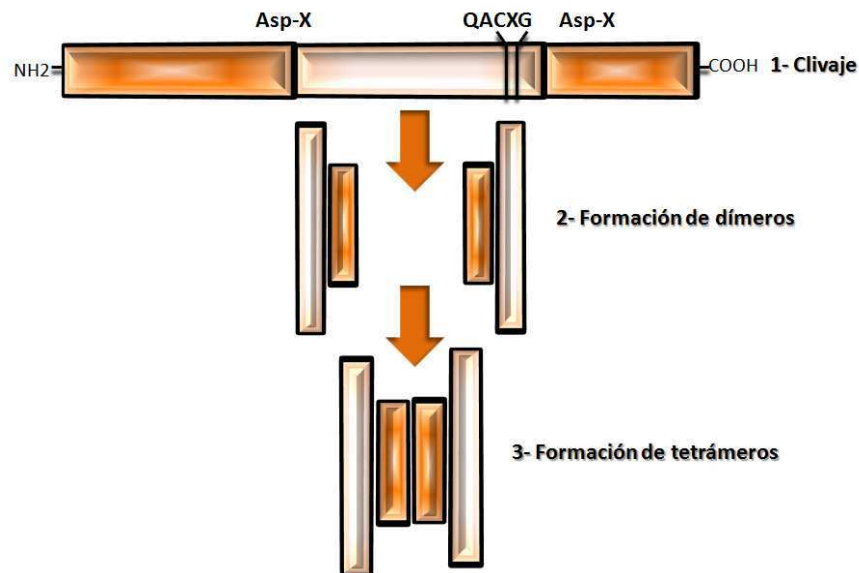


Figura 6: Esquema general de la activación de las caspasas. Esta requiere de un procesamiento proteolítico en residuos de aspartato entre los dominios, resultando en la eliminación del prodominio y de la región conectora. Luego, la subunidad grande y la pequeña forman un heterodímero. Luego para activarse debe formar un tetrámero entre dos heterodímeros.

8.1. Vía Extrínseca de la apoptosis

La vía extrínseca de la apoptosis o también llamada camino de receptores de muerte se inicia por la activación de receptores de muerte específicos situados en la membrana celular por ligandos como TNF (factor de necrosis tumoral), FASL (también llamado CD95L) y Apo 2L/TRAIL (Apo 2 ligando/ ligando inductor de apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral, TNF) [118]. Los receptores de muerte, como TNFR1, FAS, TRAILR o DR5 (receptor de muerte 5) pertenecen a la superfamilia de TNF y al unirse a sus ligandos, se trimerizan permitiendo una rápida y efectiva inducción de la apoptosis a través de la activación de la caspasa 8 (Figura 8).

Uno de los principales receptores de muerte es el antígeno FAS. FAS y su ligando FASL se expresan en una gran variedad de células, como timocitos, células B activadas, células T, monocitos, macrófagos, neutrófilos y en células no relacionadas al sistema inmune, como ser hepatocitos, células pulmonares y cardíacas y células del ovario. Una vez activados por la unión de sus ligandos y luego de la trimerización, estos receptores reclutan, mediante su dominio de muerte (DD) a otras proteínas que poseen dicho dominio, como la proteína adaptadora FADD (dominio de muerte asociado a Fas) que a su vez, al estar unida a los receptores activados, recluta a las procaspasas iniciadoras -8 y -10. La unión de todas estas proteínas conforma un complejo de señales inductores de muerte (DISC).

Diversos estudios acerca del rol fisiológico de Apo2L/TRAIL, sugieren que este ligando tiene un papel en la vigilancia del sistema inmune y en la regulación de la respuesta inmune adaptativa [125]. Más aún, este mecanismo media la citotoxicidad de las células dendríticas, monocitos, células natural killer (NK) y células T frente a virus y tumores [126]. Hay además cierta evidencia de que algunos efectos antivirales y antitumorales del interferón están mediados por estos receptores [127].

8.2. Vía intrínseca de la apoptosis

Como se mencionó anteriormente, en la vía intrínseca la proteína p53 es un punto de control crítico para su activación. Esta proteína es un factor de transcripción que responde al estrés celular arrojando el ciclo celular a la espera de la reparación del daño del ADN. Si el daño celular es grande y no puede ser reparado, p53 promueve la apoptosis a través de la inducción de genes pro-apoptóticos como puma, noxa, bax, apaf1 y fas o inhibiendo la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 o Bcl-xL [128;129].

La vía mitocondrial está controlada por los miembros pro y anti-apoptóticos de la familia de Bcl-2 y, dependiendo del balance entre los niveles de proteínas con efectos opuestos, será el destino final de la célula: supervivencia o apoptosis. Los miembros proapoptóticos causan la permeabilización de la membrana externa mitocondrial y de esta forma, permiten la liberación de moléculas solubles como citocromo c y Smac/DIABLO al citoplasma. El citocromo c estimula la formación del *apoptosoma*, un complejo formado por el factor activador de proteasas apoptóticas 1 (Apaf1), dATP, citocromo c y caspasa-9 (Figura 7). La caspasa -9 es activada al incorporarse al apoptosoma y una vez activa, cliva a las caspasas efectoras -3, -6 y -7. Smac/DIABLO se une a las proteínas inhibitorias de la apoptosis

(IAPs) y revierten su interacción con las caspasas, lo que permite a estas últimas activarse [130].

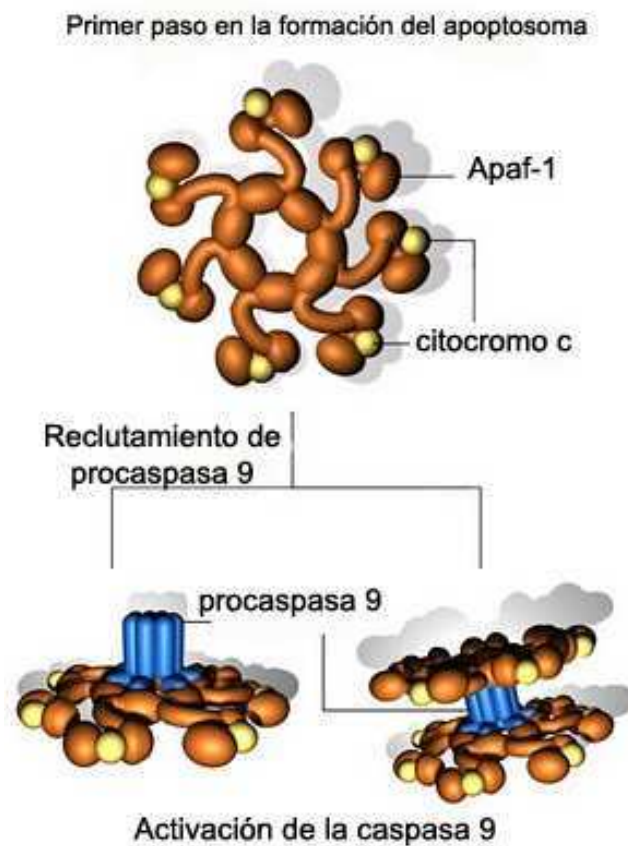


Figura 7 Esquema de la formación del apoptosoma.

Los miembros de la familia de Bcl-2 pueden dividirse en tres grupos. Todos comparten por lo menos uno de los cuatro dominios de homología a Bcl-2 (dominios BH). El primer grupo está integrado por los miembros que poseen todos los dominios BH y se comportan como anti-apoptóticos, como ser Bcl-2, Bcl_L y Bcl_w. En el caso particular de Bcl_X, cabe destacar que existen dos isoformas de esta proteína, formadas por splicing alternativo del ARNm: Bcl_L y Bcl_S. Bcl_L, de 32 kDa, actúa como anti-apoptótica mientras que Bcl_S, de 27 kDa, se comporta como una proteína pro-apoptótica. El segundo grupo comprende los miembros multidominio (contienen los dominios BH1, BH2 y BH3) pero que se comportan como pro-apoptóticos. Entre los mismos se puede mencionar Bax, Bak y Bok. Las proteínas anti-apoptóticas se unen con las proteínas pro-apoptóticas formando heterodímeros e impiden que estas últimas puedan ejercer su acción permeabilizante en la

membrana externa mitocondrial. Por último se encuentran proteínas, como Bad, Bim, Bid, Puma y Noxa, que contienen sólo el dominio BH3 (*BH3 only*), el cual es necesario y suficiente para otorgarles su acción pro-apoptótica [119]. Algunos estímulos específicos activan a ciertas proteínas *BH3 only* por inducción de la transcripción o por modificaciones post-transcripcionales y rompen el equilibrio entre proteínas pro y anti-apoptóticas, lo que desencadena la apoptosis. Esto ocurre principalmente a través de la unión de las proteínas *BH3 only* a los miembros anti-apoptóticos de esta familia impidiendo así su efecto inhibitorio por unión a los miembros pro-apoptóticos multidominio [131].

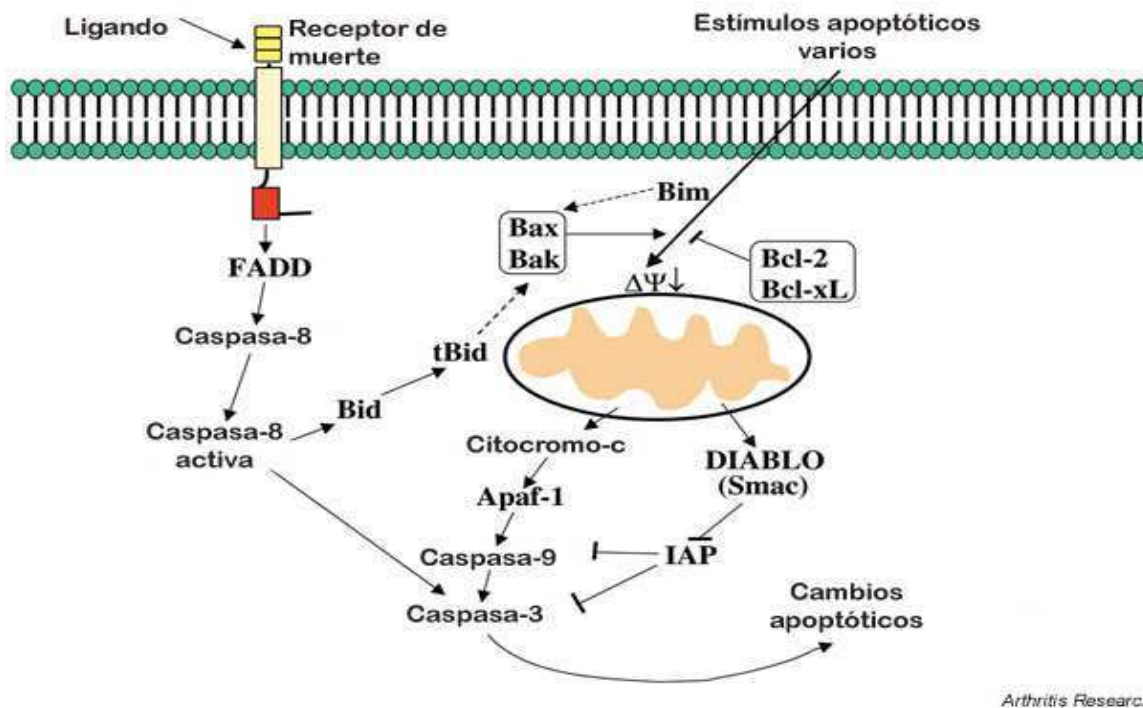


Figura 8: Vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis. Modificada de Mak y col. 2002[132].

En particular BAD, una de las proteínas *BH3 only*, se caracteriza por interactuar a través de este dominio con miembros anti apoptóticos de la familia de Bcl-2, como por ejemplo Bcl-X_L. Cuando BAD está sobreexpresado, bloquea la supervivencia celular dependiente de esta proteína [133;134]. La exposición de las células a factores de crecimiento induce la fosforilación de BAD en dos sitios, Ser-112 y Ser-136, produciendo la disociación de BAD de Bcl-X_L y su asociación a las proteínas citoplasmáticas. La asociación a estas proteínas podría proteger a BAD de la desfosforilación. A pesar de que Ser-112 corresponde a un

sitio consenso para la fosforilación por Akt, Akt fosforila a BAD en Ser-136. La fosforilación en Ser-136 por Akt produce la inactivación de BAD [135].

8.3. Apoptosis y CL

La apoptosis está asociada con la regresión del cuerpo lúteo (CL) en muchas especies [136]. La caspasa efectora -3 se expresa en el CL de ratas y ratones. [137;138]. La importancia de esta caspasa como mediador de la apoptosis en la regresión luteal ha sido demostrada con el uso de ratones que no expresan esta proteína. Los CLs de estos animales muestran cantidades atenuadas de apoptosis y un retraso en el proceso de involución luteal, aún así estos CLs regresionan, indicando que esta caspasa no es el único factor involucrado en este proceso.

En ratas, las caspasas tienen un rol importante durante los primeros eventos de la luteólisis en los CLs del ciclo estral [136]. Peluffo y col. (2007) demostraron que el aumento en la actividad de las caspasas-2, -8, -9 y -3 se asocia a los eventos tempranos de la luteólisis funcional (al final de la gestación) y que la $PGF2\alpha$ regula la actividad de estas caspasas en el CL de la rata [139]. Este resultado coincide con lo observado por Yadav y col. (2005) en el cual la $PGF2\alpha$ induce apoptosis luteal asociada con un aumento en la actividad de las caspasas -8, -9 y -3 así como un aumento en la proteína pro-apoptótica BAX y el ligando de los receptores de muerte: FasL. En este sistema el inhibidor de caspasa-8, pero no el de caspasa -9 previno, completamente, la activación de caspasa-3 inducida por $PGF2\alpha$. Estas observaciones sugieren la importancia de la vía extrínseca en mediar la apoptosis inducida por $PGF2\alpha$ en células luteales de ratas [140].

9. Rol de las células del sistema inmune en CL y en la luteólisis

Los cambios dinámicos que caracterizan al sistema reproductivo están bajo regulación hormonal. Sin embargo las interacciones locales célula-célula pueden mediar la respuesta de los tejidos a la dicha señalización hormonal. El CL es un excelente modelo para entender como las células inmunes son reclutadas en los tejidos y el papel que desempeñan en la homeostasis de los mismos. Los leucocitos son reclutados durante toda la vida útil del CL y sus citoquinas han sido encontradas en CL de todas las especies examinadas. Las citoquinas proinflamatorias inhiben la esteroidogénesis estimulada por gonadotrofinas, son capaces de estimular profundamente la síntesis de prostaglandina por las células luteales, y promover la apoptosis. Sin embargo, hay cada vez más evidencias de que los leucocitos y las células

luteales se comunican de diferentes maneras para mantener la homeostasis en el CL funcional.

Las células inmunes están presentes en el CL de todas las especies estudiadas hasta el momento. Muchos estudios se han centrado en el aumento de las células inmunes que se observa durante la luteólisis, pero estas células están presentes a lo largo de la vida útil del mismo. Estudios inmunohistoquímicos revelaron que el tipo de leucocitos cambia de acuerdo con el estado funcional del CL. En el CL bovino, parece que hay una relación inversa en el número de granulocitos y los linfocitos a lo largo de su vida útil. Los eosinófilos son más abundantes en el desarrollo, con respecto al CL completamente funcional [141;142] y parecen ser reclutados en el desarrollo mediante la expresión de selectina P (CD62P) en las células endoteliales [143].

Los linfocitos T (células T) existen en muy bajo número en el CL en desarrollo, aumentando en el CL funcional y llegando a un número máximo durante la luteólisis. Cada uno de los subtipos presentes de células T (CD4+, CD8+ o CD3+) en el CL refleja el significado funcional de estas células [144;145]. Los macrófagos también aumentan durante la regresión luteal en bovinos. En ovejas y cerdas los eosinófilos aumentan durante el desarrollo luteal, junto a los macrófagos migran al CL durante la luteólisis [146-148]. Los neutrófilos están presentes en menor número que los eosinófilos. [144;149]. Las células T también aumentan durante la luteólisis en ratones, en cambio, no se observaron cambios durante la preñez o pseudopreñez en ratas [150]. En conejas las células T se encuentran en el CL antes del reclutamiento de los macrófagos [151], estos macrófagos incrementan su número durante la regresión luteal o siguiendo a la disminución del estradiol. Sin embargo en el ratón los macrófagos declinan en la regresión luteal tardía, mientras que las células T continúan aumentando. Los macrófagos derivados de ovarios de ratón son menos activos que los macrófagos circulantes en la exacción de moléculas extrañas, sugiriendo el ambiente tisular regula la función de los macrófagos residentes. El reclutamiento de monocitos/macrófagos en el CL de la rata es independiente de la concentración de P4 [152].

El TNF- α es producido en el CL y tiene un rol en la luteólisis funcional. Las concentraciones del mismo son mayores en el CL en regresión y se corresponden con la

acumulación de los macrófagos presentes [151]. En el CL bovino son detectables los niveles del ARNm de TNF- α y de IFN γ , si bien la concentración luteal del ARNm de TNF- α no varía significativamente durante el ciclo estral, la proteína está aumentada entre los días 13 y 18 del ciclo. La habilidad del TNF- α para desencadenar una respuesta fisiológica en el CL es sugerida por la presencia de los receptores de TNF tipo I (TNFRI). La expresión del receptor es menor entre los días 15 y 17, correspondiendo con el aumento del TNF, sugiriendo que TNF- α regula la expresión de sus propios receptores en este tejido [153]. Los primeros efectos funcionales de TNF- α fueron demostrados usando células bovinas, en las cuales TNF- α aumentó la producción de prostaglandinas, y disminuyó la síntesis de P4 estimulada por LH, además aumentó el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I, pero no el II. Si bien estos efectos pueden ser considerados dentro de un rol en la luteólisis, hay evidencias que de que el aumento de las concentraciones de TNF- α promueve también la supervivencia luteal [154;155]. En células luteales bovinas en cultivo se demostró que el interferón gamma (IFN- γ) tiene efectos similares a los de TNF- α . IFN- γ inhibe la producción de P4 estimulada por la LH, aumenta la síntesis de prostaglandinas, aumentan las moléculas MHC clase I y clase II y causa muerte celular por apoptosis [156;157]. Los efectos apoptóticos de IFN- γ en células luteales implican aumento en la expresión de Fas [158].

Los efectos del IFN- γ en células luteales se potencian con la presencia de TNF- α [158;159] probablemente a causa de la inducción positiva de TNF- α sobre los receptores IFN- γ . La inducción de la apoptosis por IFN- γ + TNF- α puede ser suprimida por IFN- α o acetilcolina, y la P4 pueden conferir un efecto protector contra la apoptosis en el CL [160].

En roedores y primates, los efectos de expresión y función del TNF- α e IFN- γ parecen ser similares a lo observado en bovinos. No se observaron cambios significativos en las concentraciones de TNF- α durante la vida de la CL murino, mientras que IFN- γ sólo se detectó en una regresión luteal, similar a lo visto en las células luteales bovinas.

TNF- α inhibe la producción de P4 en las células luteales de rata, como resultado de la regulación negativa de la StAR y del receptor de la LH [161]. La combinación de TNF- α y IFN- γ ejercen profundos efectos pro-apoptóticos en células luteales de roedores, alterando el sistema de Fas / FasL [161;162]. En monas el ARNm de TNF- α aumenta con la edad del

CL [136]. Usando modelos de ratones mutantes, se evidenció que, durante la luteólisis, el rol de TNF- α está mediado por una mayor actividad de la esfingomielinasa ácida (ASM) [163].

Los efectos de la expresión y función de las citoquinas pro inflamatorias descritas anteriormente apuntan a un rol en la luteólisis. El ARNm de las citoquinas más estudiadas en lo que respecta a la función lútea, IL1 β , TNF- α y IFN- γ , se incrementa durante la luteólisis en la vaca, como así también el receptor TNFI. Es probable que varios tipos celulares sean el blanco de las acciones de TNF- α en el CL en regresión.

Como se señaló anteriormente, TNF- α , ya sea solo o en combinación con IFN- γ , inhibe la producción de P4 estimulada por la LH, mientras que estimula la producción de prostaglandinas por las células esteroideogénicas. Los efectos apoptóticos de TNF- α pueden ser ejercidos, principalmente, en las células endoteliales luteales, ya que TNF- α indujo apoptosis en estas células en cultivo, no así en células esteroidogénicas bovinas [164].

TNF- α regula la secreción de quimioquinas por las células endoteliales [165], pudiendo ser esta una señal temprana para reclutar leucocitos facilitando, de esta manera la luteólisis.

En todas las especies estudiadas, hay un mayor número de macrófagos y linfocitos en el CL en regresión que en el CL funcional. Esto se debe, principalmente, a causa de la trasmigración de leucocitos de los capilares al parénquima. El porcentaje de leucocitos que proliferan incrementa de un 20% en el CL totalmente funcional a un 70% durante la fase de regresión luteal. La mayoría de las células que proliferan son macrófagos, si bien se ha detectado una pequeña proporción de leucocitos que también proliferan.

10. Esfingolípidos: El rol del S1P

Una de las funciones más interesantes de los lípidos en el contexto de la biología celular es su capacidad de regular numerosos procesos cruciales para la vida de las células. En particular, los esfingolípidos se han revelado como elementos clave en las cascadas de transducción de señales que regulan procesos importantes de la fisiología celular tales como crecimiento, diferenciación, y muerte celular. Consecuentemente, la biología de los esfingolípidos se ha convertido en un centro importante para la investigación en señalización celular. 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".

Los dos principales esfingolípidos involucrados en vías de señalización que regulan la proliferación, apoptosis, motilidad, diferenciación, respuestas al estrés, síntesis proteica, metabolismo de carbohidratos inmunidad innata y adaptativa y angiogénesis, son: ceramida y esfingosina 1-fosfato (S1P).

La ceramida, que es el centro de la ruta de síntesis y degradación de esfingolípidos, se podría considerar como regulador del destino celular. Por un lado, la generación de ceramida por estímulos de estrés, activa rutas encaminadas a producir la muerte celular, pero por otro lado su transformación en ceramida 1-fosfato (C1P) o en esfingosina y, posteriormente en esfingosina 1-fosfato (S1P) activa vías mitogénicas y regula diferenciación y proliferación. Además, S1P actúa como ligando extracelular uniéndose a los receptores S1P1-5 que pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs).

En relación a la influencia sobre el destino celular, estos dos lípidos y sus proteínas que median sus funciones de señalización y el metabolismo, han sido implicados en varios aspectos de la biología tumoral y quimio o radio resistencia [166].

10.1. Estructura y metabolismo de los esfingolípidos

Los esfingolípidos están formados por tres motivos estructurales principales: una base de cadena larga, la esfingosina, un ácido graso de longitud variable unido al carbono-2 de la cadena base y diversas cabezas polares unidas al carbono-1. En el caso de la esfingomielina

el grupo hidrofílico es la fosforilcolina mientras que en el caso de los glicoesfingolípidos es un azúcar [167]. El ácido graso de longitud variable (2-28 carbonos) unido a la esfingosina o cadena similar forma la familia de ceramida, una molécula hidrofóbica cuya producción es incrementada bajo estímulos de estrés. (Figura 9).

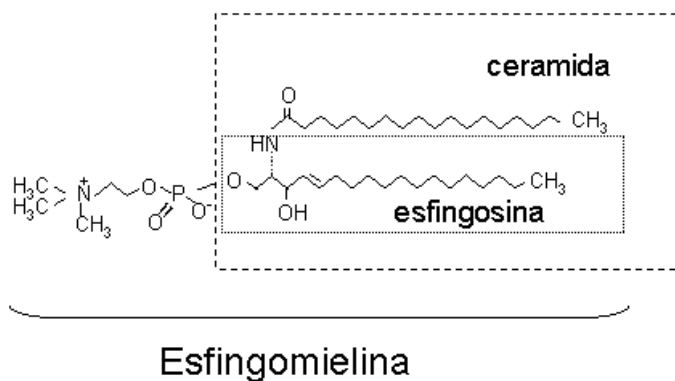


Figura 9: Estructura de los esfingolípidos.

Hay dos vías principales por las que se puede generar ceramida: la síntesis *de novo* y la degradación de la esfingomieline de la membrana celular por medio de las esfingomielinasas.

La biosíntesis *de novo* de los esfingolípidos se lleva a cabo en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi y empieza con la condensación de la serina y normalmente el palmitoil CoA, llevada a cabo por la enzima serin palmitoil transferasa (SPT) para dar 3-cetoesfinganina, la cual, posteriormente, es reducida a esfinganina y convertida a dihidroceramida por la enzima dihidroceramida sintasa, también llamada ceramida sintasa (Figura 10). El siguiente paso es la desaturación de la dihidroceramida para generar ceramida, la cual sirve como precursor para esfingomieline y otros esfingolípidos complejos como cerebrósidos y gangliósidos, que se forman por la adición de sustituyentes específicos en la posición C1. La síntesis de esfingomieline está catalizada por la esfingomieline sintasa que transfiere fosforilcolina a la ceramida, generando esfingomieline y diacilglicerol. La degradación de ceramida incluye una desacilación llevada a cabo por las ceramidinas, que rinde un ácido graso y esfingosina. Esta reacción regula los niveles relativos de ceramida y esfingosina y es crucial para regular el destino celular. La esfingosina es rápidamente convertida por la enzima esfingosina quinasa (SphK) a S1P, que es uno de los esfingolípidos bioactivos más importantes. Por otro lado, la ceramida también

puede ser fosforilada por la enzima ceramida quinasa (CERK) para dar ceramida-1-fosfato (C1P). (Figura 10).

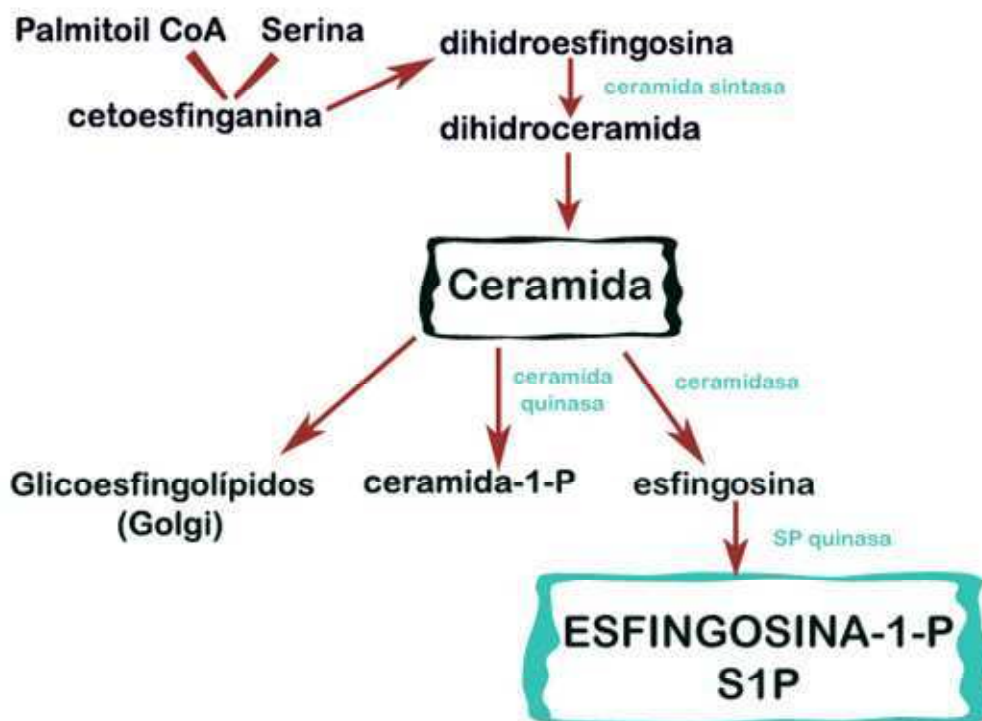


Figura 10: Biosíntesis de los esfingolípidos.

La segunda vía para la generación de la ceramida incluye la degradación de la esfingomielina catalizado por la enzima esfingomielinasa (SMasa) la cual rompe la esfingomielina para dar ceramida y fosforilcolina. La hidrólisis de la esfinomielina está considerada como la principal vía para la producción de ceramida como transductor de señales que regulan la muerte celular [168].

Al menos cinco subtipos diferentes de SMasas han sido identificados basándose en su pH óptimo, localización subcelular y dependencia de cationes. Entre ellas se incluyen la Smasa neutra dependiente de magnesio y unida a membrana (N-SMasa), una SMasa neutra independiente de magnesio, la SMasa ácida presente en los lisosomas (A-SMasa), una forma secretada y soluble de SMasa ácida dependiente de zinc y una SMasa alcalina [169]. A pesar de los intensos estudios basados en el mecanismo para la activación de estas SMasas, su papel específico no está todavía claro, siendo la N-SMasa y la A-SMasa las más

estudiadas. Se sabe que ambas enzimas pueden ser activadas por el receptor del factor de necrosis tumoral, TNF, así como por otros estímulos de estrés. La N-SMasa es activada por el receptor de TNF a través de una proteína adaptadora denominada FAN (factor associated with N-SMase activation) que se asocia al dominio NSD del receptor [168].

La proteína FAN a su vez puede asociarse con otras proteínas ensambladoras como el receptor de PKC activada RACK1, que sirve de atracción y activación de numerosas proteínas implicadas en rutas de señalización. La A-SMasa, puede ser también activada por el receptor de TNF a través de otras proteínas adaptadoras como FADD y TRADD que se unen al dominio de muerte (DED) del receptor [170].

10.2. Regulación del destino tisular por los esfingolípidos

Uno de los aspectos más interesantes 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. Es por ello que las reacciones catalizadas por la ceramida quinasa y por la esfingosina quinasa son fundamentales para determinar las funciones vitales de la célula, estando, ambas reacciones, altamente reguladas. (Figura 11).



Figura 11: Destino celular mediado por esfingolípidos.

10.3. Mecanismos de señalización activados por ceramida y ceramida 1 fosfato C1P

La ceramida actúa como segundo mensajero activando numerosas vías de transducción de señales. Se genera por hidrólisis de la esfingomielina o bien 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, carencia de factores de crecimiento, hipoxia [168] o exposición a cannabinoides [171]. Las células reaccionan de manera diferente a una elevación en los niveles de ceramida: algunas ponen en marcha el proceso de apoptosis, mientras que otras se comprometan a la diferenciación terminal, o detienen ciclo celular, en función de las vías efectoras activadas [172]. Entre las proteínas que interaccionan con la ceramida se incluyen a CAPK (proteína quinasa activada por ceramida), Ras, CAPP (proteína fosfatasa activada por ceramida), PP2A, y PKC-Delta (proteína quinasa-C-Delta). La unión de ceramida a RAF1 conduce a la retención de RAF1, e inactiva a los complejos Ras-RAF1 [173-175].

La ceramida regula directamente KSR (supresor de la cinasa de Ras), PLA2 (fosfolipasa-A2), catepsina-D, y diferentes isoformas de PKC, y c-RAF1 [176].

Además, induce apoptosis mediante la activación de JNK (c-Jun N-terminal quinasa) / SAPK (proteína quinasa activada por estrés), y la promoción de la desfosforilación de BCL2, BAX y BAD. La desfosforilación de BCL2 está mediada por la actividad de CAPP, mientras que la desfosforilación de Bad por ceramida es a través de la activación de la KSR y la posterior activación de MEK1 (MAPK / ERK quinasa) y la vía MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos), que conduce a una disminución en la activación de PKB (proteína quinasa B) [177].

La ceramida también inhibe directamente la PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa), bloqueando la actividad de Akt/PKB y la fosforilación de BAD.

Cuando CAPK se fosforila, activa a RAF1, que luego fosforila y activa a MAPK, ERK1/2, lo que dispara las vías de MAPK/ERK. Consistente con esto, la estimulación de la vía de la esfingomielina induce la activación de ERK y la translocación de NF-kappaB (factor nuclear kappa-B). La activación de JNK por ceramida regula el factor de transcripción AP-1 (proteína activadora 1) e induce la expresión de genes de diferenciación en monocitos/macrófagos [178]. La ceramida activa la cascada de SAPK a través de la

activación directa de PKC delta, activa a caspasa-3 y las endonucleasas responsables del clivaje del ADN, además ceramida por enzimas Smasa se une directamente a PLA2 y catepsina-D, que inducen la apoptosis [176].

Varios agentes estimulan la vía de la ceramida, incluyendo citocinas como el TNF-alfa, IL-1 beta (IL-1 beta), el interferón gamma, NGF (factor de crecimiento nervioso), anti-CD28, anti- anticuerpos Fas, medicamentos contra el cáncer, las radiaciones ionizantes, radiación ultravioleta, agentes químicos quimioterapéuticos y genotóxicos, que inician numerosos procesos fisiológicos [179]. Dependiendo del tipo celular (células de leucemia monoblastica, células endoteliales, fibroblastos y oligodendrositos), la ceramida actúa como modulador de la diferenciación de las células inmunes, liberación de citocromo c, inflamación, progresión del ciclo celular apoptosis y respuesta al estrés. La ceramida está surgiendo como un componente importante de las apoptosis dependiente de la mitocondria y en la regulación de las respuestas al estrés. Además, la ceramida induce detención del ciclo celular, debido a la inducción de la desfosforilación del producto del gen Rb (retinoblastoma) [180]. La ceramida también actúa como un modulador endógeno de la función leucocitaria, ya que inhibe el estallido respiratorio y la fagocitosis [179].

La ceramida bloquea la señalización de la insulina mediante la prevención de la activación de la vía de Akt /PKB. Por lo tanto, la capacidad de ceramida para inducir la detención del crecimiento, sin inducir apoptosis o necrosis significativa, puede ser de valor terapéutico en la prevención o el control de la proliferación celular durante las enfermedades inflamatorias renales y vasculares. En los últimos años ha habido un interés creciente en explorar el papel de la ceramida y sus metabolitos en la fisiología y la fisiopatología de los tejidos. Por lo tanto las estrategias que elevan la ceramida celular están siendo utilizados para las terapias dirigidas a la detención del crecimiento o promoción de la apoptosis [181].

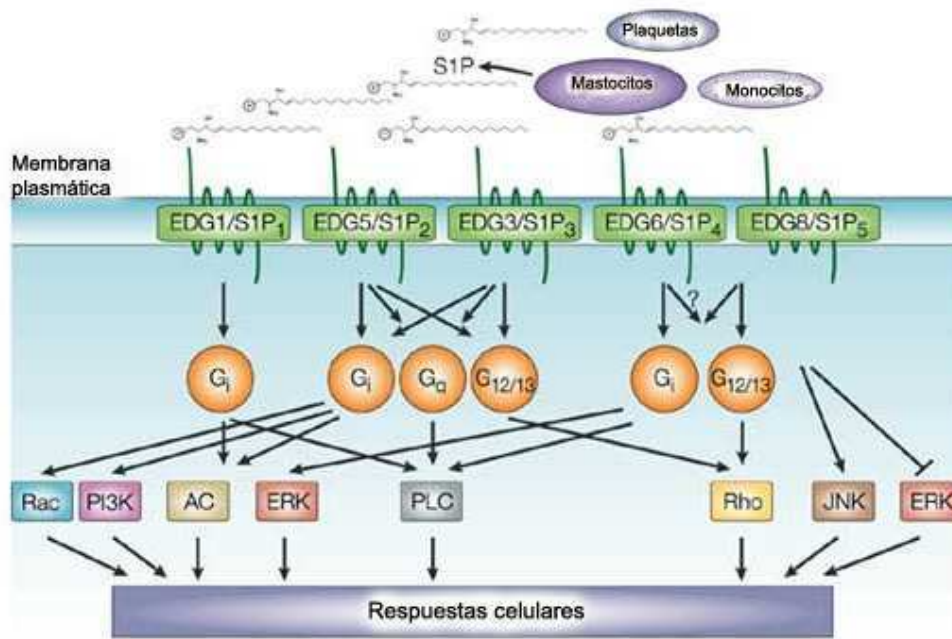
La ceramida-1-fosfato puede ser producida por una ceramida quinasa dependiente de ATP (CERK) [182]. Esta quinasa es altamente específica para la ceramida y su actividad es dependiente de iones Mg^{2+} [183] y de iones Ca^{2+} a través de su unión a calmodulina. C1P generada por CERK, ha sido implicada en diferentes procesos celulares como respuesta inflamatoria, fagocitosis, inhibición de apoptosis, mitogénesis [184] y mecanismos de patogenia inducidos por agentes infecciosos. C1P media la liberación de ácido araquidónico

por PLA2, que es el primer paso para la biosíntesis de eicosanoides. Estos compuestos son mediadores de la respuesta inflamatoria y están implicados en la patogénesis de numerosas enfermedades incluyendo cáncer, enfermedades cardiovasculares o asma.

Otras acciones biológicas de C1P incluyen la inhibición de la apoptosis y la inducción de la supervivencia celular. El mecanismo por el cual C1P ejerce este efecto probablemente sea la inhibición directa de la esfingomielinasa ácida (aSMasa) [185]. La bajada de niveles de ceramida llevaría a promover la activación de otras señales celulares inductoras de la supervivencia celular. En este sentido, se ha demostrado que la C1P induce activación de la vía PI3K/PKB, la cuál es el principal mecanismo por el que promueven supervivencia celular los factores de crecimiento. Además C1P estimula la síntesis de ADN y la división celular en fibroblastos [186;187].

La esfingosina 1-fosfato se genera a partir de la esfingosina por la acción de las esfingosina kinasas 1 y 2 (SphK1 y SphK2). SphK1 es una enzima de supervivencia cuya expresión está aumentada en muchas células malignas. La inhibición de la actividad de estas enzimas conlleva un bloqueo de la proliferación e inducción de la apoptosis en células cancerígenas, por lo que los inhibidores de SphK1 podrían tener un importante potencial terapéutico [188]. Sin embargo, SphK2 parece tener un papel opuesto, ya que su sobreexpresión inhibe el crecimiento celular [189].

Una vez generada, S1P puede actuar tanto intracelularmente como segundo mensajero, como extracelularmente, uniéndose a receptores de membrana de los que es un ligando específico. Se han descubierto transportadores específicos que podrían exportar la S1P desde el interior celular al medio extracelular. Se han caracterizado 5 subtipos de receptores de S1P que pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas g (GPCR) y que se han denominado: S1P1, S1P2, S1P3, S1P4 y S1P5 [190;191]. Las vías de señalización intracelular activadas por estos receptores son diversas ya que están acoplados a diferentes subtipos de proteínas G (Figura 12).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 12: Mecanismos de transducción activados por los receptores de S1P. Modificado de Spiegel y col. 2003 [192].

Una de las vías de señalización más estudiadas es el aumento de calcio intracelular que se produce tanto por acoplamiento a fosfolipasa C (PLC) a través de G_q como de forma independiente de PLC [193;194].

Además los receptores de S1P acoplados a G_{12/13} pueden activar la GTPasa monomérica Rho, la cuál es un importante regulador del citoesqueleto y de la movilidad celular [195]. Las respuestas mitogénicas y de supervivencia de S1P son principalmente activadas por los receptores S1P acoplados a proteínas G_i que regulan las vías de PI3K/Akt y Ras/ERK.

Otro posible mecanismo de acción de los receptores S1P es la transactivación de receptores de factores de crecimiento. Por ejemplo, se ha demostrado que el receptor S1P3 está involucrado en la transactivación del receptor EGFR inducida por estrógenos [196]. Además de estas vías, S1P también actúa de forma intracelular modulando varias cascadas de transducción entre las que se encuentran Ras/Raf/MEK/ERK y PI3K/Akt.

10.4. S1P en el sistema reproductivo

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 [197;198].

Por otro lado, se demostró que la esfingosina fue capaz de inhibir el AMPc inducido por LH y forskolina en las células luteales [199;200] y que el tratamiento con esfingosina de células esteroidogénicas luteales sin estimular produjo una disminución en la producción de P4 y en la viabilidad celular [199]. Se ha visto que Fas media la activación del camino de la esfingomielina en células luteales esteroidogénicas en bovinos [201] Además el camino de la esfingomielina estaría involucrado en la muerte celular inducida por TNF- α en las células endoteliales derivadas del CL bovino [202].

La enzima ASMasa es responsable de la conversión de la esfingomielina en ceramida, [203] y ambos ASMasa y ceramida son potentes inductores de la apoptosis en células de la granulosa luteínicas. La luteólisis inducida por PGF2 α puede incrementar TNF, y este puede causar un incremento en la actividad de ASMasa, la cual puede aumentar la producción de ceramida y estimular la muerte de células luteales MVECs. Las células endoteliales son ricas en ASMasa [204]. El CL al estar altamente vascularizado, provee una amplia fuente de ASMasa extracelular durante la vasoconstricción inducida por PGF2 α asociada a regresión luteal. Si esto es así, la disponibilidad de la ASMasa podría alterar los niveles de ceramida en las células esteroidogénicas vecinas, resultando en alteraciones en la dinámica de membrana incluyendo fluidez de membrana y la formación de macrodominios.

En los últimos años, ha crecido considerablemente la utilización de S1P o sus análogos como estrategia para inhibir la muerte de células germinales en distintas especies, pensándose como estrategia para evitar la pérdida de la fertilidad en mujeres sometidas a tratamientos quimioterapéuticos o radiación ionizante. En roedores, la administración intrabursa de S1P dos horas antes de una dosis de radiación ionizante previno la destrucción masiva de folículos y ovocitos causada por la radiación, presumiblemente por una inhibición de la apoptosis mediada por el S1P [205;206]. Además, la inclusión de S1P en la solución de vitrificación de ovarios de ratón tuvo efectos beneficiosos en la conservación del pool de folículos primordiales luego del trasplante de los mismos a ratones nude [207].

La administración de S1P o FTY720 (análogo de S1P) en ovarios de primates adultas mediante el uso de un catéter osmótico intraovárico protege de los daños causados por una dosis de radiación ionizante recuperando la fertilidad [208]. Además, usando un modelo de xenoinjertos, observaron que la degeneración de los folículos primordiales de tejido ovárico humano adulto trasplantado en ratones inmunodeficientes es prevenido por la inyección de S1P en el sitio del trasplante, administrado una hora antes de la radiación [208]. Estos resultados sugieren la viabilidad de la protección de la funcionalidad ovárica *in situ* mediante el uso de S1P o sus miméticos como una opción prometedora para mejorar la calidad de vida de las pacientes con cáncer en edad reproductiva.

En cuanto a la función de S1P sobre el desarrollo folicular y función del CL, no hay información al respecto, por lo cual se abre un nuevo camino en el estudio de la fisiología ovárica.

11. Vía de Señalización de Notch

La vía de señalización Notch está involucrada en el control de diversos eventos durante el desarrollo de las células eucarióticas como son la proliferación, el crecimiento, la migración, la diferenciación y la apoptosis (Figura 17).

Thomas Hunt Morgan describió al sistema Notch por primera vez en 1917, como responsable de la neurogénesis y la especificación del ectodermo en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*). En 1914 Dexter y colaboradores descubrieron la primera mutación del gen Notch. En 1919 Mohr y colaboradores lo caracterizaron al detectar una deficiencia funcional de la proteína Notch, que provoca la aparición de surcos (notches) en los bordes de las alas de *D. melanogaster*. En 1940 Poulson demostró que la pérdida del gen es letal en embriones. Posteriormente, en 1970, Wright encontró que las mutaciones del gen Notch-1 inducen la formación de una estirpe neurogénica en células que estaban destinadas a ser epidérmicas [209;210]. A mediados de los años ochenta, los grupos de Artavanis-Tsakonas y Young clonaron y expresaron independientemente el gen que consiste en un receptor con un solo dominio transmembranal [211;212]. Los genes que codifican para el receptor Notch han sido identificados en diversas especies, incluyendo primates y roedores, en las que se conocen cuatro genes que codifican a sus correspondientes proteínas Notch-1 al -4.

11.1. Familia Delta-Serrate-Lag

Los ligandos del receptor Notch en invertebrados son conocidos como Delta y Serrate para *D. melanogaster*, en tanto que para *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) se conoce LAG-1; a estos ligandos se les ha llamado colectivamente DSL. Otros ligandos en *C. elegans* son LAG-2, APX-1, ARG-2 y F16B12.2. (Tabla 2)

En mamíferos se conoce un grupo de homólogos de Delta denominados “Delta-like”; y llamados Jagged (JAG) para Serrate. En total se conocen cinco ligandos en mamíferos denominados JAG1, JAG2 y H-Delta-1, -3, y -4 (DLL1, DLL3, y DLL4) [213]. Las proteínas de este grupo se caracterizan por tener un solo paso de membrana, funcionar como ligandos, es decir, son las encargadas de transmitir el estímulo a las células receptoras, las cuales responden siguiendo un destino celular. (Figura 13).

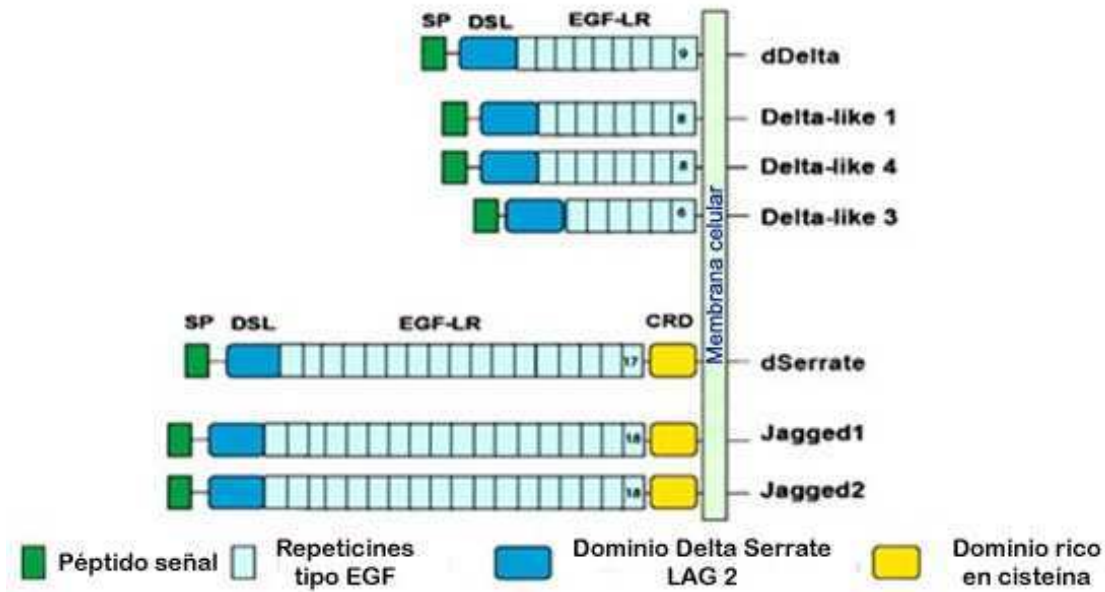


Figura 13 Ligandos de Notch en *Drosophila* y mamíferos. En mamíferos podemos encontrar cinco ligandos de Notch; Delta like 1, 3 y 4 que son homólogos a dDelta de *Drosophila*, mientras que Jagged1 y 2 son homólogos dSerrate en *Drosophila*. Al igual que los receptores, los ligandos son proteínas de transmembrana, las cuales el dominio extracelular contiene un número característico de repeticiones de tipo EGF y un dominio N-terminal rico en cisteína. El dominio DSL es un dominio conservado que se encuentra en todos los ligandos y es indispensable para la unión al receptor. Además Serrate, Jagged1 y Jagged2 contienen un dominio adicional rico en cisteína Adaptación de Trojantec 2007-2011.

Estos ligandos poseen un péptido señal hacia la región N-terminal necesario para su transporte a través de la membrana citoplasmática, seguido de un dominio extracelular (NT) de 100-165 aminoácidos (aa). Seguidamente se encuentra el dominio común a los miembros de esta familia, por lo que su nombre es dominio DSL (Delta-Serrate-Lag-2), de ~45 aa homólogo al factor de crecimiento epidérmico (EGF), excepto por la ausencia de los seis residuos de cisteína que caracterizan a EGF. Los dominios NT y DSL conforman el dominio de enlace con el motivo EGF de Notch (EBD), cuya función es interactuar con el receptor Notch e iniciar el proceso de señalización celular que conduce a la célula receptora estimulada a un destino celular determinado [214].

Las proteínas moduladoras de la unión receptor ligando a nivel extracelular son las proteínas “Fringe” en *Drosophila* y sus homólogos en mamíferos, “Lunatic Fringe, Radical Fringe, y Maniac Fringe” [215]. Además, se han identificado proteínas que modulan la degradación/ procesamiento de Notch a nivel intracelular.

En 1999, Qi y col. (1999) encontraron, además, una forma soluble de Delta en *Drosophila*, lo que sugiere que Notch puede mediar la comunicación entre células no contiguas [209;216].

11.2. Familia Notch

Los genes Notch codifican receptores de transmembrana de aproximadamente 300 kDa, que atraviesan una sola vez la membrana plasmática, su estructura está altamente conservada y tienen la función de servir como receptores de los ligandos (por ejemplo Delta). (Figura 14).

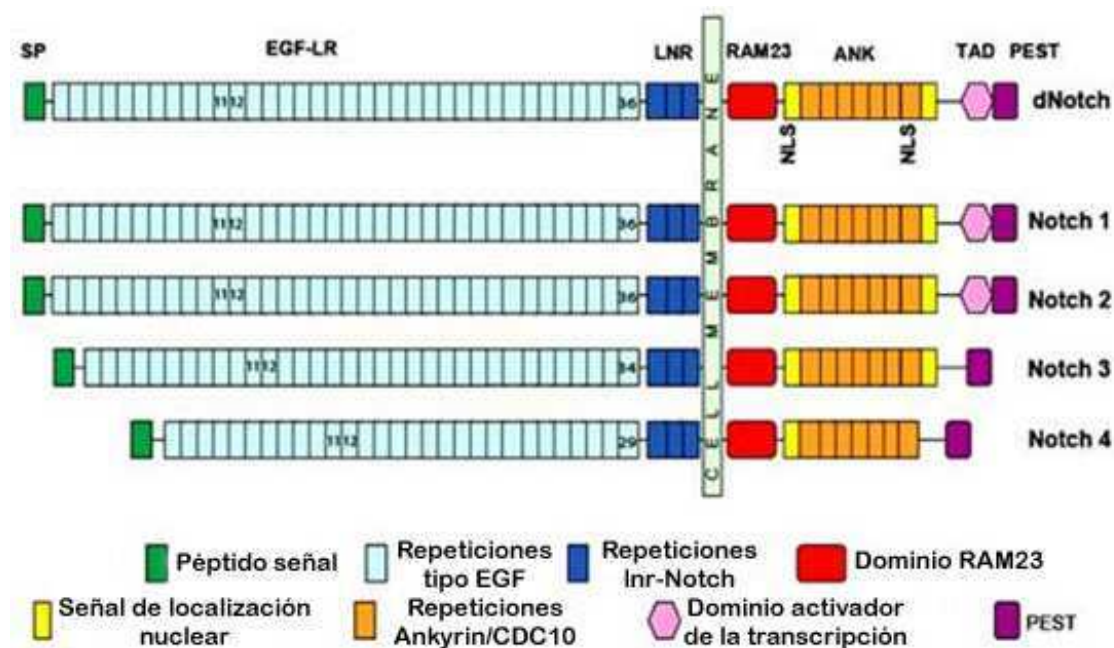


Figura 14 Estructura de los receptores Notch en drosophila y mamíferos. Las proteínas de Notch se expresan en la superficie celular como heterodímeros compuestos de un gran dominio extracelular no covalente al dominio intracelular. El dominio extracelular contiene repeticiones de dominios tipo EGF (EGFLR) y tres repeticiones LNR. El dominio intracelular contiene el dominio RAM23 y siete repeticiones Ankyrin/CDC10 (ANK), que son necesarias para la interacción proteína-proteína. Adaptación de Trojante 2007-2011.

Además, los receptores Notch 1-3 contienen dos señales de localización nuclear (NLS) en comparación con Notch4 que tiene solo una. En el núcleo el dominio de activación transcripcional (TAD) activa los eventos posteriores. Notch3 y Notch4 no contienen dominio TAD. Los cuatro receptores Notch contienen un C-terminal Pro Glu Ser Thr (PEST) es la secuencia de la degradación.

Los cuatro receptores Notch en mamíferos (Notch1-4) tienen estructuras muy similares entre sí, con diferencias esenciales en las porciones extracelular y citoplásmica. Los receptores Notch1 y 2 contienen 36 repeticiones “EGF-like” en sus dominios EC, mientras que Notch3 contiene 34 y Notch4 solamente 29. A nivel del dominio intracelular tienen las siguientes diferencias: Notch1 contiene un dominio de transactivación fuerte (TAD, por sus siglas en inglés), mientras que en Notch2 su TAD es débil y en Notch3 y 4 no está presente [217].

La región extracelular contiene de 10 a 36 elementos repetidos EGF. Los elementos repetidos EGF en posiciones 11 y 12 de Notch en *Drosophila* y mamíferos constituyen el núcleo primario de interacción con el ligando. Los otros elementos repetidos EGF se encargan de modificar la actividad de Notch, potenciando o inhibiendo la interacción con los ligandos, así como de estabilizar la estructura del receptor [218;219]. (Figura 14).

Adyacentes a estos elementos repetidos hay tres zonas CR conocidas como secuencias repetidas LNG (por estar conservadas en las proteínas LIN-12, Notch y GLP-1), esenciales para la estabilidad y la correcta conformación del dominio extracelular. Entre las secuencias repetidas LNG y el dominio transmembranal, existen dos residuos de cisteína importantes para el ensamble de la forma de estas proteínas. El dominio intracelular de todas las proteínas de la familia LIN-12/Notch está evolutivamente conservado. Cerca del dominio transmembranal y hacia el N-terminal de un residuo de valina ocurre el procesamiento proteolítico, el cual permite la liberación del dominio intracelular activo de Notch (NICD). Los seis elementos repetidos de anquirina se encuentran flanqueados por la región de interacción con factores transcripcionales (RAM), mediante la cual NICD interactúa con los factores activadores de la transcripción CBF1, Supresor de Hairless [Su(H)] y Lag-1 (grupo CSL), que le sirve de puente a NICD para interactuar con el ADN. Además, RAM y los elementos repetidos de anquirina de NICD regulan la expresión de proteínas que presentan una estructura común de hélice-lazo-hélice (proteínas bHLH), las cuales actúan como factores transcripcionales para la expresión de los genes cuyos productos dirigirán a la célula a un destino celular diferente al de la célula que emitió el estímulo [218;219].

Hacia la región C-terminal de los elementos repetidos de anquirina, se encuentra el dominio activador de la transcripción (TAD) (figura 14), cuya función es reclutar acetilasas de histonas para generar una conformación abierta de la cromatina en la doble cadena del ADN. Cerca de TAD se encuentra una región rica en prolina (P), glutamato (E), serina (S) y treonina (T) (PEST), que es esencial para la degradación, previa ubiquitinación, de NICD. Finalmente existen dos señales de localización nuclear (nls), una dentro del dominio RAM y la otra entre los elementos repetidos de anquirina y el dominio TAD, que le permiten a NICD entrar al núcleo de la célula[211;214].

Componente básico	C. elegans	D. melanogaster	Mamíferos
Ligando	LAG-2 APX-1 ARG-2 F16B12.2	Delta Serrate	Delta-like1 (DLL1) Delta-like2 (DLL2) Delta-like3 (DLL3) Jagged 1 (JAG1) Jagged 2 (JAG2)
Receptor	LIN-12 GLP-1	Notch	Notch1 Notch2 Notch3 Notch4
Factor de transcripción CSL	LAG-1	Suppressor of Hairless [Su(H)]	CBF1/RBPJ κ RBPL

Tabla 2: Nombres de los componentes básicos de la señalización de Notch (ligando, receptor y factor de transcripción) en las diferentes especies Adaptado de Lai y col. 2004 [220].

11.3. Clivajes proteolíticos de Notch

Los receptores de Notch se sintetizan inicialmente como un único precursor polipéptido en el retículo endoplásmico. La actividad biológica del receptor Notch depende del

procesamiento proteolítico y secuencial, catalizado por tres proteasas diferentes en sitios específicos. Sobre el sitio S1 actúa una convertasa, generando dos fragmentos de 120 y 180 kDa (dominios intra y extracelular, respectivamente) que permanecen unidos de forma no covalente; ambos fragmentos atraviesan la membrana plasmática y estructuran al receptor funcional [218]. La exposición del sitio S2 en Notch se produce después de su interacción con el ligando. En este sitio actúa algún miembro de la familia de metaloproteasas ADAM que cataliza la primera división en la membrana plasmática generando un fragmento intermedio de vida corta llamado NEXT (truncamiento extracelular de Notch), Estas enzimas actúan dependiendo del tipo celular y de cuanto tiempo necesite durar el estímulo. Finalmente, ocurre un proceso llamado proteólisis regulada intramembranalmente (RIP) en el sitio S3 catalizado por la γ -secretasa presenilina entre los aa glicina 1743 y valina 1744 [221;222], localizado dentro del dominio de transmembrana de Notch [170], y es esencial para la función de Notch [223]. El clivaje proteolítico del fragmento intermedio de Notch1, NEXT (Notch1-NEXT) por la γ -secretasa libera un fragmento intracelular activo de aproximadamente 100 kDa (NICD), que se transloca al núcleo y activa la transcripción de genes [224;225]. En ciertos casos puede ocurrir una regulación negativa por ubiquitinación y degradación de la presenilina, lo que evita que NICD sea liberado [219]. (Figura 15).

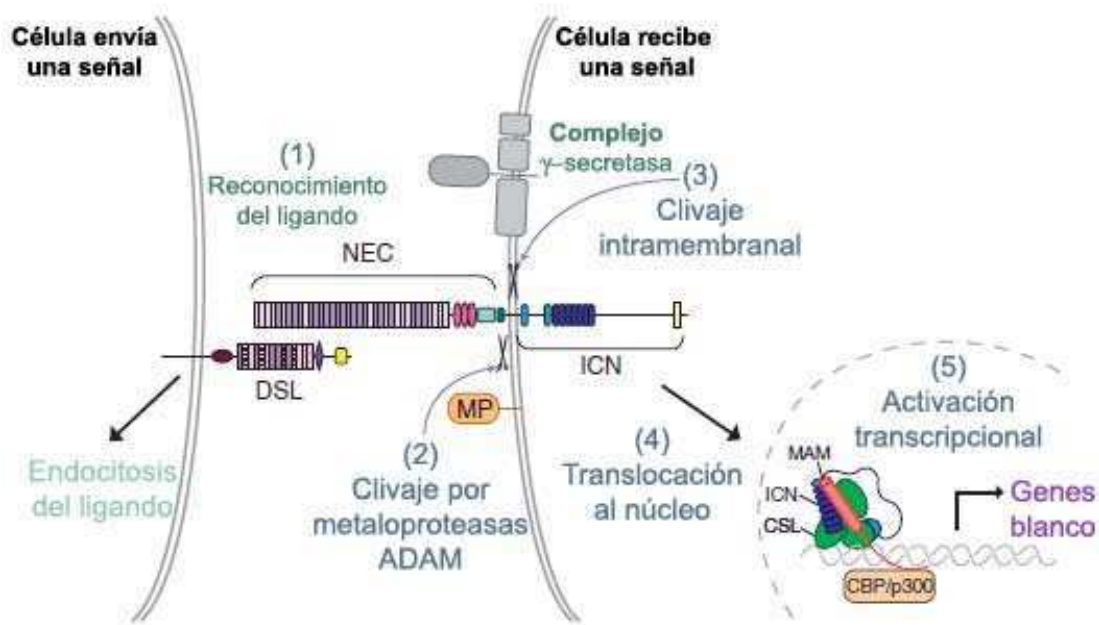


Figura 15: Vía de señalización de Notch modificado de Gordon y col. 2006 [226].

11.4 Complejo transcripcional de NICD

En ausencia de NICD, CSL [CBF1/Su (H) / Lag2] se encuentra unido al ADN y a las proteínas correpressoras que reclutan complejos histona deacetilasa (HDAC) para suprimir la transcripción. (Figura 16).

En presencia del NICD, este desplaza a los corepresores y forma un complejo ternario con CSL y proteínas “Mastermind like” (MAML), convirtiendo a las proteínas CSL de represores a activadores transcripcionales. Como consecuencia, la señalización canónica de Notch induce la expresión de “Hairy Enhancer of Split 1” (Hes1), HES5, Hes6 y Hes7 y proteínas HES-relacionadas al motivo YRPF 1 (Hey1), Hey2 y Heyl. [227-229].

CSL está caracterizado por tres dominios que se conservan de nematodos a mamíferos: el dominio N-terminal, el dominio β -trefoil y el dominio C-terminal. El N-terminal y β -trefoil son necesarios para la unión al ADN, y el β -trefoil también media la unión al dominio RAM del NICD. El dominio C-terminal se une al dominio de ANK del NICD y el dominio N-terminal de MAML, de modo que el dominio C-terminal de CSL es fundamental para la formación del complejo ternario [227].

En los ratones y humanos, hay un solo gen que codifica para CSL, y su inactivación impide la señalización canónica de Notch y causa letalidad durante la embriogénesis temprana, debido a anomalías vasculares [227].

Hay tres proteínas MAML en los mamíferos que comparten una estructura helicoidal compuesta de una región N-terminal necesaria para la unión de CSL y el NICD y una región C-terminal que interactúa con CBP/p300 y es necesaria para la actividad transcripcional. La duración del evento de la transcripción de Notch es limitado, y está regulado por MAML, que promueve la fosforilación del dominio PEST y la posterior degradación del NICD [227].

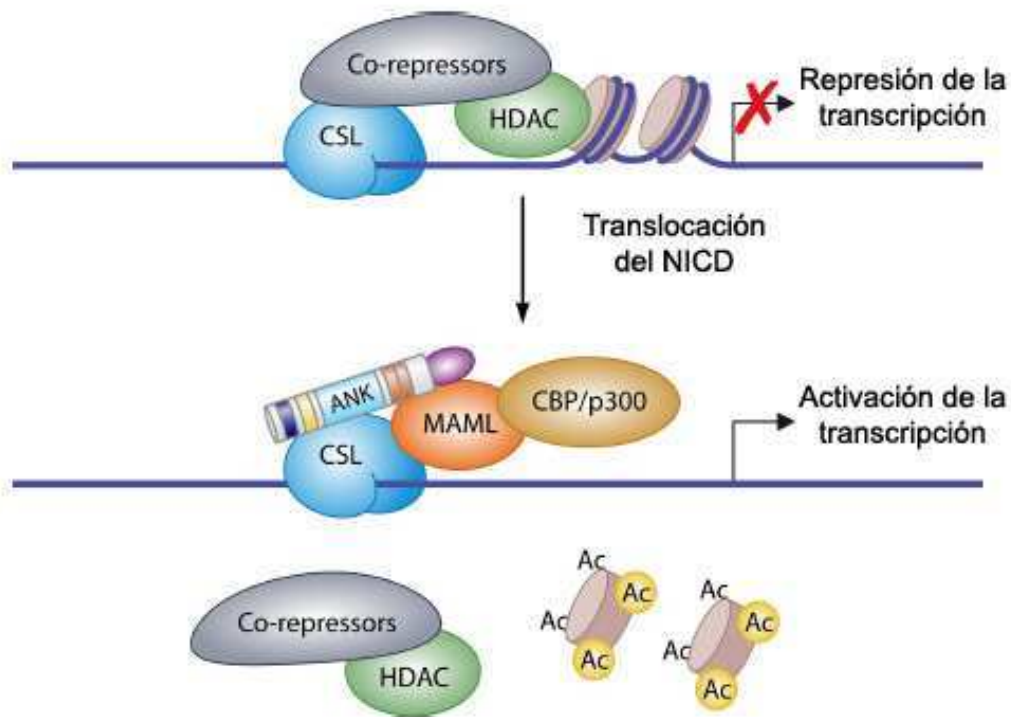


Figura 16: Esquematización de la transcripción mediada por NICD. Modificada de Zanotti y col. 2010 [227].

11.5. Implicancias de la vía de señalización de Notch

Los receptores Notch tienen funciones tanto redundantes como únicas. Notch1 y Notch2 comparten el mayor grado de similitud y son necesarios para la supervivencia, ya que la inactivación de Notch1 conduce a la muerte embrionaria temprana y un alelo hipomórfico de Notch2 causa letalidad perinatal, debido a defectos de los riñones. Notch3 tiene una organización estructural ligeramente diferente a Notch1 y Notch2, y se caracteriza por un dominio de transactivación menos activo. La expresión de Notch3 se limita a las células vasculares del músculo liso, el sistema nervioso central, y poblaciones celulares seleccionadas de timocitos y los osteoclastos. Debido a su limitada distribución, la eliminación de Notch3 en ratones no es letal, pero su activación constitutiva en el humano lleva a una patología llamada CADASIL del inglés “Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy”. Es una enfermedad vascular sistémica con afección de los pequeños vasos sanguíneos que se transmite de forma autosómica dominante ligada a una mutación del gen Notch3. Esta enfermedad

cerebrovascular hereditaria ocasiona declive cognitivo y demencia en quienes lo padecen. Mutaciones activas de Notch3 han sido identificadas en el ovario humano y los carcinomas de pulmón [227].

Notch4 interviene en la morfogénesis vascular embrionaria, pero es prescindible para el desarrollo ya que sus funciones se solapan con las de Notch1. La sobreexpresión de Notch4 dirigida a las células endoteliales provoca malformaciones arteriovenosas cerebrales en ratones [227].

Además, los miembros de la familia Notch, particularmente Notch1 y Notch4 han sido identificados como factores involucrados en la regulación de la angiogénesis del sistema vascular [230;231].

Los principales componentes de la vía Notch en el sistema vascular constan de tres ligandos (Dll4, Jagged1 y 2), tres receptores (Notch1, 3, y 4), y tres genes blanco (HERP1, 2 y 3). Aunque algunos de los componentes se detectan en las venas y líneas celulares derivadas de ellas, los principales los sitios de su expresión son las células endoteliales (ECs) y/o las células de músculo liso (SMC) de las arterias, lo que sugiere un papel central en la diferenciación arterial. De hecho, la vía de Notch es esencial para la diferenciación arteriovenosa en el pez cebra. Conjuntamente, la mayor parte de los estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la vía de Notch puede regular positiva y negativamente el desarrollo vascular en la angiogénesis, así como la diferenciación de las EC y SMC [232].

La distribución específica de los componentes de Notch en los tejidos no siempre es consistente con los fenotipos vasculares de los ratones deficientes de ellos. Por ejemplo, ratones deficientes de Notch4 no presentan ningún fenotipo vascular obvio a pesar de la fuerte expresión de Notch4 en las EC arteriales. Aunque la expresión de Dll1 y Notch2 no se ha detectado en los vasos, la disrupción dirigida de ellos en ratones causa hemorragia. Tampoco lo es la expresión de los componentes de Notch después de una lesión vascular, que coincide con su expresión en el sistema vascular intacto. Sin embargo, ratones deficientes de Hey2 no tienen anomalías vasculares evidentes. Esto indica que la participación de Notch en el desarrollo vascular es poco conocida y quedan muchos aspectos por estudiar [232].

En base a que Notch controla de manera crítica las decisiones del destino celular en numerosos tejidos y en distintos estadios de la diferenciación, es razonable pensar que cualquier desregulación de la función de esta vía pudiera estar involucrada con el desarrollo de cáncer. La señalización de Notch es conocida por estar desregulada en muchos carcinomas humanos, incluyendo leucemias, neuroblastomas, cáncer cervicouterino (CaCu), cáncer de mama, tumores mucoepidermoides, carcinomas renales, entre otros.

Sin embargo, las vías con las que interacciona Notch no son del todo conocidas. La inhibición de la vía de Notch con un inhibidor de la γ -secretasa redujo tanto la vía de Notch como la de rapamicina/AKT. La actividad antitumoral resultante del tratamiento con GSI se asoció con una disminución de la proliferación celular, medida por Ki67 y de la expresión del transportador de glucosa Glut1 en tumores de mama [233].

En cáncer, Notch interactúa con numerosas vías de señalización oncogénicas, como Akt, TGF- β y src. En cierto contexto, la interacción entre la vía Notch y otras vías oncogénicas es independiente de la activación canónica de HES y HEY [234].

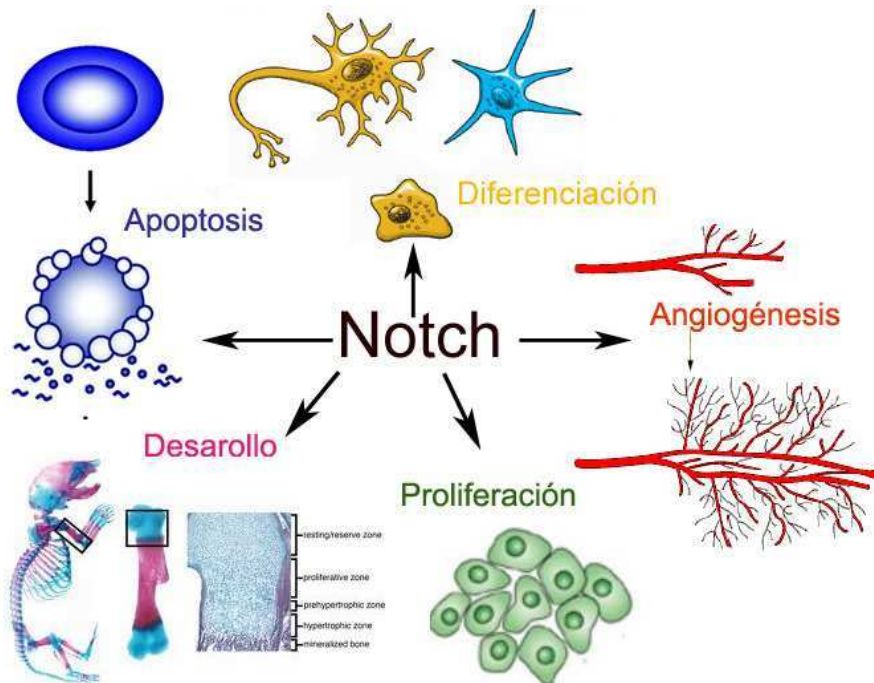


Figura 17: Mecanismos en los cuales se encuentra involucrada la vía de señalización de Notch.

Por lo tanto existen múltiples razones que justifican el diseño de fármacos que sean capaces de interrumpir la vía de señalización Notch que van desde anticuerpos que inhiben selectivamente ligandos específicos o los receptores Notch, a los compuestos de bajo peso molecular capaces de interrumpir la señalización de los cuatro receptores. Esta última clase de compuestos se basa en la inhibición del complejo proteico γ -secretasa, y son llamados inhibidores de γ -secretasa (GSI). Además de ser esencial para la señalización de Notch, la γ -secretasa facilita el clivaje catalítico de varias otras proteínas de membrana como el polipéptido amiloide (APP), erbB-4, CD44, y la E-cadherina [235].

La actividad metabólica y el suministro de nutrientes de la célula tumoral también puede estar afectada por el tratamiento con GSI al estar mTOR (“mammalian Target of Rapamycin”) y la proteína transportadora de glucosa (Glut1) corriente abajo de señalización Notch [235]. El primer GSI en ser desarrollado estaba destinado al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, ahora existe un mayor interés en los GSI para el tratamiento de neoplasias hematológicas y cáncer, ya que se ha demostrado su eficacia en varios modelos tumores [235].

V. Dror y col. (2007) determinaron que los componentes y los genes blanco de de la vía Notch se expresan en los islotes pancreáticos de ratones adultos y que el bloqueo del clivaje de Notch a nivel de la enzima γ -secretasa mediante el uso del inhibidor DAPT indujo apoptosis en las células de los islotes pancreáticos, mientras que el aumento de la activación de Notch se asocia con un efecto anti-apoptóticos [236].

En cuanto a la función de Notch en el útero, Afshar y col. (2011) demostraron que previo a la implantación, la activación de la vía de señalización de Notch es importante para inhibir la apoptosis de los fibroblastos del estroma uterino y regular la progresión del ciclo celular, que en su conjunto promueve la decidualización, modulando Notch1 múltiples mecanismos de señalización fundamentales en este proceso [237]

Johnson y col. (2001) examinaron las vías de expresión de los genes del receptor Notch y sus ligandos mediante inmunohistoquímica en ovarios de roedor. Estos datos indican que Notch2, Notch3 y JAG2 se expresan en las células de la granulosa de los folículos en desarrollo [238]. Años más tarde Trombly y col. (2009) demostraron que el bloqueo de la señalización Notch, mediante el tratamiento con un GSI llamado DAPT en cultivos de

ovarios de ratones recién nacidos da como resultado defectos de ensamble en los folículos primordiales, lo que indica que la señalización de Notch es esencial para la formación de estos folículos [239].

Para examinar la función de vía de señalización Notch en el desarrollo folicular, Zhang y col. (2011) cultivaron folículos primarios de ratón en presencia de inhibidores de la vía de Notch, L-658, 458 y DAPT, demostrando que los folículos tratados detienen por completo el desarrollo, presentando un distanciamiento de las células de la granulosa y degeneración ovocitaria, sugiriendo que la vía de señalización Notch es crítica también para el desarrollo del folículo ovárico [240].

Sin embargo la expresión y regulación de los ligandos y receptores de Notch en la función del CL es desconocida.

Hipótesis y objetivos

Capítulo I

Hipótesis

La hipótesis planteada en esta tesis es que el agente antiapoptótico Esfingosina 1-fosfato (S1P) bloquea la luteólisis inducida por $PGF2\alpha$ en la rata. Proponemos que esta inhibición de la luteólisis está dada por la prevención de la apoptosis involucrada en el proceso de regresión luteal. Este esfingolípido actuaría bloqueando la activación de proteínas apoptóticas y a la vez, activando vías de transducción de señales cruciales para la supervivencia celular.

Objetivo General:

El objetivo general fue estudiar el efecto local de la administración de S1P sobre la luteólisis inducida por $PGF2\alpha$ en el CL de preñez de la rata.

Objetivos específicos:

Los objetivos específicos del primer capítulo fueron los siguientes:

1. Estudiar el efecto *in vivo* de la administración intraovárica del esfingolípido S1P previo a la administración de una dosis luteolítica de la $PGF2\alpha$ en ratas preñadas sobre:
 - a) El número de células apoptóticas
 - b) La ultra estructura del CL
 - c) La densidad vascular
 - d) La expresión de las proteínas relacionadas con la apoptosis
2. Evaluar si la administración local de S1P previo a la administración de una dosis luteolítica de $PGF2\alpha$ restaura la funcionalidad del CL de preñez midiendo como parámetro la P4 luteal.
3. Estudiar los cambios en las vías de transducción de señales luego de la administración local de S1P mediante la medición de:
 - a) La fosforilación de AKT

- b) La fosforilación de ERK
- c) Los niveles de TNF- α

Capítulo II

Hipótesis

La hipótesis planteada en esta segunda parte de esta tesis es que la vía de señalización de Notch regula la funcionalidad del CL de preñez. Proponemos que el ligando Dll4 y los receptores Notch1 y 4 están involucrados en la regulación de este proceso.

Estas proteínas actuarían permitiendo el normal funcionamiento del CL de preñez, promoviendo la viabilidad celular y la síntesis de P4. Además P4 podría estar regulando la expresión de los mismos.

Objetivo General

El objetivo general que nos planteamos fue examinar la expresión del ligando Dll4 y de los receptores Notch1 y 4 en CL de ratas preñadas durante diferentes estadios de la preñez, posparto y luego de la luteólisis inducida por $\text{PGF2}\alpha$; y determinar si la vía de señalización de Notch influencia la función y supervivencia de las células luteales.

Objetivos específicos

Los objetivos específicos del segundo capítulo fueron los siguientes:

1. Estudiar la localización del ligando Dll4 y los receptores Notch1 y Notch4 en el CL de preñez y los niveles del ARNm y proteicos en distintos días de la gestación.
2. Estudiar el efecto in vivo de la administración de $\text{PGF2}\alpha$ a ratas preñadas sobre:
 - a) La expresión de ARNm del ligando Dll4 y los receptores Notch1 y Notch4
 - b) Los niveles proteicos del ligando Dll4 y los receptores Notch1 y Notch4
3. Evaluar el efecto de la administración localizada de un inhibidor de esta vía (DAPT) en ratas preñadas sobre:
 - a) Los niveles luteales de los receptores Notch1 y Notch4
 - b) La esteroidogénesis luteal

- c) La fragmentación del ADN
 - d) La expresión de proteínas pro y anti-apoptóticas
4. Estudiar si los cambios que observamos en la expresión de los miembros de la familia Notch luego de la administración de $\text{PGF2}\alpha$, están mediados por la disminución de la P4 a nivel luteal. Para ello decidimos evaluar el efecto *in vitro* del bloqueo de la síntesis de P4 y de la vía de Notch sobre:
- a) La esteroidogénesis luteal
 - b) La expresión proteica de los miembros de la familia Notch
 - c) La fosforilación de AKT
 - d) La fosforilación de ERK

Materiales y Métodos

1. Animales

Se utilizaron ratas adultas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Sprague Dawley de aproximadamente 2 meses de edad en condiciones de bioterio (22°C de temperatura y con fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, agua y alimento *ad libitum*). 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.

El ciclo estral fue seguido diariamente mediante extendidos vaginales, examinando cuidadosamente el tipo celular predominante en cada estadio. Sólo las ratas con 2 o más ciclos estrales consecutivos fueron utilizadas en cada experimento. Las ratas identificadas en estadio de proestro fueron puestas junto a un macho adulto esa misma noche. El día 1 de la gestación fue determinado por la presencia de espermatozoides en el extendido vaginal. Se utilizaron ratas a distintos tiempos de gestación y posparto a las cuales se les retiró las crías inmediatamente después del nacimiento.

1.1. Tratamientos de los animales Capítulo I

Experimentos con ratas tratadas con S1P o su solución vehículo

Se anestesiaron ratas en el día 19 de la gestación con una mezcla de ketamina (ketamina 50 Holliday Scott S.A. 70-90 mg/Kg) y xilacina (Rompun 2% Bayer 5mg/Kg) vía intraperitoneal (ip). Se realizó una incisión por la región ventral sobre la línea alba, se exteriorizaron los ovarios, y se inyectaron 10µl de una solución que contenía 10µg de S1P (Sigma-Aldrich) o su solución vehículo (PET: 5% PEG, 2,5% ETOH, 0,8%TWEEN). El día 19 de preñez fue seleccionado para el tratamiento con PGF2 α , porque es cuando el CL es más sensible a la acción de la PGF2 α [241].

Dos horas después se les administró a ambos grupos una dosis luteolítica de PGF2 α (Lutalyse Pfizer 400 µg/rata) vía ip y se sacrificaron por aspiración de CO₂ a las 4 y 36 horas.

Los animales se dividieron en tres grupos:

Grupo control (C0h): ratas sin tratamiento a los 19 días de preñez.

Grupo PGF2 α (PG4h y PG36h): ratas que recibieron la solución vehículo (PET) más PGF2 α y fueron sacrificadas 4 y 36 horas post inyección.

Grupo PGF2 α + S1P (PG+S4h y PG+S36h): las que fueron inyectadas con S1P más PGF2 α y fueron sacrificadas 4 y 36 horas post inyección.

1.2. Tratamientos de los animales Capítulo II

Experimentos con ratas preñadas

Se sacrificaron ratas preñadas mediante aspiración de CO₂ a distintos tiempos de la gestación. Se extrajeron los ovarios, se limpiaron y se aislaron los CLs para su posterior utilización.

Experimentos con ratas tratadas con PGF2 α o su solución vehículo

A un grupo de ratas se le administró PGF2 α (400 μ g/rata Lutalyse Pfizer) (grupo PGF2 α) o solución fisiológica (grupo Control) en el día 19 de preñez vía ip. Los animales fueron sacrificados y los ovarios colectados a las 4 y 24 horas post inyección de PGF2 α .

Experimentos con ratas tratadas con DAPT o su solución vehículo

Se utilizaron ratas preñadas en el inicio de la regresión luteal (día 19 de preñez). La intervención quirúrgica de los animales se realizó de la misma forma que la descrita para los experimentos con S1P del capítulo I. Los animales tratados se inyectaron localmente con un inhibidor de la enzima γ -secretasa, DAPT (N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester Sigma-Aldrich) disuelto en DMSO (10 μ g/ovario), a este grupo lo llamaremos DAPT y al inyectado con 10 μ l de la solución vehículo (6% de DMSO) lo llamaremos grupo Control. Los animales se sacrificaron por decapitación a las 24 horas de la inyección para obtener la sangre y los ovarios.

2. Aislamiento de los CLs

Los ovarios de las ratas fueron removidos del cuerpo del animal, liberados de la bursa ovárica y del tejido adiposo circundante para facilitar la visualización de los CLs y proceder al aislamiento de los mismos bajo lupa con agujas finas.

Luego de ser aislados los CLs fueron colocados en criotubos, congelados en nitrógeno líquido y guardados a -80 para su posterior utilización.

3. Metodología utilizada en el capítulo I

3.1. Microscopía electrónica

Los CLs aislados fueron fijados en glutaraldehído. Luego de varios lavados, las muestras fueron post fijadas con tetróxido de osmio al 1,5% durante 90 min, lavadas y deshidratadas con etanol al 50%. Luego fueron teñidas con acetato de uranyl al 70% en etanol. Las muestras fueron nuevamente deshidratadas con etanol en gradación creciente e infiltradas con oxido de propileno y embebidas en resina epoxy (Dorcupan). Secciones ultra finas (700 nm) fueron cortadas de cada taco usando un ultramicrotomo y fueron colocadas en grillas y teñidas con la solución de Reynols para su posterior visualización. Se fotografiaron distintos campos representativos de cada tratamiento.

3.2. Técnica de Tunel

Para realizar la cuantificación bioquímica de la apoptosis, se procesaron secciones de tejido fijados en formalina para localización *in situ* de núcleos que exhiben fragmentación apoptótica del ADN, mediante la técnica de TUNEL. Se usó el sistema DeadEnd Colorimetric TUNEL (G7130, Promega, Madison, WI). La parafina de cada corte fue removida mediante inmersión en xileno, seguido por etanol 100%. Los cortes fueron rehidratados en una serie de alcoholes en gradación decreciente (100%, 95%, 85%, 70% y 50%) durante 3 min cada uno. Se lavaron con NaCl al 0,85% y PBS. Se fijaron los cortes mediante inmersión en paraformaldehído al 4% en PBS seguido por dos lavados y permeabilización con proteinasa K (20µg/ml) a temperatura ambiente durante 20 min. Se repitió la fijación y se procedió a equilibrar los cortes con el buffer correspondiente durante 10 min. Se le agregó a cada corte la mezcla de reacción que contiene la enzima y los rTdT (desoxinucleotidil transferasa terminal recombinante). Se incubó a 37°C durante 60 min, la reacción fue detenida por inmersión de los cortes en la solución SSC. Luego de este paso se procedió al lavado, bloqueo de la peroxidasa endógena y la incubación con la solución de streptoavidina peroxidasa durante 30 min. En seguida se tiñeron los cortes con DAB, y se les dio contraste con hematoxilina para luego ser montados con bálsamo de canada y visualizados al microscopio óptico.

El conteo se realizó utilizando el objetivo 100x del microscopio. Se analizaron 3 campos al azar de cada sección de CL (3 CLs por sección/ ovario) 3-4 ovarios por grupo. Los resultados fueron expresados como % de células positivas.

3.3. Extracción de proteínas luteales

Se extrajeron proteínas de los CL en buffer de lisis, (Tris-HCl 20 mM pH=8), NaCl 137 mM, NP-40 1%, y glicerol 10%) suplementado con inhibidor de proteasas (PMSF 0,5 mM, ZPCK 0,025 mM, TLCK 0,025 mM; TPCK 0,025 mM) e inhibidores de fosfatasa (Ortovanadato de sodio 0,2 mM; fluoruro de sodio 25 mM; β -glicerofosfato 10 mM) homogeneizado con un homogenizador Ultra-Turrax (IKA Werk, Breisgau, Germany). Luego de una centrifugación a 14000 rpm durante 10 min a 4°C se obtuvo el sobrenadante. La concentración de proteínas se midió por ensayo de Bradford [242].

3.4. Actividad de Caspasas

Para medir la actividad de caspasas se utilizó un kit fluorométrico que contenía sustratos específicos para cada una de las 4 caspasas inmovilizados en pocillos separados. Se agregaron 20 (caspasas-2 y -3) y 40 (caspasas-8 y -9) μ g de proteína totales extraídas y se incubaron durante 2 horas a 37°C. La actividad fue determinada mediante la detección de fluorescencia (Ex: 380nm, Em: 460). 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.

3.5. Enzimoimmunoanálisis (ELISA)

Se midieron mediante esta técnica los niveles de AKT fosforilado y de TNF- α en los distintos grupos.

Se utilizó un Kit de ELISA para detectar y cuantificar los niveles de AKT fosforilado en la serina 473 (CBA005 Calbiochem) según las instrucciones del fabricante.

Se utilizaron 30 μ g de proteínas extraídas de un pool de CLs de cada rata en cada pocillo de la placa que contenía inmovilizado el anticuerpo monoclonal para AKT fosforilado (pAKT). Luego de 2 horas de incubación se procedió al lavado y al reconocimiento con un anticuerpo secundario anti pAKT. Luego de 1 hora de incubación se lavó y se agregó anti

conejo IgG marcada con peroxidasa y se incubó durante 30 min. Inmediatamente de después enjuagar, se agregó el cromógeno estabilizado y se incubó a oscuridad por 30 min. La reacción fue detenida agregando la solución de detenimiento. Los niveles de pAKT fueron determinados midiendo la absorbancia a 450nm contra una curva standard. Cada muestra fue testada en duplicado.

Se midieron las concentraciones de TNF- α en los CL de los distintos grupos (C0h, PG4h y PG+S4h) mediante un kit de ELISA (RTA00, R & D Systems). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se agregaron 120 μ g de las proteínas extraídas del pool de CLs de cada rata a cada pocillo de la placa que contenía inmovilizado el anticuerpo monoclonal para TNF- α y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente.

Después de un lavado, se añadió a la placa un anticuerpo policlonal específico anti TNF- α de rata y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Inmediatamente de lavar, se añadió la solución sustrato y la placa se incubó en la oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente, la reacción terminó por la adición de una solución de detenimiento. Los niveles de esta proteína se determinaron midiendo la absorbancia a 450 nm, contra una curva estándar. Cada muestra fue testada por duplicado.

3.6. Extracción de esteroides y radioinmunoensayo de P4 en tejido luteal (RIA)

El contenido de P4 luteal fue medido en cada grupo. Los CLs aislados de cada rata (4-5 por animal) fueron homogeneizados en acetona. Alícuotas de cada muestra fueron tomadas para medir la concentración proteica. Luego de la homogenización, las muestras fueron centrifugadas (1600g por 10 min) y el sobrenadante resultante trasvasado a tubos cónicos y evaporados a sequedad. De esta resuspensión se realizaron dos extracciones con éter dietílico (1:2,5 vol/vol) mediante agitación de cada muestra durante dos min luego del agregado de éter. Mediante congelamiento durante 20 min a -70 °C fueron separadas las fracciones etéreas, las que fueron trasvasadas, evaporadas y resuspendidas en 1,4 ml de metanol, al que se le agregó 1,4 ml de agua destilada. Se realizó una nueva partición con n-hexano para lo cual se homogeneizó durante 2 min y se descartó la fase superior. Finalmente se agregó a la fase inferior 2 ml de diclorometano y luego de su homogeneización se descartó la fase superior acuosa y se dejó evaporar la inferior. Los

residuos de esteroides se resuspendieron en buffer RIA y fueron conservados a -20 °C hasta realizar la medición de P4.

Para la medición se utilizó un anticuerpo provisto por el laboratorio del Dr. Niswender (Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, Fort Collins, CO) en una dilución que unió el 37% del ³H-esteroide utilizado como trazador (25 pg, aproximadamente 10.000 cpm). Luego de la incubación de 16 horas a 4 °C, la hormona libre fue separada de la unida al anticuerpo por medio del agregado de 0,2 ml de una solución de carbón 0,5% en el buffer de ensayo (Buffer RIA: 40 mM Na₂HPO₄; 39,5 mM NaH₂PO₄; 155 mM NaCl; 0,1% azida sódica; 1% gelatina; pH= 7,0) y posterior centrifugación. Los sobrenadantes completos fueron transferidos a viales de conteo a los que se les agregó 2 ml de solución centellante. La radiactividad se determinó en un contador de centelleo líquido Beckman LS 1801, con una eficiencia del 62%.

3.7. Inmunohistoquímica

Los ovarios de los diferentes grupos fueron fijados en formalina al 10% durante una semana. Las muestras fueron deshidratadas en alcoholes a concentraciones decrecientes (50%, 70% y 100%) y luego fueron embebidas en parafina. Cortes de 4µm fueron desparafinados e hidratados en etanol a concentraciones decrecientes. La peroxidasa endógena fue bloqueada con H₂O₂ al 3% en PBS durante 30 min. Los cortes fueron incubados en tritón al 0,1% y proteinasa K (20 mg/ml) durante 30 min y bloqueados con seroalbúmina bovina (BSA) al 2%.

Los cortes fueron incubados con el anticuerpo primario anti PECAM-1 (molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria-1 también conocida como CD31 que marca las células endoteliales de los vasos sanguíneos), diluido en PBS (1/100). La unión del anticuerpo primario fue detectado usando un anticuerpo biotinilado anti ratón (1/400) durante 30 min a temperatura ambiente y luego durante 1 hora con el complejo ABC: avidina-peroxidasa biotinilada (Vectastain ABC system, Vector Laboratories, Burlingame, CA). La marca se visualizó con diaminobencidina DAB y se tiñeron con hematoxilina para dar contraste.

3.8. Western Blot

Para la determinación de los niveles proteicos analizados en esta primera parte, se sembraron 40µg de proteína por calle en geles de SDS-poliacrilamida. Las muestras proteicas fueron previamente hervidas durante 5 min en buffer de carga (6% de SDS, 15% de b-mercaptoetanol, 60% de glicerol, 0,006% de azul de bromofenol, 0,18M Tris-base, pH=6,8). Las proteínas fueron separadas por electroforesis a 25 mA durante 1,5 horas y luego fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa durante 2 horas a 80 V en buffer Tris-base 0,025 M (pH=8,3), glicina 0,192 M y 20% de metanol. Los sitios de unión remanentes sobre las membranas fueron bloqueados con una solución de TBS y detergente Tween (TBS-T 0,05%) y leche descremada al 5% durante toda la noche a 4°C. Luego las membranas fueron incubadas con los correspondientes anticuerpos en distintas concentraciones (pAKT 1:400, AKT 1:5000, pERK 1:400, ERK 1:2000 y GAPDH 1:10000). Las membranas fueron incubadas con sus correspondientes anticuerpos secundarios acoplados a la enzima peroxidasa (IgG anti conejo acoplado a peroxidasa 1:1000 o IgG anti ratón acoplado a peroxidasa 1:1000 diluídos en TBS-T 0,1%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente fueron incubadas con el reactivo de quimioluminiscencia durante 1 min.

El contenido proteico se analizó en las distintas muestras mediante densitometría de las bandas obtenidas para la proteína de interés con el Software Scion Image. La densidad de cada banda fue normalizada respecto a la densidad obtenida para GAPDH en la misma muestra.

3.9. Análisis estadístico de los datos

Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces y se utilizaron 4 animales en cada grupo. Para el análisis estadístico de los datos se usó el test de Anova para comparar los distintos grupos de tratamiento, seguido por el método de Student–Newman–Keuls usando el software Prism 4.0. Las diferencias fueron consideradas como significativas con un $p < 0,05$. Los datos expresados como porcentaje fueron analizados usando el test de ANOVA para comparar entre los distintos tratamientos seguido por el método de Dunn's Multiple Comparison.

4. Metodología utilizada en el capítulo II

4.1. Inmunohistoquímica

Los ovarios de ambos grupos fueron extraídos, liberados de tejido adiposo y lavados con solución fisiológica. Se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 12 horas y se incluyeron en parafina. Se hicieron cortes de cada taco de 4µm de espesor y se montaron en portaobjetos.

Las secciones de tejido fueron desparafinadas con xileno y posteriormente rehidratadas mediante lavados en alcoholes con graduación decreciente (100%-75%) durante 5 min cada uno. Se bloqueó la peroxidasa endógena con 3% H₂O₂ en PBS durante 30 min. La unión no específica a otros epítopes fue bloqueada incubando las secciones con BSA al 2% durante 30 min. Luego las secciones se incubaron con los anticuerpos primarios anti NOTCH1, NOTCH4 Y DLL4 (1/100) durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, luego de sucesivos lavados con PBS, las secciones fueron incubadas con el anticuerpo secundario biotinilados anti conejo (1:400) durante una hora a temperatura ambiente y luego con el complejo ABC: avidina-peroxidasa biotinilada (Vectastain ABC system, Vector Laboratories, Burlingame, CA). La marca se visualizó con DAB y la reacción fue detenida con agua destilada, las secciones fueron teñidas con hematoxilina durante 1 min y luego deshidratadas por lavados con alcoholes en graduaciones crecientes. Los cortes fueron montados con bálsamo de Canadá y observados al microscopio óptico. Los controles negativos fueron realizados en ausencia del anticuerpo primario.

4.2. Extracción de ARN

Se extrajo el total del ARN del pool de CLs de cada rata usando TRIzol. Los CLs fueron homogenizados en 1 ml de TRIzol e incubados a temperatura ambiente durante 5 min para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Las muestras fueron trasvasadas a otro tubo y se agregó 200 µl de cloroformo (para separar las proteínas del ARN). Luego de una incubación de 3 min los tubos se centrifugaron a 12000g durante 15 min a 4°C. Inmediatamente se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se agregó 500µl de alcohol isopropilo (para precipitar el ARN) y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Luego se centrifugó durante 10 min a 12000g. Se aspiró el sobrenadante y se lavó el ARN presente en el tubo con 1 ml de etanol al 75%. El pellet se secó al aire y una

vez evaporado el etanol se disolvió en agua libre de ARNasas. La integridad de cada muestra fue determinada (figura 18 y 19) y la absorbancia medida a 260nm. Para calcular la cantidad de ARN presente en cada muestra se utilizó un nano drop.

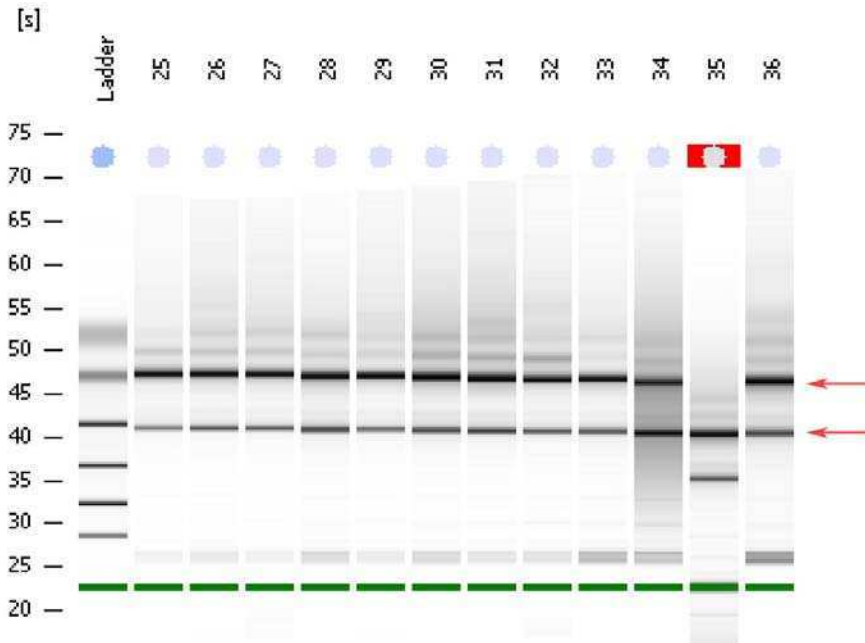


Figura 18: La integridad del ARN fue evaluada mediante una corrida electroforética en gel de agarosa, donde se pueden apreciar las subunidades ribosomales 18s y 28s (marcadas con flechas rojas).

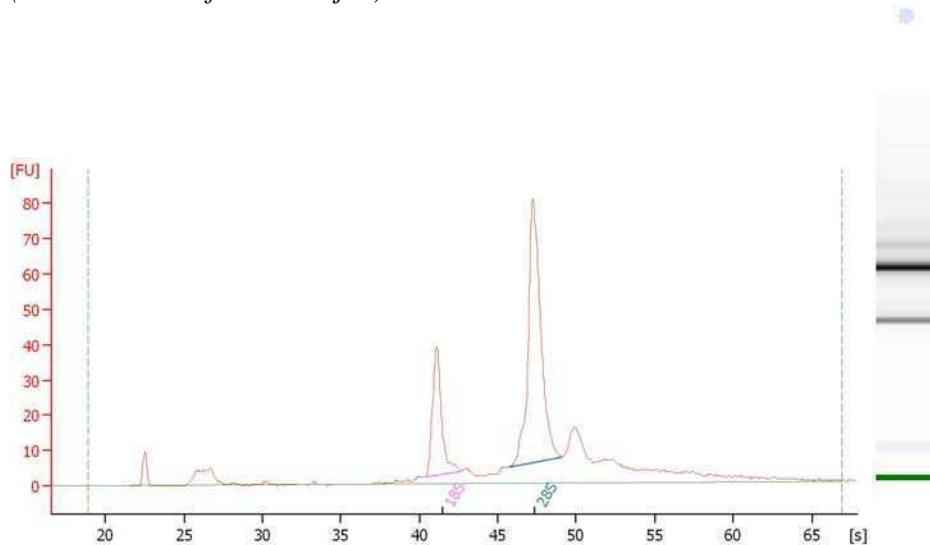


Figura 19: Ejemplo del análisis densitométrico realizado en las muestras para su posterior utilización en el ensayo de RT-PCR en tiempo real.

4.3. Transcripción reversa

Se realizó esta técnica siguiendo las instrucciones del fabricante. Todos los reactivos utilizados fueron comprados a Invitrogen.

Las muestras fueron tratadas con ADNasa para eliminar restos de ADN. Se incubó 1 µg de ARN con 1µl de ADNasa I (1 U/µl) durante 15 min a temperatura ambiente. Inmediatamente se agregó EDTA 25mM para parar la reacción y se incubó a 65°C durante 10 min. Luego de esto se procedió a la transcripción reversa: las muestras se centrifugaron y se les agregó los primers hexámeros, dNTPs, se incubaron a 70°C durante 10 min. Se agregó a cada muestra la mezcla conteniendo buffer 5X, DTT 0,1M y ARNasa Out y se incubó a 37°C durante 2 min. Rápidamente se agregó 1 µl de la enzima M-MLV (200 U/µl) y se incubó a 37 °C por 50 min. Seguido de la inactivación a 70°C durante 15 min. Las muestras se diluyeron en agua En un volumen de reacción de 20µl usando Molony Murine Leucemia Virus reverse transcriptase (M-MLV RT) durante 50min a 37°C.

Esta técnica es la utilizada de rutina en el laboratorio del Dr. Stouffer (ONPCR OHSU) y empleada en varios trabajos científicos [136;243].

4.3. PCR en tiempo real

Para la PCR en tiempo real se usaron reactivos Taqman®. Los cebadores (“primers”) y las sondas para Notch1, Notch4 y Dll4 fueron pre desarrollados y comprados a Applied Biosystems. Como control interno se usó el ARNm de 18s en cada pocillo.

Las amplificaciones se realizaron en un volumen final de 10 µl conteniendo: 2 µg de ARN, sonda de Notch1, notch4 o Dll4 (marcada con FAM), sonda de 18S (marcada con VIC), primers y la Taqman Universal PCR Master Mix. La PCR se corrió en un termociclador 7500 Fast Real Time PCR System, en una placa p96 sellada. Durante los distintos ciclos, las amplificaciones fueron monitoreadas y cuantificadas analizando los cambios en las emisiones fluorescentes de cada pocillo.

Junto con las muestras se corrió una curva standard con un pool de ADNc con 5 diluciones seriadas (1:10) [243].

4.4. Western Blot

Se realizó esta técnica de forma similar a la descrita en el capítulo I 3.7.

Las membranas fueron incubadas durante toda la noche con el correspondiente anticuerpo primario: anti DLL4 (1:500; Abcam), anti NOTCH1 (1:200; Cell Signaling Technology), BCL2 (1:400; Dako), AKT (1:5000 Cell Signaling Technology), NOTCH4 (1:500), BAX (1:200), CASP 3 (1:200) HES1 (1:400), pERK (1:400), ERK (1:2000) pAKT (1:400) todos comprados a Santa Cruz Biotechnology.

El anticuerpo anti NOTCH1 que utilizamos es un anticuerpo policlonal hecho en conejo que detecta los niveles endógenos de dominio citosólico de NOTCH1 (NICD) sólo cuando es clivado entre los aminoácidos Glicina 1743 y Valina 1744. El anticuerpo no reconoce el receptor entero o clivado en otras posiciones.

El anticuerpo anti NOTCH4 utilizado es un anticuerpo policlonal hecho en conejo contra los aminoácidos 1779-2003 que reconoce un fragmento de alrededor de 40kDa correspondiente a la forma clivada del receptor.

4.5. Extracción de esteroides y RIA de P4 de suero

Inmediatamente después de la extracción de la sangre se colocó en tubo en baño termostático a 37°C hasta la formación del coágulo sanguíneo. El suero extraído se centrifugó a 1500 rpm durante 15 min y se trasvasó el sobrenadante. A 200 µl de suero se le agregó éter, se agitó durante 30 segundos y se colocó en frío durante media hora (-70). Se extrajo el sobrenadante (extracto etéreo) y se trasvasó a un nuevo tubo. Al suero congelado se le agregó éter y se repitió la operación anterior. Se juntaron ambas extracciones y se dejó secar hasta la evaporación total del éter. Los esteroides fueron resuspendidos en buffer RIA hasta su medición.

Los niveles de P4 se midieron por RIA en el suero de ambos grupos usando un anticuerpo específico suministrado por el Dr. GD. Niswender tal como se describió anteriormente.

4.6. Extracción de ADN de CLs y análisis de fragmentación de ADN

Se extrajo el ADN de los CLs aislados de los grupos Control y DAPT partiendo de un pool de CLs de cada animal (4-5 CLs/rata).

Los CLs fueron homogeneizados en buffer conteniendo 100 mM de NaCl, 4 mM de EDTA, 50 mM de Tris-HCl, 0,5% de SDS (pH=8) con proteinasa K (100 µg/ml) a 55 °C durante 7 horas para facilitar la ruptura de los mismos.

Luego de la incubación, las muestras fueron enfriadas en hielo por 30 min con el agregado de 1M de acetato de potasio y 50% de cloroformo para iniciar la precipitación de las proteínas y luego fueron centrifugadas a 9000 X g por 8 min a 4 °C. El sobrenadante fue precipitado luego en 2,5 volúmenes de etanol a -70 °C por 30 min, centrifugado a 5000 g a 4 °C, extraído con etanol al 70% y resuspendido en agua. Las muestras fueron luego incubadas por 1 hora con RNAasa (10 µg/ml) a 37 °C y luego el ADN fue cuantificado mediante la medición de la absorbancia a 260 nm.

4.7. Electroforesis en geles de agarosa y cuantificación de la fragmentación del ADN

Las muestras de ADN (8 µg por muestra) fueron separadas electroforéticamente en un gel de agarosa al 1,7% en buffer tris-borato-EDTA (TBE) con el agregado de BrEt (0,4 µg/ml). En cada gel de agarosa se sembraron iguales cantidades de ADN en cada pocillo.

El ADN fue visualizado utilizando un transiluminador ultravioleta (302 nm) y fotografiado con una cámara Polaroid. El análisis densitométrico del ADN de bajo peso molecular (<15 kilobases) fue realizado luego de escanear las fotografías por medio del programa de análisis Scion Image.

4.8. Cultivo de CL

Se aislaron los CLs de ratas en el día 16 de la gestación como se describió anteriormente. Este día fue seleccionado debido a que la producción de P4 por el CL de la rata aumenta los primeros 16 días y luego decae a niveles bajos hacia fin de la preñez (día 20-22) seguido de la luteólisis estructural luego del parto.

Los CLs se cultivaron en placa de 48 pocillos (2 CLs/ pocillo) con medio DMEM alta glucosa (GIBCO), HEPES 25mM, BSA 0,5%, antibiótico-antimicótico 2% a 37°C 95% O₂ en un volumen final de 333 µl.

4.8.1. Inhibición de la síntesis de esteroides *in vitro*

Se utilizó aminoglutetimida (AG, Sigma-Aldrich), inhibidor específico de la enzima P450_{scc}, disuelto en DMSO en una concentración de 0,15mM. Para asegurarnos de la total depleción de esteroides, los CLs fueron incubados previamente durante 30 min con el inhibidor, lavados dos veces con medio solo para remover la P4 producida. Se agregó nuevamente el inhibidor y la incubación continuó durante un período de 4 horas. Los CLs

fueron inmediatamente congelados para la extracción de proteínas y el medio colectado para medir P4 por RIA.

La concentración de AG utilizada en este trabajo fue similar a la utilizada en trabajos previos con células de la granulosa humanas y células luteales bovinas. Dicha concentración mostró no provocar muerte celular aguda [172].

4.8.2. Inhibición de la vía de señalización de Notch *in vitro*

Se utilizó el inhibidor de la enzima γ -secretasa, DAPT, en una concentración de 20 μ M, disuelto en DMSO. Del mismo modo que con AG, los CLs fueron incubados previamente durante 30 min y luego de 2 lavados con medio solo, se incubaron durante 4 horas. Además se utilizaron ambos inhibidores juntos para estudiar el posible efecto sinérgico entre ambos.

La concentración final de DMSO no excedió en ningún caso el 0,05%. El control se incubó solamente con DMSO.

4.8.3. Medición de P4 de medios condicionados

Los niveles de P4 de los medios condicionados fueron medidos partiendo de una dilución del medio de cultivo en buffer RIA (1/10) y tomando 10 μ l de esa dilución. La medición se realizó como se describió anteriormente para P4 de tejido y de suero.

4.8.4. Análisis estadístico de los datos

Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces y se utilizaron 5-6 animales en cada uno de ellos. Los resultados se expresaron utilizando la media \pm error estándar de la media (ESM) de los valores obtenidos en el total de experimentos realizados.

Para los experimentos *in vivo*, cada rata fue considerada como un dato. En los experimentos con ratas preñadas en distintos días de la gestación y posparto, se utilizó para comparar los resultados obtenidos el test de ANOVA de una vía. Los experimentos con ratas preñadas tratadas con PGF2 α y su vehículo, DAPT y su vehículo fueron analizados usando el test no pareado de Student, seguido por el test de Tukey o Newman-Keuls. Las diferencias se consideraron significativas cuando el $p < 0,05$.

Para los experimentos *in vitro* con CLs aislados, se cultivaron 2 CLs por pocillo y se relativizaron los niveles de las proteínas estudiadas y de la P4 en el medio de cultivo con el

pocillo control de esa misma rata. Se determinaron las veces de cambio, mediante ANOVA de una vía seguido por el test de Dunnet para comparar cada uno de los grupos con el control y el de Tukey para evaluar diferencias entre cada uno de los tratamientos. Las diferencias se consideraron significativas cuando el $p < 0,05$.

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa Graph Prism 5.0.

Resultados



Capítulo I

1. Efecto *in vivo* de la administración intraovárica de S1P previo a la inyección de una dosis luteolítica de PGF2 α en ratas preñadas

1.1. Efecto de S1P y PGF2 α sobre la ultra estructura del CL, el número de células apoptóticas y la densidad vascular

El primer objetivo fue estudiar los efectos de la administración local de S1P previo a la luteólisis inducida por PGF2 α . Para esto se administró S1P en los ovarios de ratas preñadas, dos horas antes de la aplicación de una dosis luteolítica de PGF2 α en el día 19 de preñez. Los animales fueron sacrificados a distintos tiempos, 4 y 36 horas post PGF2 α .

Considerando que las células luteales mueren por procesos apoptóticos en la luteólisis, se realizó la técnica de TUNEL en cortes histológicos en los siguientes grupos: Control 0h (C0h), PGF2 α 4h, (PG4h) y PGF2 α +S1P 4h (PG+S4h). La figura 1 muestra la presencia de pocas células con fragmentación nuclear del ADN a los 19 días de preñez, en cambio 4 horas luego de la administración de PGF2 α el número de células luteales con avanzados signos de apoptosis aumentó significativamente. La administración de S1P previno el efecto de la PGF2 α y disminuyó considerablemente el porcentaje de células apoptóticas en el CL (C0h $0,33 \pm 0,08$; PG4h $3,24 \pm 0,29$; PG+S1P4h $0,27 \pm 0,09$ $p < 0,001$).

Como se puede observar en la figura 2, el análisis de la microestructura luteal por ME reveló que las células luteales al día 19 de preñez poseen núcleos normales y pocos indicios de muerte celular.

El tratamiento con PGF2 α incrementó el número de células luteales con signos avanzados de apoptosis, por ejemplo: fragmentación nuclear, condensación de la cromatina y la presencia de cuerpos apoptóticos a las 36 horas post inyección. (Figura 2C y D)

La administración de S1P 2 horas antes de la inyección de PGF2 α evitó dichos cambios y las células exhibieron aspecto similar al grupo no tratado (Figura 2E y F). También se observó un incremento en la densidad vascular en este grupo, hecho que fue corroborado mediante inmunohistoquímica.

Se observó inmunomarcación para el marcador de células endoteliales PECAM-1 a los 19 días de preñez (C0h), (Figura 3B), el tratamiento con PGF2 α disminuyó su expresión a las 4 y 36 horas (PG 4h y PG 36h) (Figura 3C y D). Sin embargo el tratamiento con S1P aumentó la expresión PECAM-1 en el CL tanto a las 4 como a las 36 horas (PG+S 4h y PG+S 36h) (Figura 3D y F).

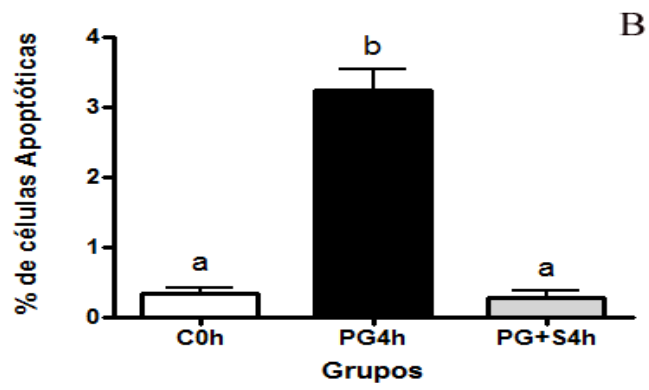
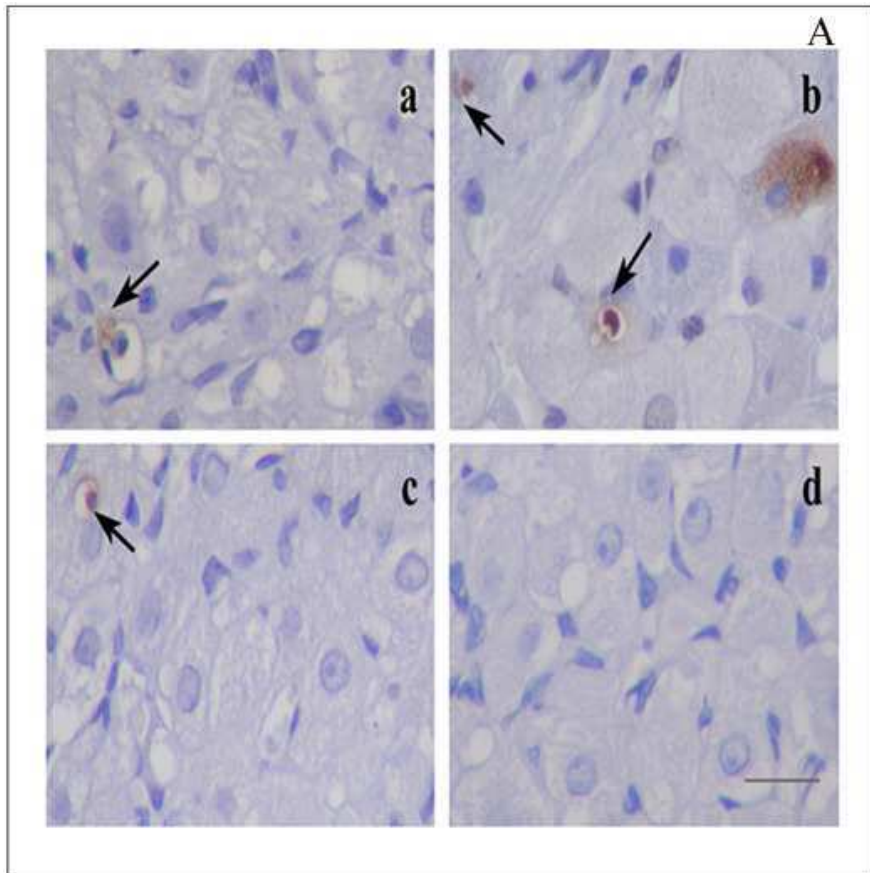


Figura 1: Porcentaje de células apoptóticas en CL de ratas medido por TUNEL

A: Campos representativos de cortes de CL teñidos con la técnica de TUNEL, C0h (a), PG4h (b), PG+S 4h (c) control negativo (d). La barra negra en la figura d corresponde a 20 μ m

B: Análisis de TUNEL expresado como porcentaje de células apoptóticas en el CL. Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Las diferentes letras (a y b) representan diferencia significativa ($p < 0,001$) entre los diferentes grupos.

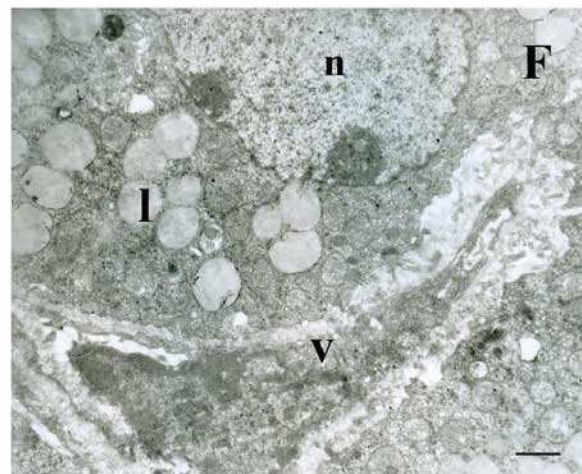
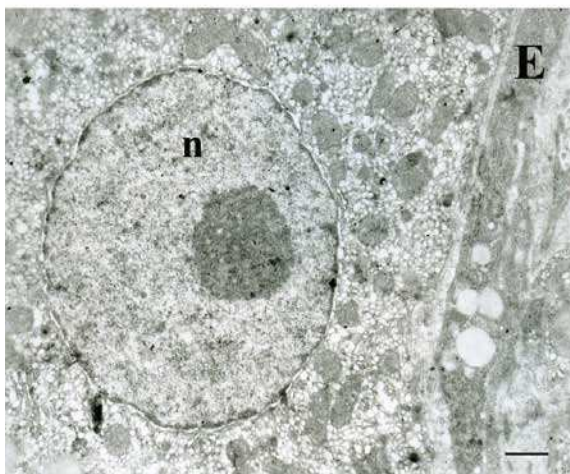
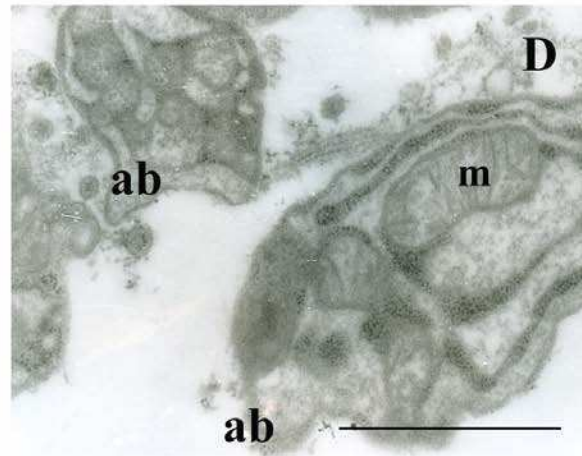
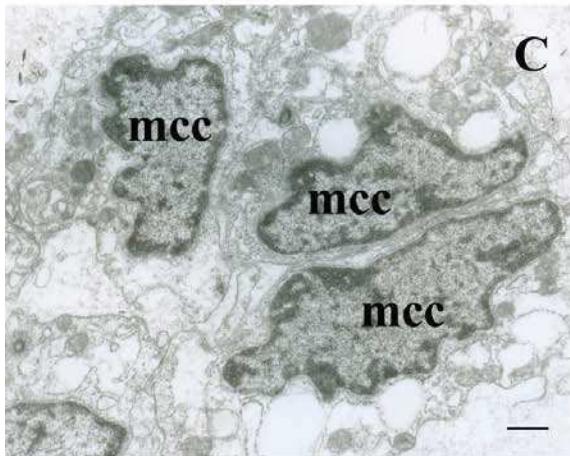
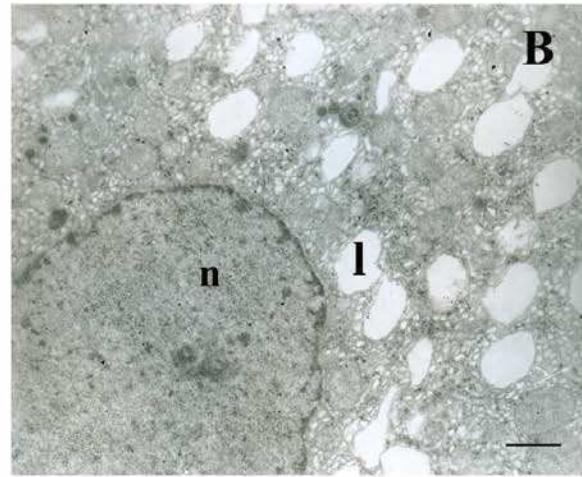
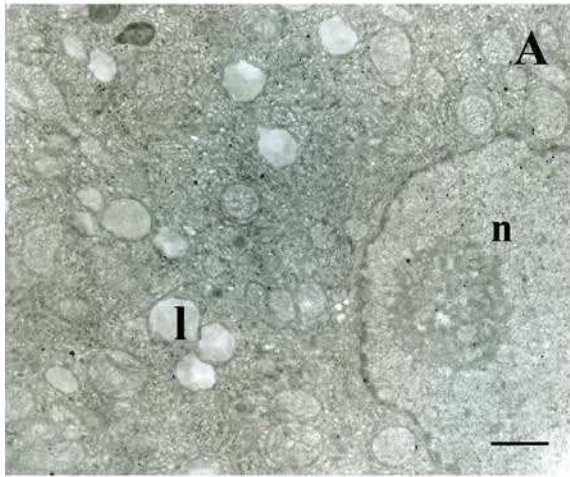


Figura 2: Fotografías de la ultraestructura luteal estudiada mediante ME 36 horas post PGF2 α .

A y B: CL de ratas en el día 19 de la gestación (C0h). **C y D:** CL de ratas tratadas localmente con vehículo previo a la administración de PGF2 α (PG). **E y F:** CL de ratas tratadas localmente con S1P previo a la administración de PGF2 α (PG+S). Se observa la morfología típica de células en apoptosis en el grupo tratado sólo con PGF2 α , por ejemplo: marginación y condensación de la cromatina, presencia de cuerpos apoptóticos. Estos cambios no se observan en el grupo tratado con S1P.

Cada barra representa 1 μ m en todos los paneles. En todas las fotos mcc: marginación y condensación de la cromatina; n: núcleo; v: vaso sanguíneo; m: mitocondria; ab: cuerpos apoptóticos.

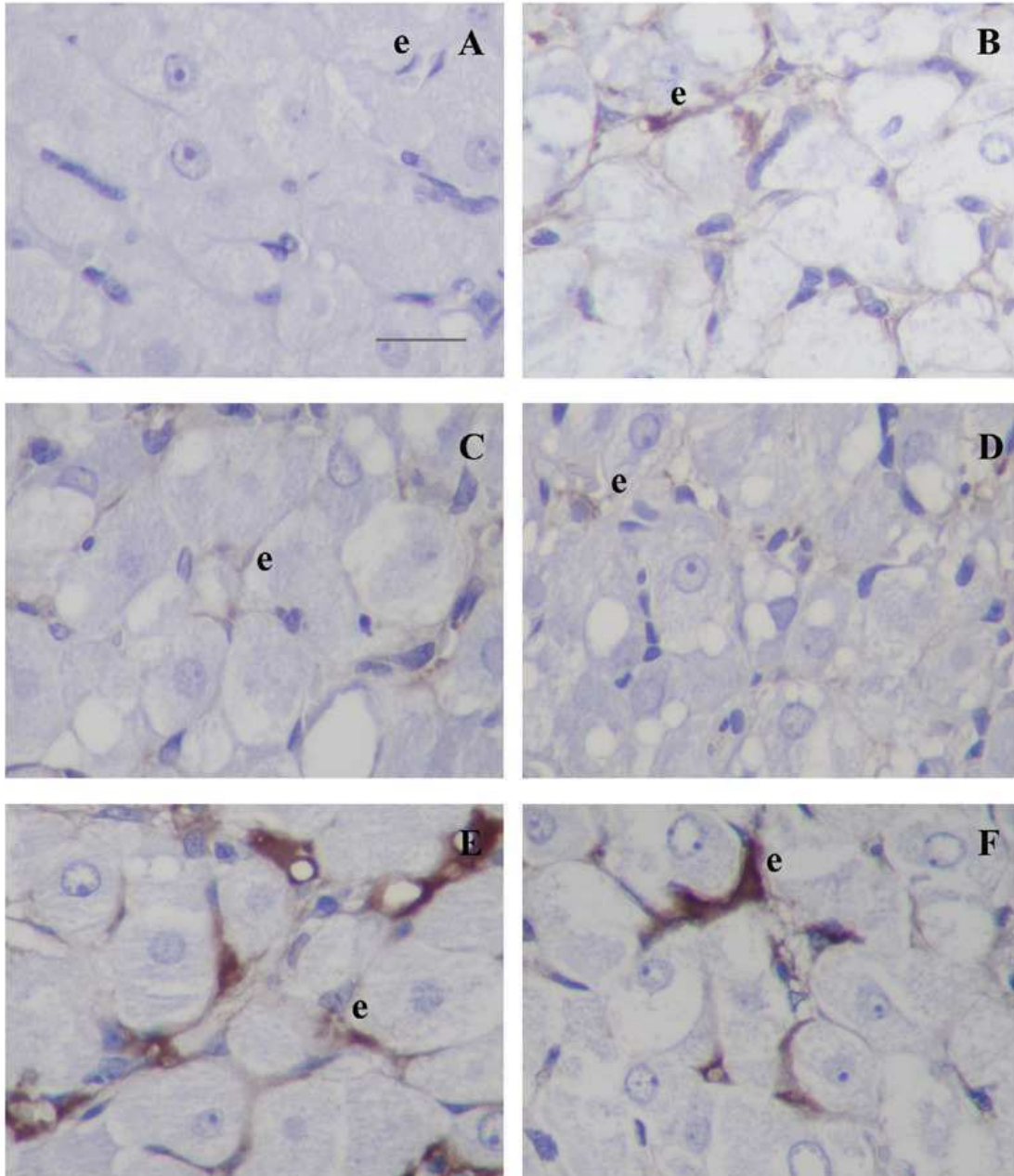


Figura 3: Inmunohistoquímica de PECAM-1 de ovarios de ratas tratadas con $\text{PGF2}\alpha$ previo a la administración local de S1P o su solución vehículo y sacrificadas a las 4 y 36 horas. Cada fotografía muestra un campo representativo de cada tratamiento.

A: control negativo en ausencia del primer anticuerpo **B:** CL de rata en el día 19 de la gestación (C0h) **C y D:** CL de ratas tratadas localmente con vehículo previo a la administración de $\text{PGF2}\alpha$ y sacrificadas a las 4 y 36 horas respectivamente. (PG4 y 36h) **E y F:** CL de ratas tratadas localmente con S1P previo a la administración de $\text{PGF2}\alpha$ y

sacrificadas a las 4 y 36 horas respectivamente. (PG+S4 y 36h). La marca es específica de células endoteliales (e). La barra en **A** corresponde a 20 μ m.

1.2. Efecto de S1P y PGF2 α sobre la funcionalidad del CL de preñez

El contenido de P4 luteal fue medido en los CLs aislados de los diferentes grupos (C0h, PG4h, PG36h, PG+S4h y PG+S36h) mediante la técnica de RIA para evaluar si el tratamiento con S1P previo a la PGF2 α es capaz de prevenir la disminución de la P4 inducida por esta misma. Como se observa en la figura 4, la administración de PGF2 α disminuyó rápidamente (4 horas) el contenido de P4 luteal (PG4h) y los niveles permanecieron bajos a las 36 horas (PG36h).

La administración de S1P falló en prevenir el efecto de la PGF2 α a las 4 horas (PG+S4). Sin embargo, a las 36 horas, la P4 se mantuvo en niveles similares al grupo no tratado (C0h). (C0h $39,92 \pm 6,52$; PG4h $19,99 \pm 1,46$; PG+S4h $18,83 \pm 0,61$; PG36h $23,00 \pm 1,18$; PG+S36h $44,90 \pm 3,01$ $p < 0,05$).

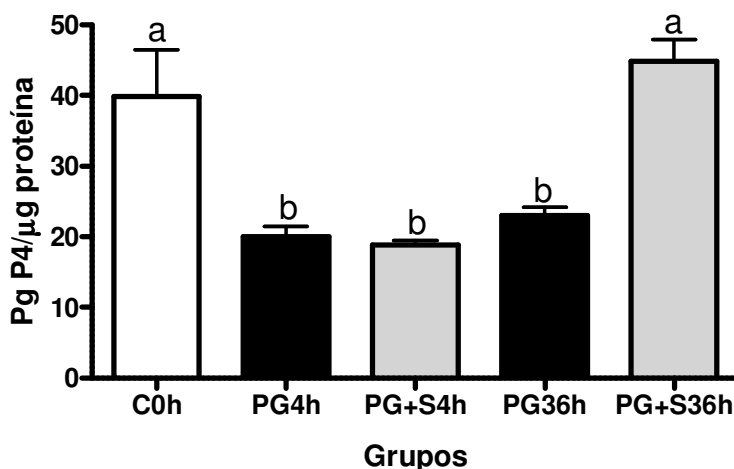


Figura 4 Contenido de progesterona luteal

Se midió el contenido de P4 en los diferentes grupos a las 4 y 36 horas de la administración de PGF2 α . Las ratas fueron inyectadas dos horas antes de la PGF2 α (PG+S4h o 36h) con S1P o con la solución vehículo (PG 4h o 36h). C0h ratas sin tratamiento. Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Diferentes letras sobre la barra de error indican diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los diferentes grupos.

1.3. Efecto de S1P y PGF2 α sobre la expresión de proteínas relacionadas a la apoptosis

Luego de la administración de PGF2 α en el día 19 de preñez, la actividad de las caspasas iniciadoras -2 y -8 aumentó significativamente a las 4 horas (caspasa-2: C0h 8491 \pm 1407; PG4h 36702 \pm 3156; PG+S4h 23573 \pm 2016 p<0,05; caspasa-8: C0h 1895 \pm 283,3; PG4h 9889 \pm 585,8; PG+S4h 6785 \pm 603,6 p<0,05), (Figura 5A y B). Como se observa en la figura 6, al igual que las caspasas 2 y 8, la actividad de la principal caspasa efectora; caspasa 3 aumentó significativamente (C0h 45049 \pm 5680; PG4h 155054 \pm 7392; PG+S4h 89625 \pm 9834 p<0,05). La administración de S1P, 2 horas antes de la PGF2 α fue capaz de prevenir, en parte, el incremento en la actividad de las tres caspasas medidas (p<0,05).

No se observaron diferencias significativas en la actividad de caspasa iniciadora-9 entre los grupos (figura 5C). Si bien se observa una tendencia a aumentar la actividad de caspasa 9 en el tratamiento con PGF2 α (PG4h), este efecto no fue significativo (C0h 1189 \pm 630,6; PG4h 6091 \pm 871,8; PG+S4h 7814 \pm 2894 p>0,05).

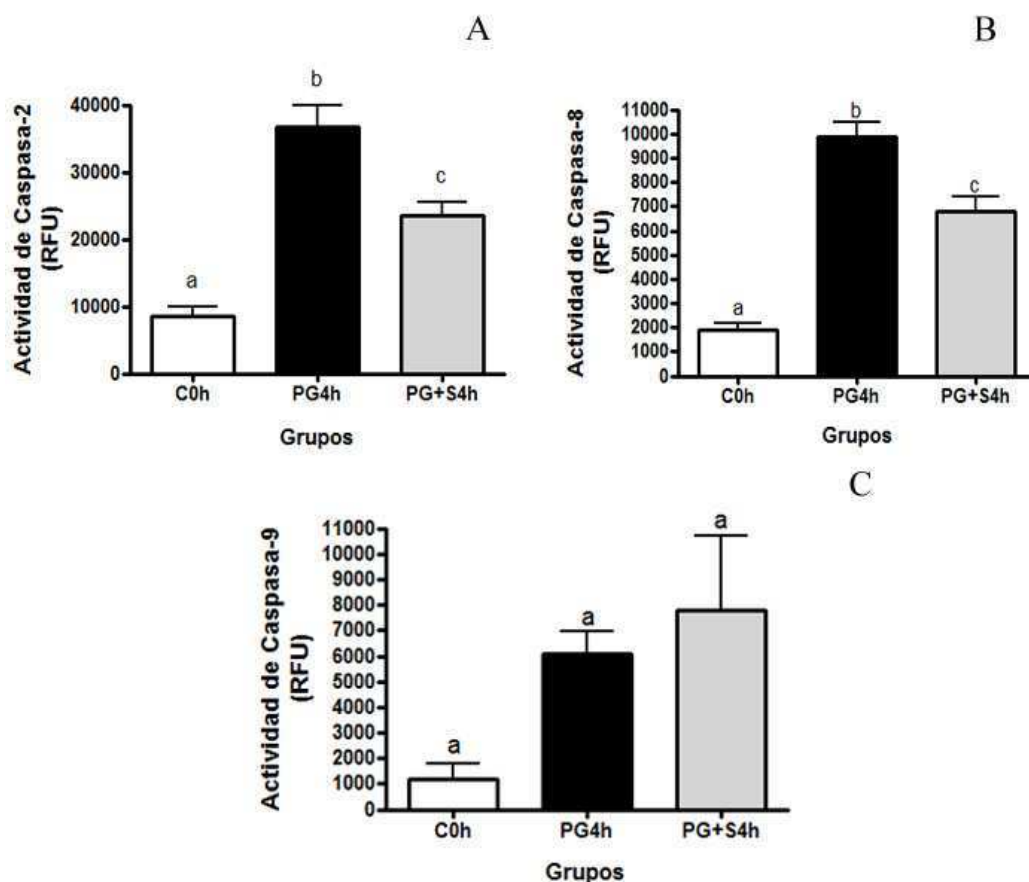


Figura 5: Niveles de actividad enzimática de caspasas iniciadoras en CL

Caspasa 2 (A), 8 (B), y 9 (C) en el CL 4 horas post administración de $\text{PGF2}\alpha$. Los niveles de estas caspasas se midieron en el CL 4 horas post administración de $\text{PGF2}\alpha$ (PG+S4h y PG4h) y en el grupo sin tratamiento (C0h). La administración de $\text{PGF2}\alpha$ aumentó la actividad de las caspasas iniciadoras 2 y 8 a las 4 horas de su administración. El tratamiento previo con S1P previno dicho incremento. No se observan diferencias significativas en la actividad de caspasa 9 en los grupos analizados. Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Las barras con diferentes letras (a, b o c) representan la diferencia significativa entre los grupos en todas las figuras ($p < 0,05$).

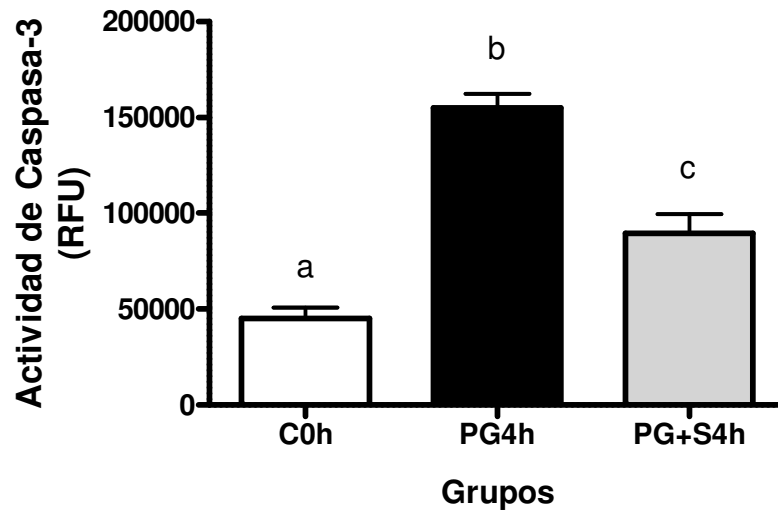


Figura 6: Niveles de actividad enzimática de la caspasa efectora 3

Los niveles de caspasa-3 se midieron en el CL 4 horas post administración de PGF2 α . (PG+S4h y PG4h) y en el grupo sin tratamiento (C0h).

La administración de PGF2 α aumentó la actividad de la caspasa efectora 3 a las 4 horas de su administración. El tratamiento previo con S1P previno dicho incremento. Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Las barras con diferentes letras (a, b o c) representan la diferencia significativa entre los grupos ($p < 0,05$).

1.4. Estudio de los cambios en las vías de transducción de señales:

1.4.a. Niveles de AKT fosforilado

Como se observa en la figura 7 el tratamiento con $\text{PGF2}\alpha$, al día 19 de preñez, disminuyó los niveles de fosforilación de AKT en el CL respecto al grupo control (C0h). No obstante la administración de S1P dos horas antes de la $\text{PGF2}\alpha$, previno dicha disminución y aumentó el grado de fosforilación de esta proteína (C0h $22,53 \pm 0,50$; PG4h $19,49 \pm 0,22$; PG+S4h $24,75 \pm 0,76$ $p < 0,05$).

El western blot de pAKT/AKT total, (figura 8) mediante el uso de un anticuerpo monoclonal que reconoce el sitio de fosforilación de AKT en la serina 473 muestra resultados similares a los obtenidos por la técnica de ELISA, sin embargo mediante WESTERN BLOT no se observan diferencias significativas en el grado de fosforilación entre el grupo control (C0h) y el grupo tratado con $\text{PGF2}\alpha$ (PG4h). (C0h $0,17 \pm 0,01$; PG4h $0,29 \pm 0,06$; PG+S4h $0,71 \pm 0,07$ $p < 0,05$).

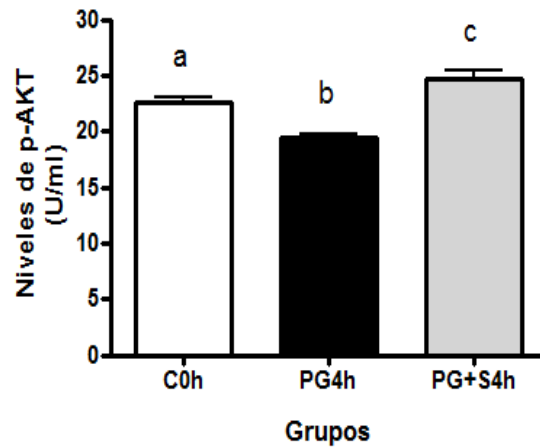


Figura 7: Efecto del tratamiento con S1P sobre AKT fosforilado medido por ELISA

Fosforilación de AKT en los diferentes grupos C0h, PG4h, PG+S4h. Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Las barras con diferentes letras (a, b o c) representan la diferencia significativa entre los grupos.

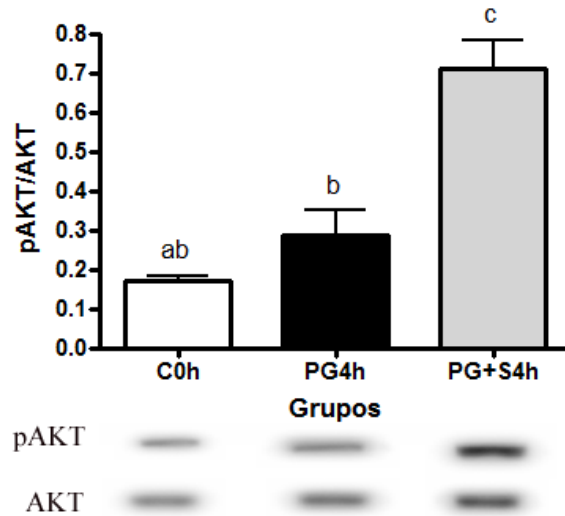


Figura 8: Efecto del tratamiento con S1P sobre los niveles de AKT fosforilado medidos por western blot

Panel superior: cuantificación densitométrica de pAKT sobre AKT (pAKT/AKT) en los diferentes grupos: C0h, PG4h y PG+S4h. Cada una de las proteínas fue normalizada contra

GAPDH. Las barras representan la media \pm ESM. Las barras con diferentes letras (a, b o c) representan la diferencia significativa entre los grupos

Panel inferior: Inmunoblot específico del contenido de pAKT y AKT total en los CLs de los diferentes grupos correspondientes a un peso molecular de 60kDa.

1.4.b. Niveles de ERK fosforilado

La administración local de S1P previo a la dosis luteolítica de PGF2 α aumentó los niveles de fosforilación de ERK1/2 a las 4 horas del tratamiento (PG+S4h) ($P < 0,05$) con respecto al grupo control (C0h) y al grupo tratado sólo con PGF2 α (PG4h).

Si bien se observa una tendencia a aumentar la fosforilación de esta proteína con el tratamiento sólo con PGF2 α respecto al grupo sin tratamiento (C0h) esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$) (C0h $0,04 \pm 0,01$; PG4h $0,17 \pm 0,03$; PG+S4h $0,32 \pm 0,06$). (Figura 9).

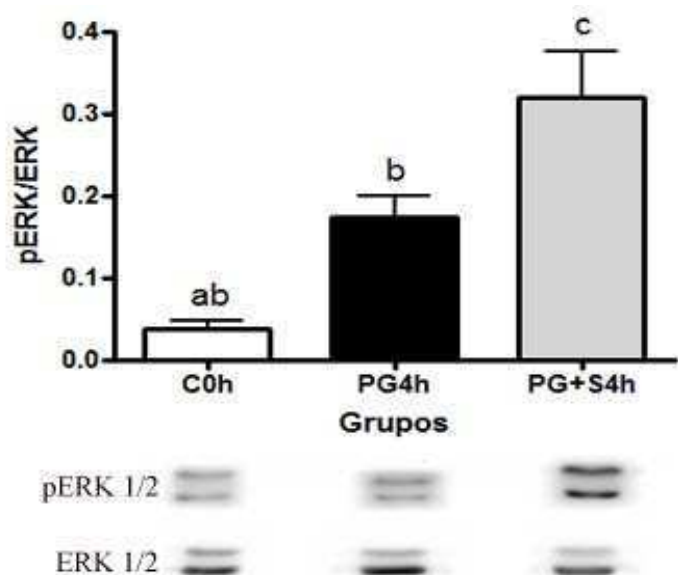


Figura 9: Efecto del tratamiento con S1P sobre los niveles de ERK fosforilado medidos por western blot

Panel superior: cuantificación densitométrica de pERK 1/2 sobre ERK 1/2 en los diferentes grupos: C0h, PG4h y PG+S4h. Cada una de las proteínas fue normalizada contra GAPDH. Las barras representan la media \pm ESM. Las barras con diferentes letras (a, b o c) representan la diferencia significativa entre los grupos. El tratamiento con S1P (PG+S4h) aumentó la fosforilación de ERK respecto al grupo control (C0h) y al grupo tratado solo con PGF2 α (PG4h) a las 4 horas.

Panel inferior: Inmunoblot representativo del contenido de pERK y ERK en los CLs de ratas tratadas correspondientes a un peso molecular de 42/44 kDa.

1.4.c. Niveles de TNF- α

La administración local de S1P previo a la dosis luteolítica de PGF2 α aumentó los niveles TNF- α a las 4 horas del tratamiento (PG+S4h) ($P < 0,05$) con respecto al grupo control (C0h) y al grupo tratado sólo con PGF2 α (PG4h).

No se observaron diferencias entre el grupo control (C0h) y el grupo tratado sólo con PGF2 α (PG4h) ($p > 0,05$) (C0h $6,20 \pm 3,05$; PG4h $0,14 \pm 0,02$; PG+S4h $11,58 \pm 3,57$). (Figura 10).

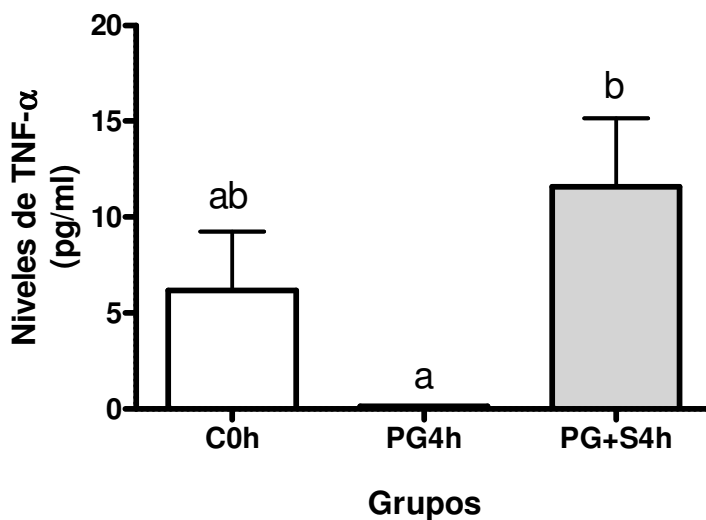


Figura 10: Efecto del tratamiento con S1P sobre los niveles de TNF- α medido por ELISA

Niveles de TNF- α en los diferentes grupos C0h, PG4h, PG+S4h. Las barras representan la media \pm ESM. Las barras con diferentes letras (a, b o c) representan la diferencia significativa entre los grupos ($p < 0,05$).

Capítulo II

1. Expresión de miembros de la familia Notch en ovarios de ratas preñadas

1.1. Localización de NOTCH1, NOTCH4 y DLL4

La figura 11 muestra la localización celular de NOTCH1, NOTCH4 y DLL4 en cortes en parafina de ovarios de ratas preñadas.

Se detectó marca específica para los receptores NOTCH1 y 4 en células luteales grandes y pequeñas, como así también en células endoteliales del CL. Además se observó inmunomarcación en los vasos sanguíneos del estroma ovárico. Asimismo vimos marcación positiva para ambos receptores en el núcleo de las células luteales, coincidiendo con el hecho que cuando esta vía se activa, el dominio intracelular de Notch (NICD) se transloca al núcleo donde regula la transcripción de genes blanco.

Se detectó también marca positiva para el ligando DLL4 en células luteales grandes, pequeñas, y en células endoteliales. Los vasos sanguíneos ováricos también fueron inmunoreactivos a esta proteína. La marca observada para DLL4 se asoció principalmente a la membrana celular de las células luteales, con citoplasma difuso. Los núcleos de estas células fueron negativos.

Las células del estroma ovárico no mostraron marca para ninguna de las tres proteínas estudiadas.

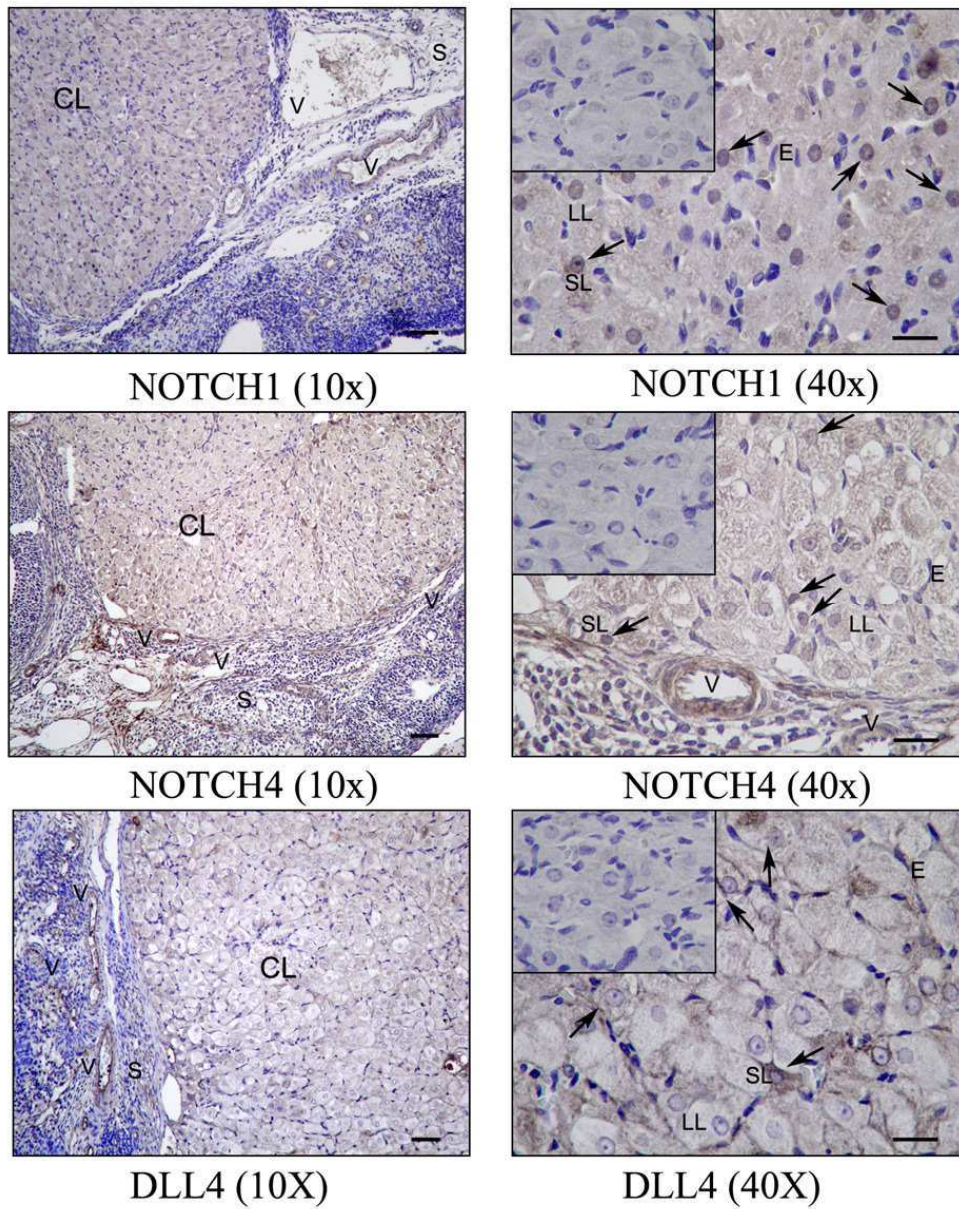


Figura 11: Localización de los receptores y el ligando de Notch en cortes de ovarios de ratas preñadas. La figura de menor tamaño a la derecha muestra un corte de ovario perteneciente al control negativo en ausencia del primer anticuerpo.

Las barras negras corresponden en las figuras de la izquierda a 50 μm y en la derecha a 20 μm .

CL: cuerpo lúteo; SL: células luteales pequeñas; LL: células luteales grandes; V: vaso sanguíneo; E: endotelio; S: estroma. Las flechas indican la marca en cada figura para la correspondiente proteína.

1.2. Niveles de ARNm de Notch1, Notch4 y Dll4 durante la preñez y posparto

Para evaluar si a lo largo de la gestación y el posparto se modifica la expresión de los miembros de la familia Notch en el CL de preñez, se analizó la expresión de los ARNm de Notch1, Notch4 y Dll4 por PCR en tiempo real en el día 3, 12, 21 y 4 posparto. (Notch1 día 3: $0,99 \pm 0,40$; día 12: $1,30 \pm 0,66$; día 21: $1,11 \pm 0,15$; día 4 pp: $0,38 \pm 0,11$ $p > 0,05$. Notch4 día 3: $1,39 \pm 0,31$; día 12: $2,35 \pm 0,65$; día 21: $2,35 \pm 0,32$; día 4 pp: $0,68 \pm 0,14$ a vs b $p < 0,05$. Dll4 día 3: $2,02 \pm 0,47$; día 12: $3,73 \pm 1,26$; día 21: $3,41 \pm 0,66$; día 4 pp: $1,90 \pm 0,67$ $p > 0,05$).

Si bien se observó una tendencia a incrementar la expresión de los ARNm en la mitad de la gestación y a disminuir en el posparto, sólo se encontró significancia entre los niveles del ARNm de Notch 4 en el día 4 posparto (4pp) con respecto al día 12 y 21 de gestación. (Figura 12).

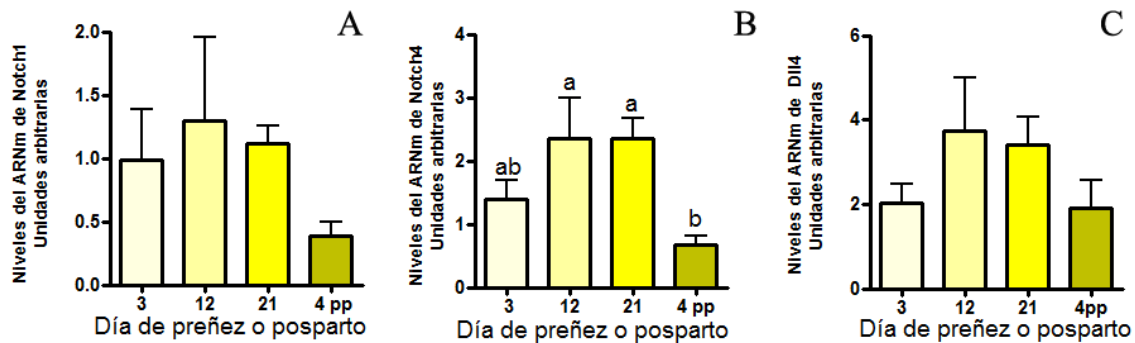


Figura 12: Niveles de ARNm de Notch1, Notch4 y Dll4 en CL de preñez obtenidos por RT-PCR en tiempo real.

Se midió la expresión de los ARNm de los receptores (A y B) y el ligando (C) en CLs aislados de ovarios de ratas a distintos tiempos de la preñez (día 3, 12, o 21) y posparto (día 4 pp). Los valores de cada ARNm se normalizaron con los niveles del ARNm de 18S luteal. Los resultados se expresan como la media \pm ESM. (n=5-6).

2. Expresión de miembros de la familia Notch durante la luteólisis inducida por PGF2 α

2.1. Niveles de ARNm de Notch1, Notch4 y Dll4

Para determinar si la expresión de miembros de la familia Notch cambia durante la luteólisis inducida, estudiamos la expresión del ARNm de Notch1, Notch4 y Dll4 por PCR en tiempo real en CLs aislados a las 4 y 24 horas de la administración de PGF2 α .

La expresión del ARNm del ligando Dll4 y los receptores Notch1 y 4 disminuyeron significativamente a las 4 horas luego de la administración de PGF2 α (Dll4 Control: $1,62 \pm 0,18$; Dll4 PGF2 α : $0,45 \pm 0,11$ $p < 0,001$; Notch1 Control: $0,64 \pm 0,11$; Notch1 PGF2 α $0,15 \pm 0,06$ $p < 0,01$; Notch4 Control: $0,87 \pm 0,06$; Notch4 PGF2 α : $0,63 \pm 0,07$ $p < 0,05$). Figura 13.

No obstante, 24 horas luego de la administración de PGF2 α , sólo se observaron diferencias en los niveles del mensajero de Dll4 entre el grupo control y el grupo tratado. Dll4 Control: $0,79 \pm 0,26$; Dll4 PGF2 α : $1,96 \pm 0,27$ $p < 0,05$; Notch1 Control: $0,54 \pm 0,25$; Notch1 PGF2 α $1,30 \pm 0,331$ $p > 0,05$; Notch4 Control: $1,47 \pm 0,30$; Notch4 PGF2 α : $1,31 \pm 0,20$ $p > 0,05$). Figura 14.

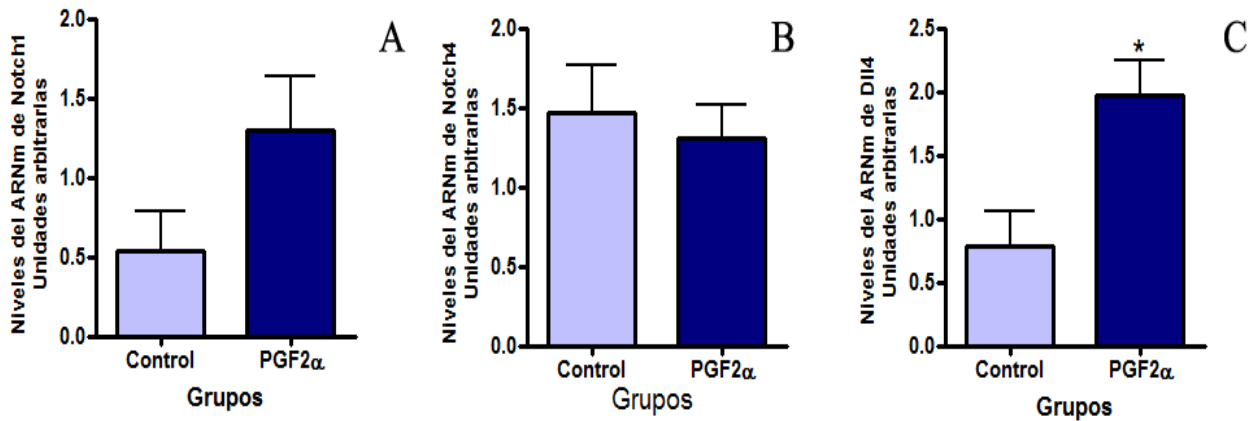


Figura 13: Niveles de ARNm de Notch1, Notch4 y Dll4 en CL, 4 horas luego de administración de PGF2 α en el día 19 de preñez obtenidos por RT-PCR en tiempo real.

Los valores de cada ARNm fueron normalizados con los niveles del ARNm de 18S luteal.

La expresión de los receptores (A y B) y el ligando (C) disminuyen a las 4 horas de la administración de PGF2 α . Los resultados se expresan como la media \pm ESM \ast = p < 0,01 en A. \ast = p < 0,05 en B y \ast = p < 0,001 en C.

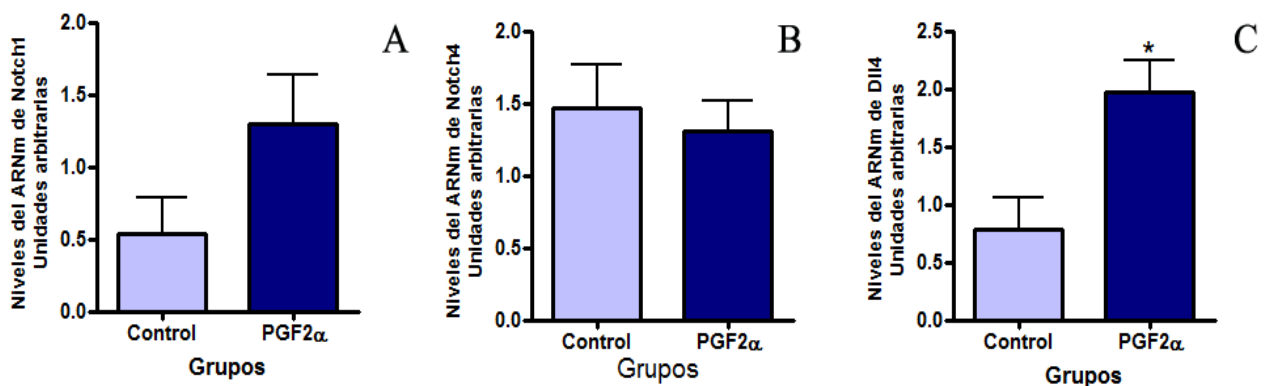


Figura 14: Niveles de ARNm de Notch1, Notch4 y Dll4 en CL, 24 horas luego de administración de PGF2 α en el día 19 de preñez obtenidos por RT-PCR en tiempo real.

Los valores de cada ARNm fueron normalizados con los niveles del ARNm de 18S.

La expresión de los receptores (A y B) no varió a las 24 horas respecto al grupo control, en cambio la expresión del ligando (C) aumentó 24 horas post PGF2 α . Los resultados se expresan como la media \pm ESM $\ast=p < 0,05$ en C.

2.2. Niveles proteicos de NOTCH1, NOTCH4 y DLL4

En forma paralela a los resultados obtenidos por PCR en tiempo real, los niveles proteicos de los NICD de los receptores también disminuyeron a las 4 horas. (NOTCH1 Control: $0,53 \pm 0,11$; NOTCH1 PGF2 α $0,22 \pm 0,02$ $p < 0,05$, NOTCH4 Control: $0,09 \pm 0,01$; NOTCH4 PGF2 α $0,06 \pm 0,01$ $p < 0,05$). (Figura 15).

En cambio, no se detectaron diferencias significativas para el ligando DLL4 entre el grupo Control y PGF2 α (DLL4 Control: $1,02 \pm 0,24$; DLL4 PGF2 α $1,06 \pm 0,10$ $p > 0,05$). (Figura 15).

A las 24 horas de la administración de PGF2 α , no se evidenciaron diferencias en el contenido proteico de los receptores entre el grupo control y el tratado. (NOTCH1 Control: $0,31 \pm 0,01$; NOTCH1 PGF2 α $0,34 \pm 0,02$ $p > 0,05$, NOTCH4 Control: $1,02 \pm 0,06$; NOTCH4 PGF2 α $0,98 \pm 0,03$ $p > 0,05$). (Figura 16).

Coincidentemente con el resultado obtenido por PCR en tiempo real para el ligando DLL4 a las 24 horas, el contenido proteico del mismo aumentó considerablemente (DLL4 Control: $1,55 \pm 0,32$; DLL4 PGF2 α $2,58 \pm 0,23$ $*p < 0,05$). (Figura 16).

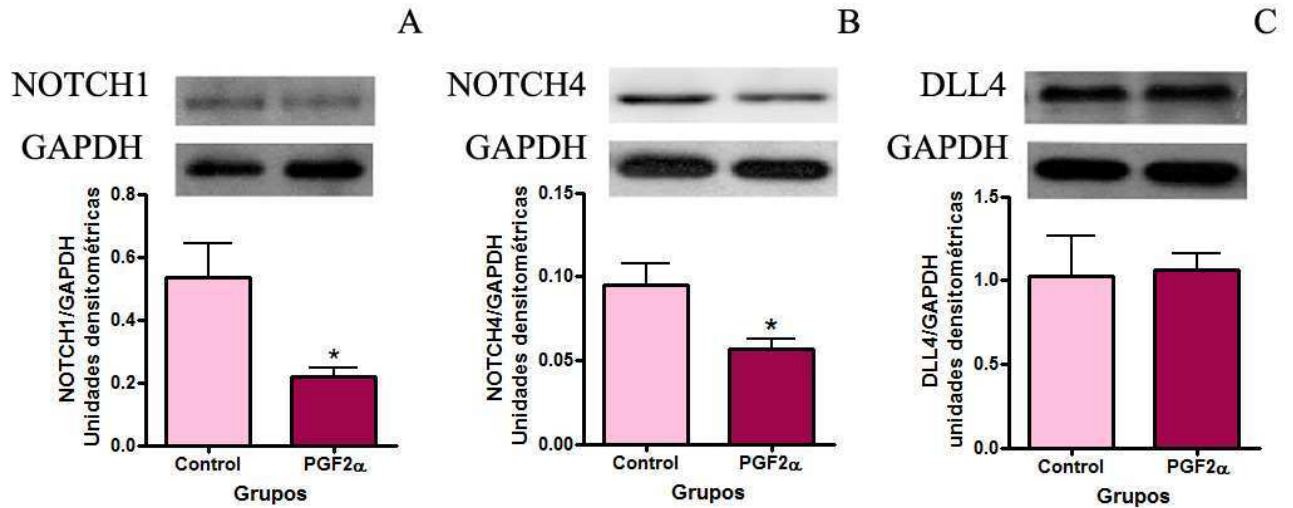


Figura 15: Niveles proteicos de NOTCH1, NOTCH4 Y DLL4 en CL, 4 horas luego de administración de PGF2 α en el día 19 de preñez obtenidos por western blot.

A) Panel superior: inmunoblot del NICD del receptor Notch1 en CLs aislados de ratas control y tratadas con PGF2 α .

Panel inferior: cuantificación densitométrica del contenido de NICD de Notch1. Los niveles del NICD de Notch1 disminuyeron considerablemente a las 4 horas respecto al grupo control. Las barras representan la media \pm ESM normalizado a GAPDH (n=6; *p< 0,05).

B) Panel superior: Inmunoblot del NICD del receptor Notch4 en CLs aislados de ratas control y tratadas con PGF2 α .

Panel inferior: cuantificación densitométrica del contenido de NICD de Notch4. Se observó una disminución significativa en los niveles proteicos de este receptor a las 4 horas del tratamiento con PGF2 α . Las barras representan la media \pm ESM normalizado a GAPDH (n=6; *p< 0,05).

C) Panel superior: inmunoblot del ligando DLL4 en CLs aislados de ratas control y tratadas con PGF2 α .

Panel inferior: cuantificación densitométrica del contenido del ligando. Los niveles proteicos del ligando no varían a las 4 horas del tratamiento con PGF2 α . Las barras representan la media \pm ESM normalizado a GAPDH (n=6; p> 0,05).

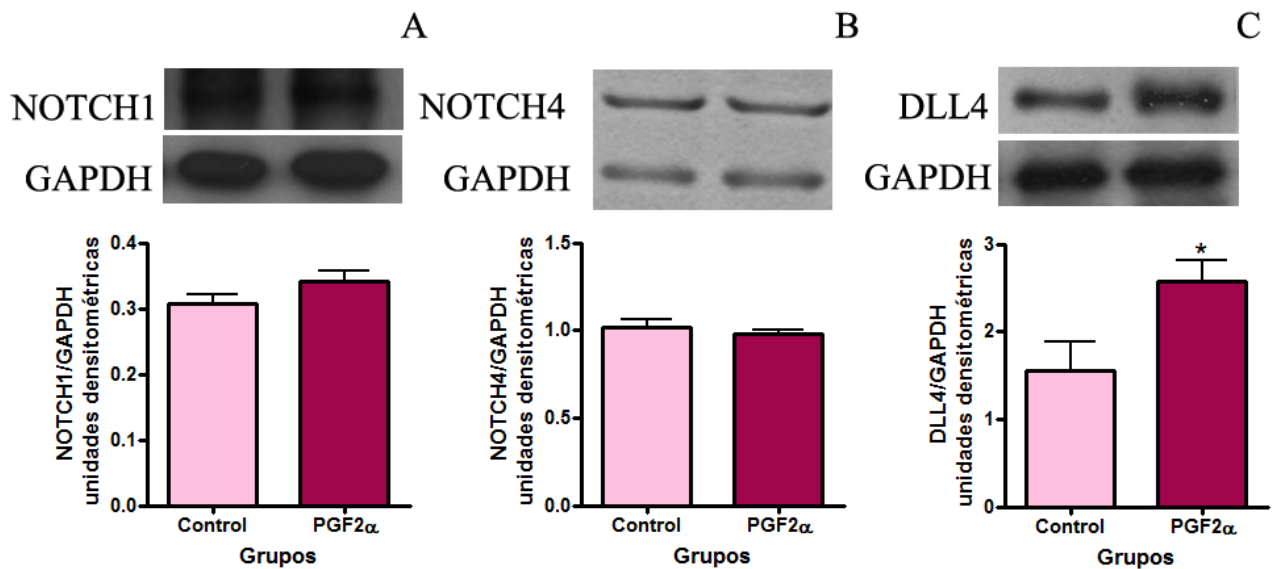


Figura 16 Niveles proteicos de NOTCH1, NOTCH4 Y DLL4 en CL, 24 horas luego de administración de PGF2 α en el día 19 de preñez obtenidos por western blot.

A) Panel superior: inmunoblot del NICD del receptor Notch1 en CLs aislados de ratas control y tratadas con PGF2 α .

Panel inferior: cuantificación densitométrica del contenido de NICD de Notch1. Los niveles del NICD de Notch1 no variaron a las 24 horas respecto al grupo control. Las barras representan la media \pm ESM normalizado a GAPDH (n=6; p> 0,05).

B) Panel superior: Inmunoblot del NICD del receptor Notch4 en CLs aislados de ratas control y tratadas con PGF2 α .

Panel inferior: cuantificación densitométrica del contenido de NICD de Notch4. No se observó una disminución significativa a las 24 horas del tratamiento con PGF2 α . Las barras representan la media \pm ESM normalizado a GAPDH (n=6; p> 0,05).

C) Panel superior: inmunoblot del ligando DLL4 en CLs aislados de ratas control y tratadas con PGF2 α .

Panel inferior: cuantificación densitométrica del contenido del ligando. Los niveles de DLL4 aumentaron significativamente a las 24 horas respecto al grupo control. Las barras representan la media \pm ESM normalizado a GAPDH (n=6; *p< 0,05).

3. Efecto de la administración local de un inhibidor de la vía de Notch (DAPT) en ratas preñadas sobre:

3.1. Los niveles luteales de los receptores Notch1 y Notch4

Para inhibir la vía de señalización de Notch se administró un inhibidor de la enzima γ -secretasa, DAPT que cataliza el clivaje final de Notch, dando como resultado la liberación del fragmento activo de (NICD).

Las ratas recibieron una inyección intrabursa de 10 μ g de DAPT en ambos ovarios, los cuales fueron extraídos 24 horas después, procesados y analizados como se describió previamente.

Se estudió mediante western blot el clivaje de Notch1 y Notch4 en CL de ratas preñadas 24 horas luego de la administración del DAPT para verificar la capacidad de inhibir la vía de Notch. Los niveles proteicos del NICD de Notch1 disminuyeron significativamente luego de la administración del DAPT comparado con el grupo Control (Control: $1,01 \pm 0,10$; DAPT: $0,75 \pm 0,05$; $p < 0,05$, $n = 5-6$ $p < 0,05$) (Figura 17A). No obstante no se observaron diferencias significativas en los niveles proteicos del NICD de Notch4 luego del tratamiento con DAPT (Control: $2,04 \pm 0,06$; DAPT: $1,82 \pm 0,07$; $p > 0,05$, $n = 5-6$). (Figura 17B).

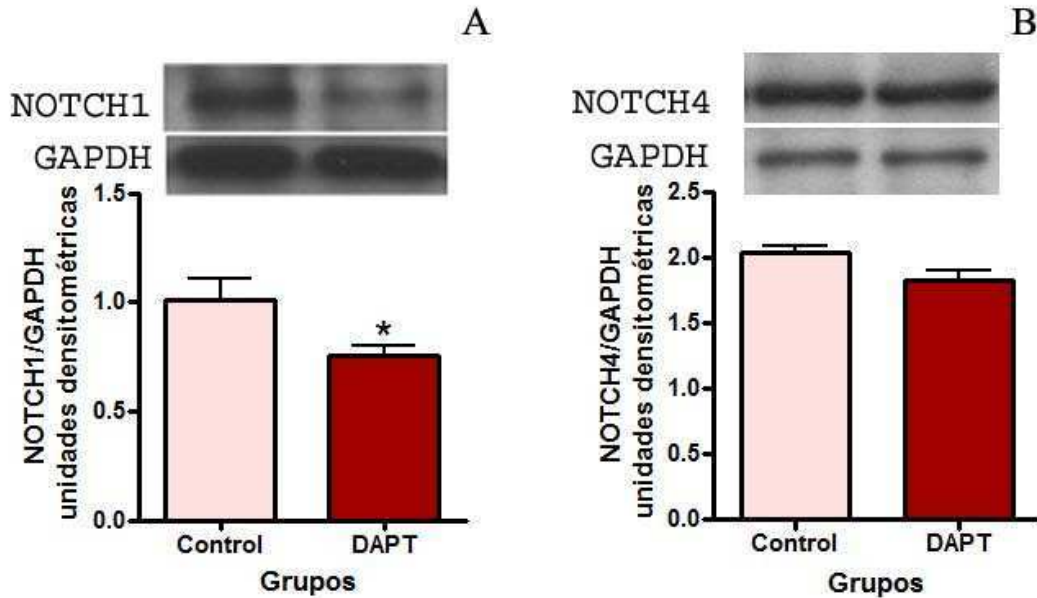


Figura 17: Niveles del NICD de Notch1 (A) y Notch4 (B) a las 24 horas del tratamiento con DAPT

A) Panel superior: Inmunoblot del NICD del receptor Notch1 en CLs aislados de ratas control y tratadas con DAPT.

Panel inferior: cuantificación densitométrica del contenido de NICD de Notch1. Los niveles del NICD de Notch1 disminuyeron significativamente luego del tratamiento con DAPT. Las barras representan la media \pm ESM normalizado a GAPDH (n=5-6; *p< 0,05).

B) Panel superior: Inmunoblot del NICD del receptor Notch4 en CLs aislados de ratas control y tratadas con DAPT.

Panel inferior: cuantificación densitométrica del contenido de NICD de Notch4. No se observó una disminución significativa luego del tratamiento con DAPT. Las barras representan la media \pm ESM normalizado a GAPDH (n=5-6; p> 0,05).

3.2. La esteroidogénesis luteal

Para evaluar si el bloqueo de la señalización de Notch con DAPT, podría alterar en forma directa la funcionalidad del CL de preñez, lo que traería como consecuencia una disminución en la síntesis de P4, se analizaron los niveles de esta hormona en el suero de ratas 24 horas luego de la inyección intraovárica del inhibidor.

Como se observa en la figura 18 los niveles séricos de P4 fueron significativamente menores en el grupo tratado respecto al grupo control (Control: $78,99 \pm 13,33$ ng/ml; DAPT: $42,40 \pm 8,34$ ng/ml; $*p < 0,05$, n= 5-6).

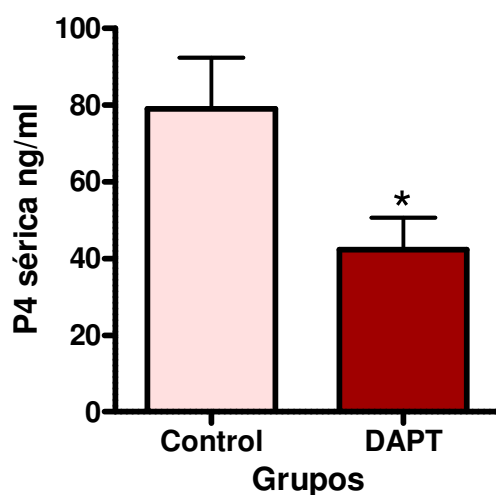


Figura 18: Niveles de P4 sérica

La inyección local de DAPT a ratas preñadas en el día 19 de gestación disminuyó los niveles séricos de P4 a las 24 horas del tratamiento. Las barras representan la media \pm ESM
 $*p < 0,05$ n= 5-6

3.3. La fragmentación nuclear del ADN

El siguiente objetivo fue determinar si la administración local de DAPT tiene un efecto sobre la fragmentación nuclear en las células del CL.

Se aisló el ADN de los CLs extraídos de las ratas tratadas con DAPT y del grupo Control y se midió la fragmentación apoptótica mediante una separación electroforética en geles de agarosa. Como se muestra en la figura 19, no se observaron diferencias entre ambos grupos (Control, $232,8 \pm 20,88$; DAPT, $182,2 \pm 18,47$; $p > 0,05$, $n = 5-6$).

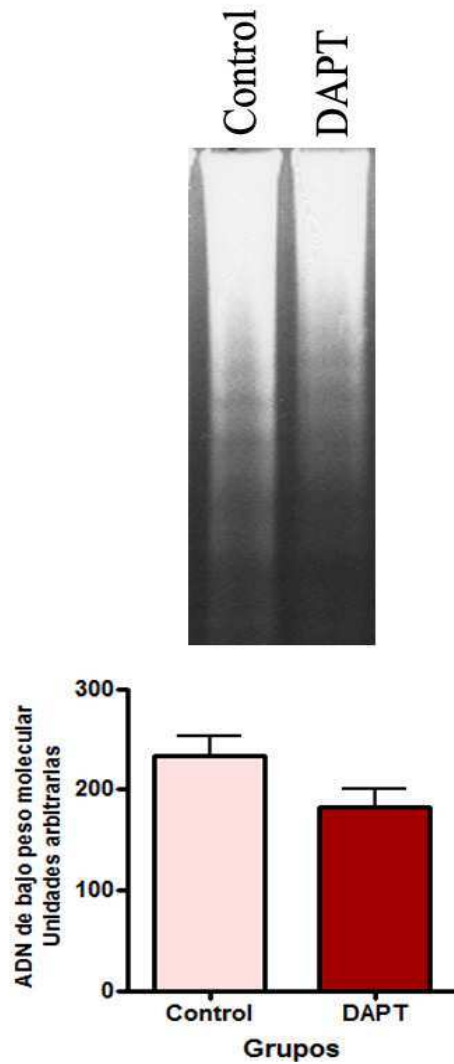


Figura 19: Efecto *in vivo* de la administración de DAPT sobre la fragmentación de ADN en CLs aislados

Panel superior: gel de agarosa representativo que muestra la fragmentación del ADN.

Panel inferior: estimación cuantitativa del clivado del ADN. Se examinó el ADN de bajo peso molecular de cada gel para calcular la fragmentación del ADN. Las barras representan la media \pm ESM $p > 0,05$ $n = 5-6$

3.4. La expresión de proteínas pro y anti-apoptóticas

3.4.a. Niveles proteicos del fragmento activo de caspasa-3

El análisis por western blot de caspasa-3 activa usando un anticuerpo específico, detectó un incremento significativo en los niveles del fragmento activo (peso molecular de 17 kDa) luego de la inyección de DAPT. (Control, $2,15 \pm 0,31$; DAPT, $3,44 \pm 0,35$; $p < 0,05$, $n=5-6$). (Figura 20). No se observaron diferencias significativas en los niveles de la pro caspasa-3.

Mediante IHQ se estudió la expresión de caspasa-3 en cortes de ovario de ratas DAPT y Control. Se observó que las células luteales de las ratas tratadas presentaron marca más intensa que el grupo Control. Además, dicha marca fue localizada en los núcleos de las células luteales de los cortes del grupo DAPT, coincidiendo con el hecho que caspasa-3 una vez activada se transloca al núcleo [244]. (Figura 21A y B).

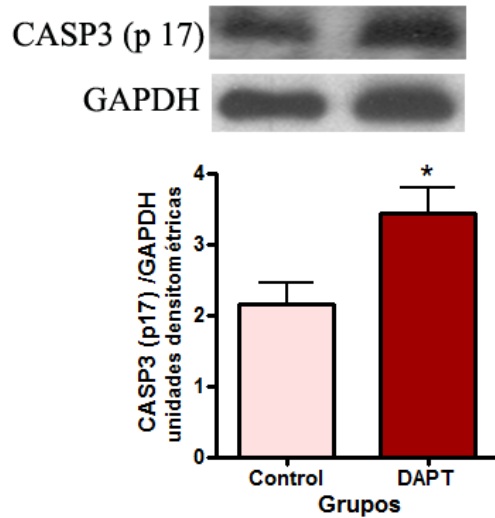


Figura 20: Efecto del tratamiento con DAPT sobre el contenido del fragmento activo p17 de la caspasa-3

Panel superior: Inmunoblot representativo del contenido de la proteína caspasa-3 en CLs provenientes de ovarios control y tratados con DAPT.

Panel inferior: Cuantificación densitométrica del contenido luteal del fragmento p17 de la caspasa-3. Los datos se muestran como la media \pm ESM normalizados a GAPDH. * $p < 0,05$; $n = 5-6$.

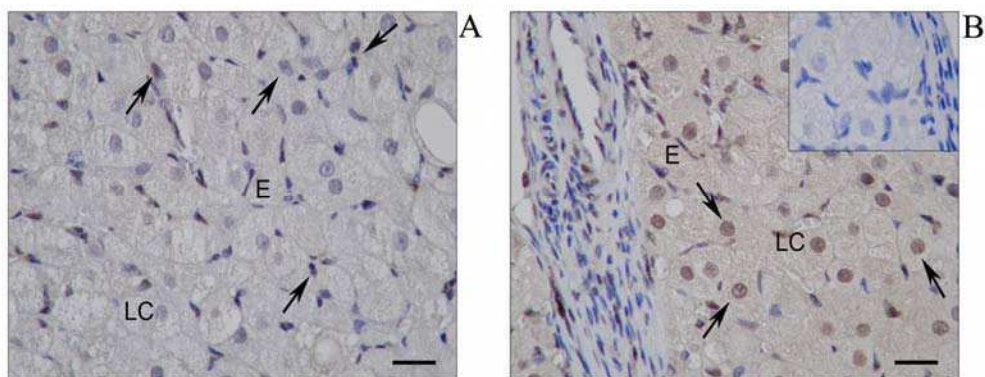


Figura 21: Inmunohistoquímica de caspasa-3 en ovarios control y tratados con DAPT.

Fotografías de un corte de ovario control (A) y tratado (B) con DAPT donde se observa un aumento de la inmunomarcación para esta proteína.

Inserto en B: control negativo en ausencia del anticuerpo primario. Las flechas indican presencia de marcación positiva en los núcleos. E: células endoteliales, LC: células luteales. La barra negra corresponde a 20 μm en ambas fotografías.

3.4.b. Niveles proteicos de BAX y BCL2

Se estudiaron además algunos de los mecanismos involucrados en el aumento de la apoptosis en células luteales tras la administración del DAPT.

Para ello, se determinaron mediante western blot los niveles de la proteína proapoptótica BAX y de la antiapoptótica BCL2, ambas involucradas en la apoptosis del ovario [245;246].

La inyección de DAPT a ratas preñadas en el día 19 de la gestación incrementó significativamente la expresión de BAX (Control, $1,20 \pm 0,08$; DAPT, $1,86 \pm 0,20$; $p < 0,05$, $n=5-6$) y disminuyó considerablemente los niveles de BCL2 (Control, $1,70 \pm 0,11$; DAPT, $1,05 \pm 0,17$; $p < 0,05$, $n=5-6$) relativos al grupo control (Figura 22).

Consecuentemente la relación BAX: BCL2 se vio significativamente aumentada en los CL obtenidos del grupo DAPT $p < 0,05$. (Figura 22).

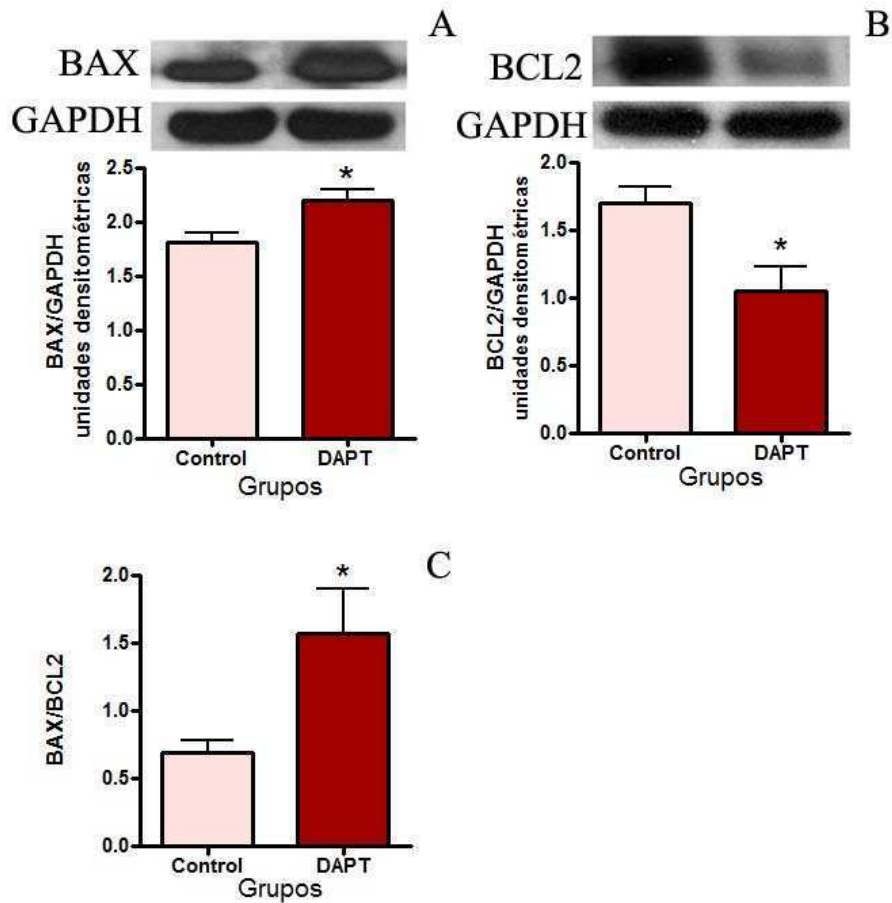


Figura 22: Efecto del tratamiento con un inhibidor de γ -secretasa DAPT sobre el contenido de las proteínas pro apoptótica BAX y antiapoptótica BCL2 en CL de ratas preñadas.

A: Panel superior: inmunoblot representativo del contenido de la proteína proapoptótica BAX en CLs provenientes de ovarios control y tratados con DAPT.

Panel inferior: Cuantificación densitométrica del contenido luteal de BAX. Los datos se muestran como la media \pm ESM normalizados a GAPDH. * $p < 0,05$; $n = 5-6$.

B: Panel superior: inmunoblot representativo del contenido de la proteína antiapoptótica BCL2 en CLs provenientes de ovarios control y tratados con DAPT.

Panel inferior: Cuantificación densitométrica del contenido luteal de BCL2. Los datos se muestran como la media \pm ESM normalizados a GAPDH. * $p < 0,05$; $n = 5-6$.

C: Relación BAX: BCL2 en CLs de ratas control y tratadas con DAPT. * $p < 0,05$; $n = 5-6$.

4. Efecto *in vitro* de la inhibición de la síntesis de P4 luteal y de la vía de Notch en cultivo de CLs sobre:

4.1. La esteroidogénesis luteal

Primeramente se evaluó la funcionalidad luteal midiendo los niveles de P4 en los medios condicionados mediante la técnica de RIA, para verificar si la dosis de los inhibidores utilizada *in vitro* era eficiente en el bloqueo de la síntesis de P4.

Se cultivaron CL de preñez aislados en presencia de aminoglutetimida (AG) (inhibidor del citocromo P450_{scc} 0,15 mM), DAPT (inhibidor de la γ -secretasa 20 μ M) y de ambos inhibidores juntos (AG 0,15 mM + DAPT 20 μ M).

El tratamiento con AG disminuyó considerablemente el contenido de P4 en el medio de cultivo respecto al grupo control (C). Además el tratamiento *in vitro* con DAPT disminuyó el contenido de P4 luteal, hecho que corrobora lo observado anteriormente en el modelo *in vivo*.

El cultivo de CL en presencia de ambos inhibidores no potenció el efecto individual de cada uno de ellos. Los resultados se expresan en veces de cambio respecto al control. (C, $1,00 \pm 0,00$; AG $0,29 \pm 0,07$; DAPT, $0,54 \pm 0,13$; AG+DAPT $0,31 \pm 0,11$) $p < 0,001$. (Figura 23).

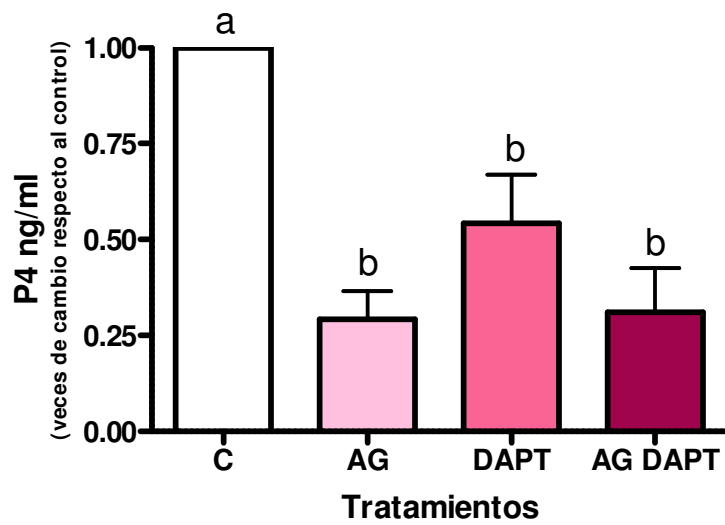


Figura 23: Niveles de P4 en los medios condicionados

Los CL fueron cultivados con o sin (control) AG (0,15 mM) y DAPT (20 μ M) Los valores de P4 de cada tratamiento fueron relativizados al valor de P4 del pocillo control (C) de cada rata para evitar variaciones por diferencias individuales de cada animal.

Los valores se expresaron como la media \pm ESM. Las letras distintas corresponden a diferencias significativas entre los valores: a versus b = $p < 0,001$.

4.2. Los niveles proteicos de los NICD de Notch1, Notch4 y del factor de transcripción Hes1

Para inhibir la síntesis de P4 se cultivaron CLs aislados de preñez en presencia de AG, DAPT, y ambos inhibidores juntos durante 4 horas y se midió mediante Western Blot el contenido proteico del NICD de los receptores Notch1 y 4. El tratamiento de los CL con AG disminuyó significativamente el contenido proteico del NICD de Notch1 respecto al grupo control. Cuando los CL fueron incubados en presencia de DAPT, los niveles del NICD de Notch1 decrecieron considerablemente, efecto que fue visto anteriormente con la inhibición de la vía de Notch *in vivo*. No obstante el uso de ambos inhibidores juntos no potenció los efectos individuales de cada uno de ellos (C, $1,00 \pm 0,00$; AG $0,59 \pm 0,14$; DAPT, $0,48 \pm 0,12$; AG+DAPT $0,66 \pm 0,06$) $p < 0,05$. (Figura 24A). No se evidenciaron diferencias ni para el NICD de Notch4 ni para Hes1 con ninguno de los tratamientos. (Figura 24B y 25).

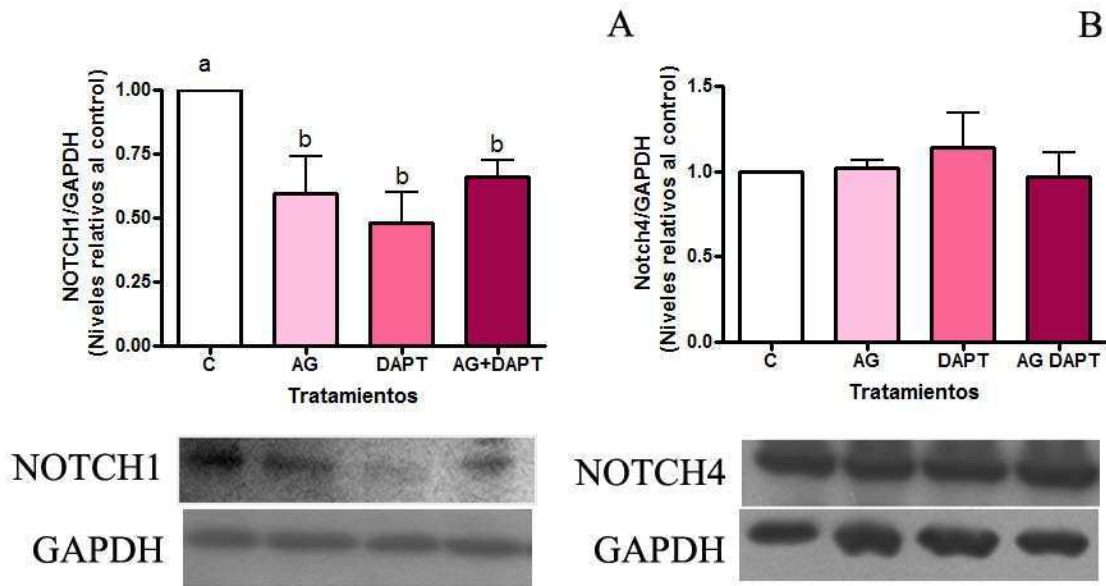


Figura 24: Efecto de la inhibición de la síntesis de P4 sobre los niveles proteicos del NICD de Notch1 y Notch4

Los CLs fueron cultivados en presencia de AG (0,15 mM), DAPT (20µM) y de ambos inhibidores juntos.

A) Panel superior: Cuantificación densitométrica del contenido de NICD de Notch1. Los niveles del NICD de Notch1 disminuyeron significativamente luego del tratamiento con AG, DAPT y ambos inhibidores juntos respecto al grupo control. Las barras representan la media ± ESM normalizado a GAPDH, las letras distintas corresponden a diferencias significativas entre los valores (n=5; p< 0,05).

Panel inferior: Inmunoblot del NICD del receptor Notch1 de CLs *in vitro* en presencia de los inhibidores.

B) Panel superior: Cuantificación densitométrica del contenido de NICD de Notch4. No se observaron diferencias entre el grupo control (C) y con los inhibidores (AG, DAPT y AG+DAPT). Las barras representan la media ± ESM normalizado a GAPDH (n=5-6; p> 0,05).

Panel inferior: Inmunoblot del NICD del receptor Notch4 en CLs cultivados *in vitro* en presencia de los inhibidores.

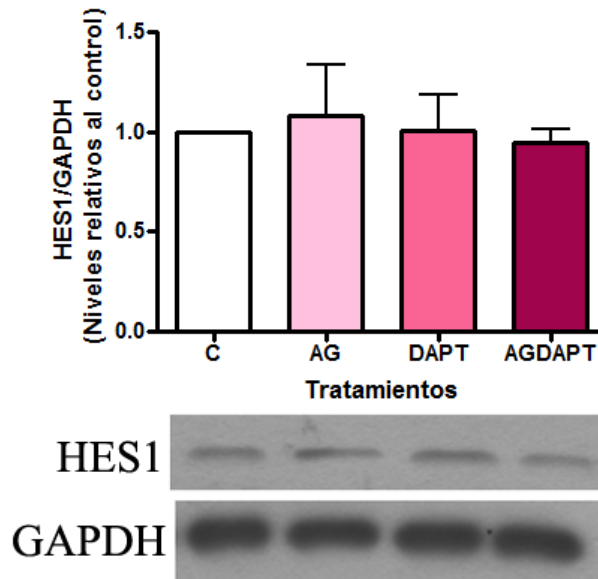


Figura 25: Efecto de la inhibición de la síntesis de P4 y de la vía de Notch sobre los niveles proteicos del factor de transcripción Hes1.

Panel superior: Cuantificación densitométrica del contenido Hes1. Las barras representan la media \pm ESM normalizado a GAPDH (n=5; *p>0,05).

Panel inferior: Inmunoblot de Hes1 de CLs *in vitro* en presencia de los inhibidores.

4.3. Los niveles proteicos de ERK y AKT fosforilados

Para inhibir la síntesis de P4 se cultivaron CLs aislados de preñez en presencia de AG, DAPT y ambos inhibidores juntos durante 4 horas. Se midió mediante WESTERN BLOT el contenido proteico de pAKT y pERK relativos a las formas no fosforiladas de dichas proteínas.

La fosforilación de ERK fue disminuida con al agregado de AG al medio de cultivo, sin embargo el tratamiento de los CLs con DAPT no tuvo el mismo efecto. (Figura 26A)

Con respecto a la fosforilación de AKT (usando un anticuerpo monoclonal que reconoce el sitio de fosforilación de AKT en la serina 473) el tratamiento tanto con AG como con DAPT disminuyó significativamente el grado de fosforilación de esta proteína. (Figura 26B)

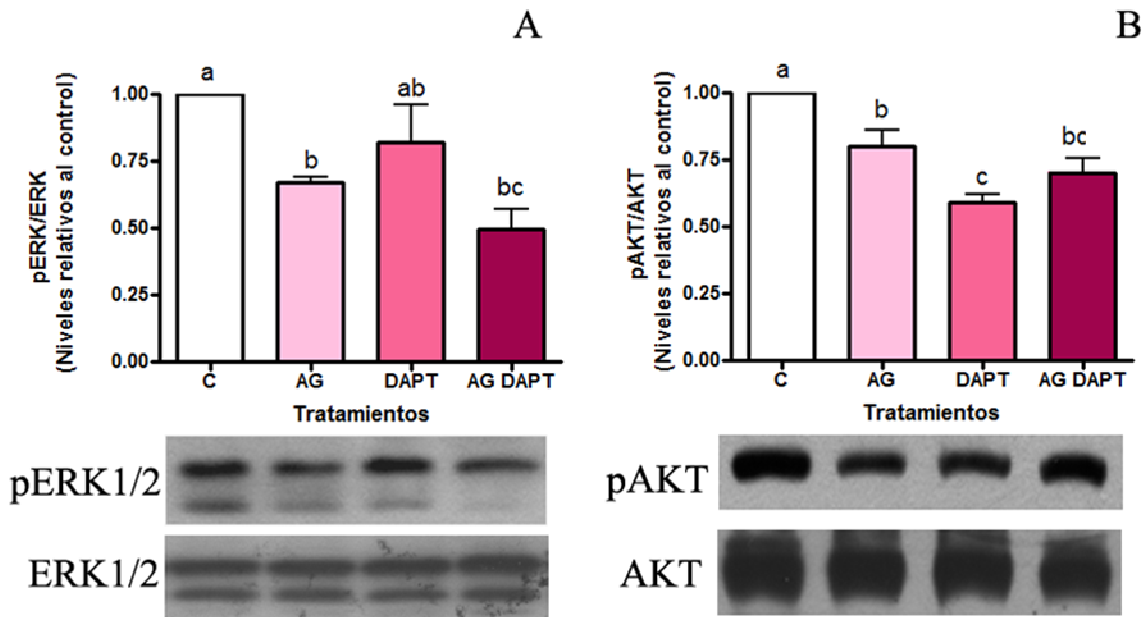


Figura 26: Efecto de la inhibición de la síntesis de P4 y de la vía de Notch sobre los niveles de pAKT y pERK1/2.

Los CL fueron cultivados en presencia de AG (0,15 mM), DAPT (20µM) y de ambos inhibidores juntos

A) Panel superior: Cuantificación densitométrica del contenido de pERK/ERK. Los niveles disminuyeron significativamente luego del tratamiento con AG y ambos inhibidores juntos, pero no se evidenciaron cambios con el agregado de DAPT solo respecto al control. El agregado de ambos inhibidores tuvo un efecto similar a AG solo. Las barras representan la media ± ESM, las letras distintas corresponden a diferencias significativas entre los valores (n=5; p< 0,05).

Panel inferior: Inmunoblot de pERK/ERK de CLs *in vitro* en presencia de los inhibidores.

B) Panel superior: Cuantificación densitométrica del contenido de pAKT/AKT. Los niveles disminuyeron significativamente luego del tratamiento con AG, DAPT y ambos inhibidores juntos respecto al grupo control. Las barras representan la media ± ESM, las letras distintas corresponden a diferencias significativas entre los valores (n=5; p< 0,05).

Panel inferior: Inmunoblot de pAKT/AKT de CLs *in vitro* en presencia de los inhibidores.

Discusión

1. Rol de S1P en el CL de preñez

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 para el éxito de la misma. La concentración plasmática de P4 alcanza un máximo alrededor del día 16 de gestación y cae precipitadamente antes del parto, siendo este evento indispensable para que ocurra el nacimiento de las crías. En esta primera parte de la tesis decidimos estudiar el efecto de la administración local de S1P previo a una dosis de la hormona luteolítica $PGF2\alpha$ sobre la funcionalidad y la apoptosis del CL de preñez.

En el CL de preñez la muerte celular por apoptosis alcanza valores máximos hacia los días 3-4 pos parto [247-249]. Los niveles de expresión de efectores de muerte celular como el $TNF-\alpha$, Fas L [250;251] y las actividades de las caspasas iniciadoras -2, -7, -9 y efectora -3 [94;139] son sustancialmente elevadas antes del parto observándose luego una ligera disminución en el posparto (día 1 a 3) en ratas.

En la presente tesis se demostró que la actividad de las caspasas-2, -3 y -8 fueron significativamente mayores 4 horas después de la administración de la $PGF2\alpha$, sin embargo la caspasa-9 se mostró sin cambios. Si bien varios estudios demuestran la presencia de componentes de la vía extrínseca en las células luteales [140;162;251;252], hay estudios que apoyan la participación de la vía intrínseca en la muerte celular luteínica [253;254]. La caspasa-2 puede ser el punto de unión entre ambas vías de la apoptosis a través del clivaje de uno de los miembros de la familia Bcl-2; BID [255]. Yadav y col. (2005) demostraron que la administración local a ratas pseudopreñadas de inhibidores específicos de caspasas, corriente abajo de la vía de señalización intrínseca y extrínseca de la apoptosis, produce una mayor activación de la vía extrínseca de señalización en la mediación de la apoptosis en el tejido luteal luego del tratamiento con $PGF2\alpha$ [140].

La dinámica observada en la actividad de las caspasas estudiadas puede ser debida al tiempo, a la dosis de $PGF2\alpha$ o a la administración de la misma, dada la naturaleza pulsátil de la secreción de esta hormona. Por lo tanto, la regresión luteal fisiológica puede implicar la cooperación de ambas vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis.

S1P es un esfingolípido bioactivo formado a partir de la esfingosina por la enzima esfingosina quinasa. S1P está implicado en muchos procesos biológicos y es conocido por

ser un agente antiapoptótico [256-258]. La ceramida se puede metabolizar a S1P y, en algunos tipos celulares, el equilibrio dinámico del S1P y la ceramida, actúa como un “reóstato celular” el cual determina el destino celular [257]. Otros trabajos demostraron que S1P es capaz de inhibir la activación de las caspasas efectoras (caspasa-3, -6 y -7) en células humanas de leucemia, contrarrestando la liberación de proteínas mitocondriales (citocromo c, Smac/DIABLO) inducida por diferentes factores entre los que se encuentran: el anticuerpo monoclonal de Fas, la privación de suero, o la administración de ceramida exógena [259].

En nuestro modelo experimental, el tratamiento local con S1P en ratas preñadas en el día 19 de la gestación 2 horas antes de la PGF2 α pudo revertir, al menos en parte, el aumento en la actividad de las caspasas-2, -3 y -8 inducido por PGF2 α , tendiendo a proteger al CL de la acción de estas caspasas. El número de células apoptóticas aumentó significativamente luego de la administración de PGF2 α llegando a un porcentaje máximo de alrededor del 3%. Si bien este número parece ser bajo, se encuentra dentro de los parámetros encontrados en la literatura, donde en el CL de preñez luego del parto (día 3 o 4 posparto) el número de células apoptóticas reactivas a TUNEL oscilaron entre un 0,5% [94;249] y un 5% [139].

De forma coincidente con el resultado obtenido en la actividad de las caspasas, la administración local de S1P disminuyó de forma significativa el porcentaje de células apoptóticas inducido por PGF2 α .

Teniendo en cuenta estos datos y los trabajos que indican la presencia de muerte celular por autofagia (muerte celular no apoptótica) durante la regresión luteal en monos y humanos, no podemos descartar que otro tipo de muerte celular esté involucrada en este proceso en ratas. Recientemente Choi y col. (2011) demostraron en ratas pseudopreñadas que la autofagia celular está directamente involucrada en la regresión del CL. Esta se correlaciona con un aumento en la apoptosis dada por la acumulación de autofagosomas, que inducen muerte celular mediada por un aumento en la relación de BAX/BCL2, seguido esto por la activación de las caspasas [260].

De manera inesperada el tratamiento con PGF2 α en el día 19 de gestación casi neutralizó la expresión luteal de TNF- α a las 4 horas de la inyección. En cambio la administración de S1P incrementó su expresión. Como se mencionó en la introducción, si bien el TNF- α es

conocido por sus efectos en la luteólisis, hay evidencias que sugieren que el aumento en las concentraciones de TNF- α promueve también la supervivencia luteal [154;155]. Este resultado difiere de los obtenidos por Henkes y col. (2008) donde el tratamiento con PGF2 α produce un aumento significativo de TNF- α durante la regresión del CL en ratonas pseudopreñadas [163]. Estas diferencias pueden deberse a los distintos modelos experimentales o a los protocolos de inyección de la PGF2 α .

Es importante tener en cuenta que la unión de TNF- α a su receptor puede desencadenar supervivencia celular mediada por la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B) [261-263]. Asimismo S1P puede estimular varios factores de transcripción que han sido implicados en la regulación del crecimiento celular y la protección contra la apoptosis [264]. Además, puede haber una estrecha relación entre el TNF- α y los receptores de S1P [258]. En consecuencia, en nuestro modelo de luteólisis inducida por PGF2 α en ratas preñadas, S1P puede estimular su propia síntesis y la supervivencia celular por la estimulación de la expresión de TNF- α , y la posible activación de NF- κ B. Como se explicó ampliamente en la introducción, TNF- α se expresa sobre todo en los monocitos y macrófagos, pero también se encuentra en el las células endoteliales del CL [265;266]. Curiosamente, las células inmunes, así como las citoquinas producidas por ellas, desempeñan un papel fundamental en la regulación de la funcionalidad del CL en roedores, bovinos y primates [164;267;268].

S1P desempeña un rol clave como segundo mensajero. La estimulación de diferentes receptores de la membrana plasmática, como por ejemplo el receptor del factor crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-R) y el receptor de TNF- α (TNFR) desencadenan la rápida producción de S1P través de la activación SphK. Por otra parte, en un modelo de artritis reumatoidea, ratones que recibieron RNA de interferencia (siRNA) de SphK1 redujeron significativamente los niveles séricos de citoquinas pro-inflamatorias entre las que se encuentra TNF- α [269].

Alvarez y col. (2010) concluyeron que S1P actúa como cofactor para TRAF2 (factor asociado al receptor de TNF2). Estos resultados también ponen en relieve el rol clave de SphK1 y su producto S1P, en la señalización de TNF- α y en la vía de activación canónica de NF- κ B importante en procesos inflamatorios, anti-apoptóticos, e inmunes [270].

Akt es uno de los principales blancos de la PI3K. Cuando el dominio homólogo a pleckstrina (PH) de Akt interacciona con [PI(3,4,)P2] o PI(3,4,5,)P3, Akt se transloca del citoplasma a la superficie interna de la membrana plasmática donde es fosforilada y en consecuencia, activada [271]. Akt regula una amplia gama de sustratos para modular la utilización de las reservas de energía celular, regular la transcripción, e inhibir la actividad de las proteínas pro-apoptóticas [272]. La idea de que la señalización PI3K contribuye al mantenimiento de la función luteal se basa en un trabajo que muestra que la pérdida ovario específica (knockout condicionados) de la enzima fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) resulta en un aumento en la fertilidad de las ratonas y en ovarios aumentados de tamaño que contienen CLs con una mayor vida útil [272;273].

En este capítulo investigamos si PGF2 α ejerce su acción luteolítica y promueve la apoptosis regulando esta vía. El tratamiento con PGF2 α en el día 19 de la gestación disminuyó significativamente los niveles de la forma fosforilada de AKT en Serina 473, resultado que coincide con lo publicado posteriormente por Arvisais y col. (2010) donde el tratamiento *in vivo* a vacas con PGF2 α disminuyó la fosforilación luteal de AKT tanto en Serina 473 como en Treonina 308 [272]. La administración de S1P 2 horas antes de la PGF2 α revirtió de manera efectiva este efecto. Estos resultados sugieren que la vía de señalización de PI3K/Akt es inhibida por PGF2 α en el CL de ratas preñadas y que S1P fue capaz de restablecer la señalización de PI3K/Akt, resultado que coincide con lo observado en hepatocitos humanos, donde se demostró que la administración exógena de S1P fue capaz de activar Akt y rescatar a las células de la apoptosis [274].

Varios trabajos han demostrado la activación o la inhibición de distintos subgrupos de MAPKs en respuesta a gonadotrofinas o a PGF2 α en células luteales de diferentes especies, tanto *in vivo* como *in vitro*, sugiriendo que las MAPKs regulan la función del CL [275].

El S1P administrado localmente previo a la PGF2 α aumentó los niveles de fosforilación de ERK1/2. Además, en el grupo tratado sólo con PGF2 α , se observó una tendencia a aumentar la fosforilación de esta proteína respecto al control.

Tai y col. (2001) demostraron que la vía de MAPK media el efecto inhibitorio de la PGF2 α sobre la producción de P4 inducida por hCG en células granulosa-luteínicas humanas (hGLCs). Estas observaciones apoyan la idea de que una gran variedad de ligandos,

incluyendo a hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento, son capaces de activar MAPK y que las células pueden contener varias cascadas de señalización de MAPKs reguladas de manera independiente. La activación de la vía de señalización de MAPK en hGLCs se debe a la unión de la $\text{PGF2}\alpha$ a su receptor (acoplado a la proteína Gq) que posteriormente lleva la activación de PLC, PKC, Raf/MAPK. Además, en este tipo celular, la inhibición de MAPK invierte el efecto de la $\text{PGF2}\alpha$ sobre la producción de P4 sugiriendo que la cascada de MAPK es una parte integral de la transducción de señales de $\text{PGF2}\alpha$ [276]. Los cambios rápidos en los eventos de fosforilación se encuentran entre los primeros sucesos que median la regresión del CL inducida por $\text{PGF2}\alpha$ [272].

A su vez en células de músculo liso de ratas (VSMCs) S1P estimula la fosforilación de p42/p44 MAPK y Akt, además, dicha fosforilación se atenúa por los inhibidores de ambas vías [277].

La ME permite la visualización de las modificaciones ultra estructurales finas que acompañan la muerte celular, incluyendo los espacios en la membrana plasmática y/o en la membrana mitocondrial externa, tumefacción mitocondrial y las primeras fases de condensación de la cromatina (que más tarde se hacen visibles al microscopio óptico) [278]. Mediante esta técnica investigamos si los parámetros ultra estructurales del CL fueron alterados por la administración sistémica de $\text{PGF2}\alpha$ o el tratamiento localizado con S1P. El análisis por ME, reveló que la mayoría de las células en el día 19 de la gestación presentaron núcleos normales, abundantes gotas lipídicas y pocos indicios de muerte celular. Como era de esperar, $\text{PGF2}\alpha$ incrementó las células luteales con avanzados signos de la apoptosis (es decir, que contienen fragmentación nuclear, condensación de la cromatina, o cuerpos apoptóticos) a las 36 horas de la inyección. Este procedimiento fue realizado también a las 4 horas pero no se observaron las modificaciones ultra estructurales vistas a las 36 horas. El tratamiento con S1P, fue capaz de proteger a las células del CL de las modificaciones morfológicas vistas en el grupo tratado sólo con $\text{PGF2}\alpha$ y la mayoría de las células presentaron núcleos saludables. En el momento de examinar los cortes por ME nos centramos en la búsqueda de cambios apoptóticos, por lo tanto no fueron tenidas en cuenta características celulares de otro tipo de muerte celular. La marcada aparición de vacuolas citoplasmáticas en el CL de la preñez (CLP) en regresión sugiere la posible participación de autofagia, una forma diferente de la muerte celular [279] que puede

contribuir a la involución del CL. Las gotas de lípidos se acumulan en los CL esteroidegenicamente inactivos de ratas [280] y yeguas [281]. La regresión de las células esteroideogénicas puede experimentar un metabolismo anormal de lípidos, incluyendo al colesterol y a los fosfolípidos de membrana.

Al examinar los cortes, encontramos un aumento en la densidad vascular en el grupo tratado con S1P. Es importante señalar que además de los efectos antiapoptóticos, S1P es también un potente factor angiogénico comparable al FGF-2 y al VEGF en la promoción del crecimiento de los vasos. S1P actúa sinérgicamente con los factores mencionados y promueve el desarrollo de redes vasculares *in vivo* [192;282;283]. Tanto el tono del flujo sanguíneo luteal como el grado de vascularización, se correlacionan positivamente con la actividad esteroideogénica en el CL de preñez [284]. Estudios en CL de bovinos, en los que los análisis morfométricos son más fáciles de aplicar, demostraron que la PGF2 α induce disminución en el volumen de CL correlacionado con una disminución del flujo sanguíneo luteal [285].

Para corroborar lo observado por ME decidimos realizar una IHQ utilizando un marcador específico de células endoteliales en cortes de ovarios de los diferentes grupos. El tratamiento con PGF2 α disminuyó la expresión de la proteína PECAM-1 en CL, asociándose dicho resultado a una disminución en el área vascular.

Es sabido que la supervivencia de las células luteales depende de una red capilar que se encuentre en pleno funcionamiento. Como se mencionó anteriormente, uno de los factores más importantes que regulan la formación de nuevos capilares, la supervivencia y la permeabilidad del endotelio es el VEGF. En trabajos en CL bovino se demostró que VEGF disminuye a los 30 min y el ARNm de VEGF comienza a disminuir a las 12 horas de la administración de PGF2 α . Esta rápida disminución del VEGF es causada por el efecto agudo de la PGF2 α sobre las células endoteliales [286]. Estas observaciones podrían explicar nuestras observaciones.

El tratamiento con S1P no solo fue capaz de prevenir la disminución en el área de células endoteliales, sino que además se vio aumentada como se observa en las fotografías de la inmunomarcación de PECAM-1, sugiriendo que la supervivencia de las células endoteliales puede ser una de las consecuencias del tratamiento con S1P, esto se apoya en el hecho que

los receptores de S1P se expresan en las células del endotelio vascular [190;287-289]. Por lo tanto, el bloqueo de la luteólisis por S1P puede ser debido a la estimulación de la angiogénesis, inhibición de la apoptosis luteal, o una combinación de ambos. Se necesitan más estudios para dilucidar la relevancia de los cambios observados en el vasculatura del CL después del tratamiento con S1P.

Las mediciones del contenido de P4 luteal refleja los cambios ultra estructurales observados por ME, dado que la administración de PGF2 α a ratas preñadas disminuyó rápidamente el contenido de P4 luteal. El tratamiento con S1P pudo recuperar la capacidad esteroidogénica del CL sólo a las 36 horas del tratamiento. A su vez, se sabe que la disminución de la capacidad celular para producir P4, es capaz de inducir muerte en células luteales [290]. En vista de los resultados obtenidos podemos decir que la luteólisis funcional comienza después de 4 horas de la administración de la PGF2 α , involucrando cambios en la actividad esteroidogénica que solo puede ser revertido luego de una exposición prolongada al S1P.

En resumen, los resultados presentados demuestran, por primera vez, que la administración local de S1P bloquea con eficacia la acción luteolítica de PGF2 α en ratas preñadas mediante la disminución de la actividad de las caspasas -2, -3 y -8, el aumento de las formas fosforiladas de AKT y ERK, el incremento en los niveles de TNF- α y en el área vascular.

2. Rol de la vía de señalización de Notch en el CL

La segunda parte de esta tesis fue diseñada para estudiar si la vía de señalización de Notch desempeña un rol clave en el CL de preñez y en la luteólisis en ratas preñadas. Anteriormente, Johnson y col. (2001) describieron la localización por IHQ de los receptores NOTCH2 y 3 y el ligando JAG2 en las células de la granulosa durante el desarrollo folicular en ovarios de ratón, sugiriendo que la vía de señalización de Notch está implicada en la regulación de la foliculogénesis [238]. Además, la supresión de la señalización de Notch por inhibidores de la γ -secretasa en el ovario de ratón neonatal disminuyó la formación de folículos primordiales [239]. Los patrones de expresión de NOTCH1, NOTCH4 y JAG1 también se caracterizaron durante la foliculogénesis y la formación del CL en ovarios de ratón, demostrando que se expresan en los vasos sanguíneos del ovario; en las células endoteliales y en células asociadas a la vasculatura [291].

Por análisis inmunohistoquímico en esta tesis se demostró que DLL4 se localiza en la membrana citoplasmática de las células luteales, presentando también marca difusa en el citoplasma. Los receptores Notch1 y 4 mostraron localización en el citoplasma y en el núcleo de las células luteales, probablemente como resultado de la activación in situ del sistema Notch, coincidiendo con el hecho que cuando esta vía se activa, el dominio intracelular de Notch (NICD) se transloca al núcleo donde regula la transcripción de genes blanco.

Ambos receptores y el ligando se localizaron igualmente en los vasos sanguíneos del CL. Por tanto describimos por primera vez la localización de los receptores NOTCH1 y 4 y el ligando DLL4 en el ovario de ratas gestantes.

Inmediatamente decidimos evaluar la expresión de los mismos a lo largo de la gestación y el posparto del CL de ratas. Si bien se observó una tendencia a incrementar la expresión de los ARNm en la mitad de la gestación y a disminuir en el posparto, sólo se encontró diferencia significativa en los niveles de Notch4 en el posparto. Sugiriendo que los componentes de la vía de Notch acompañan el desarrollo funcional del CL durante la preñez. Para determinar si la expresión de miembros de la familia Notch cambia durante la luteólisis inducida, estudiamos la expresión del ARNm y los niveles proteicos del NICD de Notch1, 4 y Dll4 en CLs aislados a las 4 y 24 horas de la administración de PGF2 α . La

expresión del ARNm del ligando Dll4 y los receptores Notch1 y 4 disminuyeron significativamente a las 4 horas de la administración de PGF2 α . No obstante, 24 horas después, la disminución de los ARNm fue revertida, observándose un aumento del mensajero de Dll4 en el grupo tratado con PGF2 α .

En forma semejante a los resultados obtenidos por PCR en tiempo real, los niveles proteicos de los NICD de los receptores también disminuyeron a las 4 horas, no detectándose diferencias para el ligando DLL4. De forma semejante al ARNm a las 24 horas, el contenido proteico del ligando DLL4 aumentó considerablemente, no evidenciándose diferencias en el contenido proteico de los receptores.

Esta diferencia de tiempo podría ser explicada por la principal vía de señalización de PGF2 α , que al interactuar con su receptor activa la vía de PKC que es un mecanismo de transducción rápido [45]. Por lo tanto, el cambio transitorio en la expresión de Dll4/Notch puede estar relacionado con la señalización aguda de PGF2 α en el inicio de los eventos luteolíticos. Por otra parte, el aumento en la expresión del ligando Dll4 a las 24 horas puede vincularse a un intento de compensar la señalización y contrarrestar el efecto luteolítico de la PGF2 α ya desencadenado.

Además, investigamos si Notch tiene un efecto directo sobre la supervivencia de las células luteales. Con este propósito, se inyectó a ratas preñadas en el día 19 un inhibidor de la enzima γ -secretasa, DAPT en ambos ovarios. Como se mencionó en la introducción este compuesto es ampliamente utilizado para inhibir la señalización de Notch una vez que el ligando se ha unido al receptor. Como primera medida, luego del tratamiento con el inhibidor, estudiamos el clivaje de los receptores NOTCH1 y 4, para verificar si la dosis suministrada y el tiempo empleado eran suficientes para inhibir Notch. Sólo los niveles proteicos del NICD de Notch1 disminuyeron significativamente luego de la administración del DAPT. Este resultado sugiere que el receptor NOTCH1 es, de los miembros de la familia estudiados, el más relevante en el CL de preñez.

La medición de P4 sérica o luteal se utiliza ampliamente como parámetro de funcionalidad del CL. En este trabajo se demostró que el inhibidor de la vía de Notch fue capaz de disminuir la P4 en el suero de ratas preñadas confirmando nuestra hipótesis sobre la acción directa de esta vía sobre la función luteal.

Numerosos trabajos han señalado que Notch puede suprimir la muerte celular por apoptosis en distintos tipos celulares [211;292;293]. Además, la activación de Notch previene la apoptosis en líneas celulares de cáncer de mama a través de la activación de la vía de PIK3/AKT [294]. Otro trabajo demostró que el tratamiento de células de insulinoma de ratón (MIN6) y de islotes pancreáticos humanos con DAPT lleva al aumento de caspasa-3 y, por el contrario, la hiperactividad de la γ -secretasa protege de la apoptosis [236].

En este modelo estudiamos la apoptosis en el CL luego del tratamiento con DAPT. Uno de los fenómenos más característicos de la apoptosis es la activación de endonucleasas que conduce a la fragmentación del ADN genómico. De la preparación del ADN de las células apoptóticas y la posterior separación por electroforesis en gel se obtiene un patrón de fragmentos de ADN oligonucleosomal llamado escalera del ADN más conocido como "ladder de ADN", con medidas de aproximadamente 180 pb [295]. La corrida electroforética de ADN en geles de agarosa seguida de la tinción con BrEt es un método para discriminar entre la fragmentación apoptótica internucleosomal de ADN ("ladder") y la necrosis celular, (degradación no específica del ADN que resulta en un "chorreado" de ADN degradado al azar). El objetivo fue determinar si la administración local de este inhibidor tiene un efecto sobre la fragmentación del ADN en las células del CL. Contrariamente a lo esperado, no observamos diferencias significativas entre el grupo control y el tratado con el inhibidor. A pesar del hecho de que esta técnica es menos propensa a falsos positivos que la técnica de TUNEL [278], concluimos que se necesitaría mayor porcentaje de células en apoptosis para poder detectar el "ladder" de ADN apoptótico.

Seguido a esto decidimos estudiar el efecto del DAPT sobre la expresión de proteínas pro y anti-apoptóticas en el CL. Se detectó un incremento significativo en los niveles del fragmento activo de caspasa-3 sin diferencias en los niveles de la procaspasa. Además se estudió mediante IHQ la expresión de esta caspasa en cortes de ovario de ratas control y tratadas con DAPT. Se observó que las células luteales de las ratas tratadas presentaron marca más intensa que el control. Asimismo, dicha marca fue intensamente localizada en los núcleos de las células luteales del grupo DAPT coincidiendo con el hecho que caspasa-3 luego de la activación se transloca al núcleo. Estos resultados se acompañaron por el incremento en la proteína proapoptótica BAX y una disminución en la proteína

antiapoptótica BCL2, consecuentemente la relación entre ambas se vio significativamente aumentada en los CL de ratas tratadas, posicionando al CL de preñez en un perfil apoptótico luego del tratamiento con el inhibidor, sugiriendo que la señalización de Notch cumple un importante rol en la supervivencia de las células luteales y el mantenimiento de la esteroidogénesis en el CL de preñez.

En base a los resultados obtenidos y a los trabajos que señalan que las concentraciones de P4 en las células luteales protege contra la apoptosis del CL, mientras que la interrupción de la esteroidogénesis y la disminución de la capacidad de las células luteales para producir P4 pueden inducir la muerte celular [89;290], el siguiente paso fue estudiar si los cambios que observamos en la expresión luteal de los miembros de la familia Notch, luego de la administración de PGF2 α , están mediados por la disminución de la P4 a nivel local.

En el CL de rata en regresión, los niveles de P4 determinan el destino del CL. La P4 disminuye la expresión de Fas, sugiriendo que P4 puede regular de forma autónoma la muerte celular fisiológica en el CL [89]. En otro trabajo se demostró que la LH, P4, y PGE2 aumentan la expresión del ARNm y de la proteína de StAR, 3- β HSD y P450_{scc} en células luteales bovinas [296].

Nuestros resultados confirmaron que el tratamiento *in vitro* de CLs con AG, inhibidor de la síntesis de P4, disminuye considerablemente el contenido de P4 en el medio de cultivo. Observamos también que el tratamiento con DAPT produce una disminución significativa en el contenido de P4 luteal, fenómeno que reproduce los resultados obtenidos anteriormente en el modelo *in vivo*. Tanto AG como DAPT disminuyeron el contenido proteico del NICD de Notch1, no teniendo efecto ninguno de ellos sobre el NICD de Notch4 y el factor de transcripción HES1. Para comprender el rol de P4 en la vía de señalización de Notch se están llevando a cabo estos experimentos con el agregado de la hormona para corroborar si revierte el efecto de AG sobre los miembros de la familia Notch estudiados.

En los CLs en cultivo, la fosforilación de ERK y AKT fue disminuida por el agregado de AG, sin embargo el cultivo de los CLs con DAPT únicamente disminuyó la fosforilación de AKT.

Se sabe que en células T, Notch1 induce la regulación positiva de la vía PI3K/AKT a través de HES1, a su vez este controla la expresión negativa de PTEN [297]. Por consiguiente nuestros resultados sugieren que en el CL de preñez, Notch podría estar regulando la viabilidad celular a través de AKT.

Proponemos a la vía de señalización de Notch como componente clave en la regulación del CL, por lo tanto; la integridad de su señalización es necesaria para su correcto funcionamiento y supervivencia durante la preñez. Además de los efectos ya conocidos de la $\text{PGF2}\alpha$ sobre el CL, esta hormona actuaría también regulando la vía de señalización de Notch. Sugerimos asimismo la existencia de una interacción entre P4 y la vía de señalización de Notch involucrada en la funcionalidad del CL.

Resumen de los resultados obtenidos



Capítulo I:

Efecto *in vivo* de la administración intraovárica de S1P previo a la inyección de una dosis luteolítica de PGF2 α en ratas preñadas

- ✚ El análisis del CL por ME al día 19 de preñez reveló que la mayoría de las células luteales presentaron aspecto saludable sin indicios de muerte celular. Como se esperaba, con la administración de PGF2 α se evidenciaron células con avanzados signos de muerte celular por apoptosis, mientras que el tratamiento con S1P eficazmente previno dichos cambios, presentando, la mayoría de las células núcleos normales. También en este último grupo se vio un aumento de la densidad vascular, resultado que se corrobora con la inmunomarcación para PECAM-1.

- ✚ La administración de PGF2 α en el día 19 de preñez, aumentó la actividad de las caspasas -8,-2 y -3 a las 4 horas. Sin embargo no se observó un aumento significativo en la actividad de caspasa-9. Sugiriendo que la vía extrínseca de la apoptosis estaría involucrada en la luteólisis inducida por PGF2 α .

- ✚ El tratamiento local con S1P dos horas antes de PGF2 α pudo prevenir el incremento en la actividad de las caspasas -2, -8 y -3 inducido por PGF2 α , observándose dicho efecto en el porcentaje de células apoptóticas que claramente es menor en el grupo tratado con S1P.

- ✚ El contenido de P4 luteal disminuyó luego del tratamiento con PGF2 α , y al igual que los resultados obtenidos por ME, el tratamiento previo con S1P fue capaz de prevenir dichos cambios solo 36 horas luego de la inyección de PGF2 α .

- ✚ Se sabe que las vías de PI3K/AKT y ERK están involucradas en la supervivencia celular y proliferación, los resultados sugieren que la administración de S1P previo

a la PGF2 α fue capaz de activar ambas vías de transducción de señales, protegiendo a las células luteales de la acción luteolítica de la PGF2 α .

- ✚ El tratamiento con SIP aumentó los niveles de TNF- α luteal.

Capítulo II

Expresión de miembros de la familia Notch en ovarios de ratas preñadas

- ✚ El análisis inmunohistoquímico reveló que DLL4 se localiza en la membrana citoplasmática de las células luteales, presentando también marca difusa en el citoplasma.
- ✚ Los receptores NOTCH1 y NOTCH4 mostraron localización en el citoplasma y en el núcleo de las células luteales, probablemente como resultado de la activación *in situ* del sistema Notch.
- ✚ Si bien se observó una tendencia a incrementar la expresión de los ARNm en la mitad de la gestación y a disminuir en el posparto, sólo se encontró significancia entre los niveles del ARNm de Notch4 en el día 4 posparto (4pp) con respecto al día 12 y 21 de gestación.

Expresión de miembros de la familia Notch durante la luteólisis inducida por PGF2 α

- ✚ La administración de PGF2 α a ratas preñadas regula los niveles de algunos miembros de la familia Notch a tiempos cortos, observándose luego una reversión de dicho efecto.

Efecto de la administración local de un inhibidor de la vía de Notch (DAPT) en ratas preñadas

- ✚ La administración de DAPT bloqueó efectivamente el clivaje proteolítico de Notch1 en CL de ratas preñadas.
- ✚ El tratamiento con dicho inhibidor afectó la funcionalidad del CL de preñez, disminuyendo la P4 sérica en las ratas tratadas.
- ✚ Se observó un aumento en el contenido luteal de la principal caspasa efectora, 3 y en la relación entre las proteínas (proapoptótica) BAX y (antiapoptótica) BCL2 en el grupo tratado con DAPT.

Efecto *in vitro* de la inhibición de la síntesis de P4 luteal y de la vía de Notch en cultivo de CLs

- ✚ El bloqueo de la síntesis de P4 a nivel luteal disminuyó, como esperábamos, la producción de P4 *in vitro*.
- ✚ La inclusión de DAPT en el medio de cultivo, disminuyó el contenido de P4 en los medios condicionados.
- ✚ La inhibición de la síntesis de P4 disminuyó el contenido proteico del NICD de Notch1 en CL, no así el de Notch4, sugiriendo que Notch1 es el principal miembro de esta familia involucrado en la funcionalidad del CL en ratas.

✚ El bloqueo de la síntesis de P4 disminuyó la fosforilación de ERK y AKT. El tratamiento de los CLs con DAPT sólo disminuyó la fosforilación de AKT.

Conclusión general

Con este trabajo, concluimos en el primer capítulo que la administración *in vivo* de S1P bloquea con eficacia la acción luteolítica de la PGF2 α en ratas preñadas disminuyendo la actividad de las caspasas -2, -3 y -8, aumentando la fosforilación de AKT y ERK, incrementando los niveles de TNF- α y el área vascular. El estudio de agentes que rescaten al CL de la luteólisis como el S1P podría contribuir al desarrollo de terapias para el tratamiento de patologías reproductivas, como los trastornos relacionados con la secreción inadecuada de P4 por el CL: fase lútea inadecuada (LPD), CL persistente y como se mencionó en la introducción, el uso de S1P como terapia preventiva de los daños causados en el ovario por terapias antitumorales. En el segundo capítulo demostramos que NOTCH1, NOTCH4, y el ligando DLL4 se expresan en el CL de ratas preñadas y que la PGF2 α disminuye su expresión. Además, la inhibición de NOTCH en CL de ratas preñadas disminuye los niveles circulantes de P4 y posiciona al CL de preñez en un perfil apoptótico. Estos resultados sostienen el rol de la señalización de Notch como promotor tanto de la viabilidad celular como de la esteroidogénesis del CL, e indican que la PGF2 α podría actuar, reduciendo directamente la expresión de algunos miembros de este sistema en el CL y que además la disminución en la síntesis de P4 puede contribuir a la luteólisis reduciendo la expresión de NOTCH1 y la vía de AKT y ERK.

Bibliografía



- [1] Thibault C, Levasseur M-C, Hunter RHF. *Reproduction in Mammals and Man*, English revised edition ed. 1993.
- [2] McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr. Rev.* 2000; 21: 200-214.
- [3] Maekawa A. Pathology of tumours in laboratory animals. *Tumours of the rat. Tumours of the ovary.* IARC Sci. Publ. 1990; 473-497.
- [4] Bloom W., Fawcett W.D. *Tratado de Histología*, 11^{aba} ed. Madrid: Mc. Graw Hill - Interamericana; 1997.
- [5] Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 2004; 428: 145-150.
- [6] Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, Lee HJ, Adams GB, Niikura Y, Tschudy KS, Tilly JC, Cortes ML, Forkert R, Spitzer T, Iacomini J, Scadden DT, Tilly JL. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell* 2005; 122: 303-315.
- [7] Hutt KJ, Albertini DF. Clinical applications and limitations of current ovarian stem cell research: a review. *J. Exp. Clin. Assist. Reprod.* 2006; 3: 6.
- [8] Jammongjit M, Hammes SR. Oocyte maturation: the coming of age of a germ cell. *Semin. Reprod. Med.* 2005; 23: 234-241.
- [9] Hutt KJ, Albertini DF. An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. *Reprod. Biomed. Online.* 2007; 14: 758-764.
- [10] Irving-Rodgers HF, Rodgers RJ. Ultrastructure of the basal lamina of bovine ovarian follicles and its relationship to the membrana granulosa. *J. Reprod. Fertil.* 2000; 118: 221-228.
- [11] Peters H, Byskov AG, Lintern-Moore S, Faber M, Andersen M. The effect of gonadotrophin on follicle growth initiation in the neonatal mouse ovary. *J Reprod. Fertil.* 1973; 35: 139-141.
- [12] Elvin JA, Matzuk MM. Mouse models of ovarian failure. *Rev. Reprod.* 1998; 3: 183-195.
- [13] Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int. Rev. Cytol.* 1991; 124: 43-101.
- [14] Adashi EY, Resnick CE, Rosenfeld RG, Powell DR, Koistinen R, Rutanen EM, Seppala M. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-1 is an antigonadotropin: evidence that optimal follicle-stimulating hormone action in ovarian granulosa cells is contingent upon amplification by endogenously-derived IGFs. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1993; 343: 377-385.

- [15] Orisaka M, Orisaka S, Jiang JY, Craig J, Wang Y, Kotsuji F, Tsang BK. Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. *Mol. Endocrinol.* 2006; 20: 2456-2468.
- [16] Geva E, Jaffe RB. Ovarian Angiogenesis. In: Leung P.C, Adashi E.Y (eds.), *The ovary*, Second ed. San Diego, California. USA: Elsevier Academic Press; 2004: 305-317.
- [17] *The Ovary*, 2nd ed. Elsevier, Academic Press; 2004.
- [18] Oxberry, A, Greenwald GS. An autoradiographic study of the binding of 125 I-labeled follicle-stimulating hormone, human chorionic gonadotropin and prolactin to the hamster ovary throughout the estrous cycle. *Biol Repr* 1982; 27: 505-516.
- [19] Amsterdam A, Koch Y, Lieberman ME, Lindner HR. Distribution of binding sites for human chorionic gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat. *J. Cell Biol.* 1975; 67: 894-900.
- [20] Eppig JJ. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature* 1979; 281: 483-484.
- [21] Dekel N, Galiani D, Sherizly I. Dissociation between the inhibitory and the stimulatory action of cAMP on maturation of rat oocytes. *Mol. Cell Endocrinol.* 1988; 56: 115-121.
- [22] Phillips DM, Dekel N. Effect of gonadotropins and prostaglandin on cumulus mucification in cultures of intact follicles. *J. Exp. Zool.* 1982; 221: 275-282.
- [23] Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat. Genet.* 1997; 15: 201-204.
- [24] Gougeon A, Testart J. Germinal vesicle breakdown in oocytes of human atretic follicles during the menstrual cycle. *J. Reprod. Fertil.* 1986; 78: 389-401.
- [25] Knobil E. On the control of gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Recent Prog. Horm. Res.* 1974; 30: 1-46.
- [26] Young JR, 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* 1976; 42: 432-442.
- [27] Rivier C, Rivier J, Vale W. Inhibin-mediated feedback control of follicle-stimulating hormone secretion in the female rat. *Science* 1986; 234: 205-208.
- [28] Azhar S, Tsai L, Medicherla S, Chandrasekher Y, Giudice L, Reaven E. Human granulosa cells use high density lipoprotein cholesterol for steroidogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1998; 83: 983-991.
- [29] Nakamura T, Takio K, Eto Y, Shibai H, Titani K, Sugino H. Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science* 1990; 247: 836-838.
- [30] Zeleznik AJ, Schuler HM, Reichert LE, Jr. Gonadotropin-binding sites in the rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotropin to the preovulatory follicle. *Endocrinology* 1981; 109: 356-362.

- [31] Zeleznik AJ, Midgley AR, Jr., Reichert LE, Jr. Granulosa cell maturation in the rat: increased binding of human chorionic gonadotropin following treatment with follicle-stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 1974; 95: 818-825.
- [32] Wang XN, Greenwald GS. Synergistic effects of steroids with FSH on folliculogenesis, steroidogenesis and FSH- and hCG-receptors in hypophysectomized mice. *J Reprod. Fertil.* 1993; 99: 403-413.
- [33] Vitale AM, Gonzalez OM, Parborell F, Irusta G, Campo S, Tesone M. Inhibin a increases apoptosis in early ovarian antral follicles of diethylstilbestrol-treated rats. *Biol. Reprod.* 2002; 67: 1989-1995.
- [34] Knobil E, Neill JD. *Physiology of Reproduction*, 3 Rev Ed edition ed. 2005.
- [35] Caron MG, Goldstein S, Savard K, Marsh JM. Protein kinase stimulation of a reconstituted cholesterol side chain cleavage enzyme system in the bovine corpus luteum. *J Biol Chem* 1975; 250: 5137-5143.
- [36] Andrews WW, Ojeda SR. A detailed analysis of the serum luteinizing hormone secretory profile in conscious, free-moving female rats during the time of puberty. *Endocrinology* 1981; 109: 2032-2039.
- [37] Urbanski HF, Ojeda SR. The juvenile-peripubertal transition period in the female rat: establishment of a diurnal pattern of pulsatile luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 1985; 117: 644-649.
- [38] Westwood FR. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicol. Pathol.* 2008; 36: 375-384.
- [39] Hartman CG. Some New Observations on the Vaginal Smear of the Rat. *Yale J. Biol. Med.* 1944; 17: 99-112.
- [40] Sterneck E, Tessarollo L, Johnson PF. An essential role for C/EBPbeta in female reproduction. *Genes Dev.* 1997; 11: 2153-2162.
- [41] Espey LL, Ujioka T, Russell DL, Skelsey M, Vladu B, Robker RL, Okamura H, 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* 2000; 141: 2385-2391.
- [42] Natraj U, Richards JS. Hormonal regulation, localization, and functional activity of the progesterone receptor in granulosa cells of rat preovulatory follicles. *Endocrinology* 1993; 133: 761-769.
- [43] Lee A, Christenson LK, Patton PE, Burry KA, Stouffer RL. Vascular endothelial growth factor production by human luteinized granulosa cells in vitro. *Hum. Reprod.* 1997; 12: 2756-2761.
- [44] Wulff C, Wilson H, Lague P, Duncan WC, Armstrong DG, Fraser HM. Angiogenesis in the human corpus luteum: localization and changes in angiopoietins, tie-2, and vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 2000; 85: 4302-4309.

- [45] Niswender GD, Nett TM. Corpus luteum and its control in infraprimates species. In: Knobil E, Neill J.D. (eds.), *The Physiology of Reproduction*, vol. 1. New York: Raven Press; 1994: 781-816.
- [46] Strauss JF, III, Stambaugh RL. Induction of 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in rat corpora lutea of pregnancy by prostaglandin F-2 alpha. *Prostaglandins* 1974; 5: 73-85.
- [47] Mukherjee A, Urban J, Sassone-Corsi P, Mayo KE. Gonadotropins regulate inducible cyclic adenosine 3',5'-monophosphate early repressor in the rat ovary: implications for inhibin alpha subunit gene expression. *Mol. Endocrinol.* 1998; 12: 785-800.
- [48] Ascoli M, Fanelli F, Segaloff DL. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocr. Rev.* 2002; 23: 141-174.
- [49] Mukherjee A, Park-Sarge OK, Mayo KE. Gonadotropins induce rapid phosphorylation of the 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 1996; 137: 3234-3245.
- [50] Arias J, Alberts AS, Brindle P, Claret FX, Smeal T, Karin M, Feramisco J, Montminy M. Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature* 1994; 370: 226-229.
- [51] Park JY, Richard F, Chun SY, Park JH, Law E, Horner K, Jin SL, Conti M. Phosphodiesterase regulation is critical for the differentiation and pattern of gene expression in granulosa cells of the ovarian follicle. *Mol. Endocrinol.* 2003; 17: 1117-1130.
- [52] Donadeu FX, Ascoli M. The differential effects of the gonadotropin receptors on aromatase expression in primary cultures of immature rat granulosa cells are highly dependent on the density of receptors expressed and the activation of the inositol phosphate cascade. *Endocrinology* 2005; 146: 3907-3916.
- [53] Morris JK, Richards JS. Luteinizing hormone induces prostaglandin endoperoxide synthase-2 and luteinization in vitro by A-kinase and C-kinase pathways. *Endocrinology* 1995; 136: 1549-1558.
- [54] el Fouly MA, Cook B, Nekola M, Nalbandov AV. Role of the ovum in follicular luteinization. *Endocrinology* 1970; 87: 286-293.
- [55] Pangas SA, Matzuk MM. Genetic models for transforming growth factor beta superfamily signaling in ovarian follicle development. *Mol. Cell Endocrinol.* 2004; 225: 83-91.
- [56] Pangas SA, Li X, Robertson EJ, Matzuk MM. Premature luteinization and cumulus cell defects in ovarian-specific Smad4 knockout mice. *Mol. Endocrinol.* 2006; 20: 1406-1422.
- [57] Bagavandoss P. Differential distribution of gelatinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the rat ovary. *J. Endocrinol.* 1998; 158: 221-228.
- [58] Hagglund AC, Ny A, Leonardsson G, Ny T. Regulation and localization of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the mouse ovary during gonadotropin-induced ovulation. *Endocrinology* 1999; 140: 4351-4358.

- [59] Aten RF, Kolodecik TR, Behrman HR. A cell adhesion receptor antiserum abolishes, whereas laminin and fibronectin glycoprotein components of extracellular matrix promote, luteinization of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1995; 136: 1753-1758.
- [60] Kashida S, Sugino N, Takiguchi S, Karube A, Takayama H, Yamagata Y, Nakamura Y, Kato H. Regulation and role of vascular endothelial growth factor in the corpus luteum during mid-pregnancy in rats. *Biol. Reprod.* 2001; 64: 317-323.
- [61] Zimmermann RC, Hartman T, Bohlen P, Sauer MV, Kitajewski J. Preovulatory treatment of mice with anti-VEGF receptor 2 antibody inhibits angiogenesis in corpora lutea. *Microvasc. Res.* 2001; 62: 15-25.
- [62] Hazzard TM, Rohan RM, Molskness TA, Fanton JW, D'Amato RJ, Stouffer RL. Injection of antiangiogenic agents into the macaque preovulatory follicle: disruption of corpus luteum development and function. *Endocrine.* 2002; 17: 199-206.
- [63] Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat. Med.* 1998; 4: 336-340.
- [64] Pauli SA, Tang H, Wang J, Bohlen P, Posser R, Hartman T, Sauer MV, Kitajewski J, Zimmermann RC. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor 2 pathway is critical for blood vessel survival in corpora lutea of pregnancy in the rodent. *Endocrinology* 2005; 146: 1301-1311.
- [65] Ferrara N, LeCouter J, Lin R, Peale F. EG-VEGF and Bv8: a novel family of tissue-restricted angiogenic factors. *Biochim. Biophys. Acta* 2004; 1654: 69-78.
- [66] LeCouter J, Lin R, Ferrara N. Endocrine gland-derived VEGF and the emerging hypothesis of organ-specific regulation of angiogenesis. *Nat. Med.* 2002; 8: 913-917.
- [67] LeCouter J, Kowalski J, Foster J, Hass P, Zhang Z, Dillard-Telm L, Frantz G, Rangell L, DeGuzman L, Keller GA, Peale F, Gurney A, Hillan KJ, Ferrara N. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* 2001; 412: 877-884.
- [68] Guthridge M, Bertolini J, Cowling J, Hearn MT. Localization of bFGF mRNA in cyclic rat ovary, diethylstilbesterol primed rat ovary, and cultured rat granulosa cells. *Growth Factors* 1992; 7: 15-25.
- [69] Ortega S, Ittmann M, Tsang SH, Ehrlich M, Basilico C. Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1998; 95: 5672-5677.
- [70] Fiedler U, Augustin HG. Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. *Trends Immunol.* 2006; 27: 552-558.
- [71] Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997; 277: 55-60.

- [72] Ragoobir J, Abayasekara DR, Bruckdorfer KR, Michael AE. Stimulation of progesterone production in human granulosa-lutein cells by lipoproteins: evidence for cholesterol-independent actions of high-density lipoproteins. *J. Endocrinol.* 2002; 173: 103-111.
- [73] Seedorf U, Ellinghaus P, Roch NJ. Sterol carrier protein-2. *Biochim. Biophys. Acta* 2000; 1486: 45-54.
- [74] McLean MP, Puryear TK, Khan I, Azhar S, Billheimer JT, Orly J, Gibori G. Estradiol regulation of sterol carrier protein-2 independent of cytochrome P450 side-chain cleavage expression in the rat corpus luteum. *Endocrinology* 1989; 125: 1337-1344.
- [75] Rennert H, Amsterdam A, Billheimer JT, Strauss JF, III. Regulated expression of sterol carrier protein 2 in the ovary: a key role for cyclic AMP. *Biochemistry* 1991; 30: 11280-11285.
- [76] Wiltbank MC, Diskin MG, Niswender GD. Differential actions of second messenger systems in the corpus luteum. *J. Reprod. Fertil. Suppl* 1991; 43: 65-75.
- [77] Niswender GD. Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction.* 2002; 123: 333-339.
- [78] Stocco DM. StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu. Rev. Physiol* 2001; 63: 193-213.
- [79] Bogan RL, Davis TL, Niswender GD. Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) aggregation and absence of steroidogenic acute regulatory protein (StAR)/PBR association in the mitochondrial membrane as determined by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2007; 104: 61-67.
- [80] West LA, Horvat RD, Roess DA, Barisas BG, Juengel JL, Niswender GD. Steroidogenic acute regulatory protein and peripheral-type benzodiazepine receptor associate at the mitochondrial membrane. *Endocrinology* 2001; 142: 502-505.
- [81] Sanders SL, 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.* 1997; 56: 1077-1087.
- [82] Hickey GJ, Oonk RB, Hall PF, 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* 1989; 125: 1673-1682.
- [83] Stouffer RL. Progesterone as a mediator of gonadotrophin action in the corpus luteum: beyond steroidogenesis. *Hum. Reprod. Update.* 2003; 9: 99-117.
- [84] Risk M, Shehu A, Mao J, Stocco CO, Goldsmith LT, Bowen-Shauver JM, Gibori G. Cloning and characterization of a 5' regulatory region of the prolactin receptor-associated protein/17 β hydroxysteroid dehydrogenase 7 gene. *Endocrinology* 2005; 146: 2807-2816.
- [85] Richards JS, Williams JJ. Luteal cell receptor content for prolactin (PRL) and luteinizing hormone (LH): regulation by LH and PRL. *Endocrinology* 1976; 99: 1571-1581.

- [86] Gibori G, Keyes PL, Richards JS. A role for intraluteal estrogen in the mediation of luteinizing hormone action on the rat corpus luteum during pregnancy. *Endocrinology* 1978; 103: 162-169.
- [87] Gibori G, Rodway R, Rothchild I. The luteotrophic effect of estrogen in the rat: prevention by estradiol of the luteolytic effect of an antiserum to luteinizing hormone in the pregnant rat. *Endocrinology* 1977; 101: 1683-1689.
- [88] Butler WR, Hotchkiss J, Knobil E. Functional luteolysis in the rhesus monkey: ovarian estrogen and progesterone during the luteal phase of the menstrual cycle. *Endocrinology* 1975; 96: 1509-1512.
- [89] Kuranaga E, Kanuka H, Hirabayashi K, Suzuki M, Nishihara M, Takahashi M. Progesterone is a cell death suppressor that downregulates Fas expression in rat corpus luteum. *FEBS Lett.* 2000; 466: 279-282.
- [90] Ashley RL, Clay CM, Farmerie TA, Niswender GD, Nett TM. Cloning and characterization of an ovine intracellular seven transmembrane receptor for progesterone that mediates calcium mobilization. *Endocrinology* 2006; 147: 4151-4159.
- [91] Goyeneche AA, Deis RP, Gibori G, Telleria CM. Progesterone promotes survival of the rat corpus luteum in the absence of cognate receptors. *Biol. Reprod.* 2003; 68: 151-158.
- [92] Cai Z, Stocco C. Expression and regulation of progestin membrane receptors in the rat corpus luteum. *Endocrinology* 2005; 146: 5522-5532.
- [93] Robker RL, Russell DL, Espey LL, Lydon JP, O'Malley BW, Richards JS. Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2000; 97: 4689-4694.
- [94] Takiguchi S, Sugino N, Esato K, Karube-Harada A, Sakata A, Nakamura Y, Ishikawa H, Kato H. Differential regulation of apoptosis in the corpus luteum of pregnancy and newly formed corpus luteum after parturition in rats. *Biol. Reprod.* 2004; 70: 313-318.
- [95] McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol Rev.* 1999; 79: 263-323.
- [96] Strauss JF, III, Sokoloski J, Caploe P, Duffy P, Mintz G, Stambaugh RL. On the role of prostaglandins in parturition in the rat. *Endocrinology* 1975; 96: 1040-1043.
- [97] Sugimoto Y, Yamasaki A, Segi E, Tsuboi K, Aze Y, Nishimura T, Oida H, Yoshida N, Tanaka T, Katsuyama M, Hasumoto K, Murata T, Hirata M, Ushikubi F, Negishi M, Ichikawa A, Narumiya S. Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin F receptor. *Science* 1997; 277: 681-683.
- [98] Zeleznik AJ. In vivo responses of the primate corpus luteum to luteinizing hormone and chorionic gonadotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1998; 95: 11002-11007.
- [99] Bennegard-Eden B, Hahlin M, Kindahl H. Interaction between oxytocin and prostaglandin F2 alpha in human corpus luteum? *Hum. Reprod.* 1995; 10: 2320-2324.

- [100] Colles SM, Woodford JK, Moncecchi D, Myers-Payne SC, McLean LR, Billheimer JT, Schroeder F. Cholesterol interaction with recombinant human sterol carrier protein-2. *Lipids* 1995; 30: 795-803.
- [101] Sandhoff TW, McLean MP. Hormonal regulation of steroidogenic acute regulatory (StAR) protein messenger ribonucleic acid expression in the rat ovary . *Endocrine* 1996; 4: 259-267.
- [102] Stocco CO, Chedrese J, 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.* 2001; 65: 1114-1119.
- [103] Behrman HR, Grinwich DL, Hichens M. Studies on the mechanism of PGF2alpha and gonadotropin interactions on LH receptor function in corpora lutea during luteolysis. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.* 1976; 2: 655-666.
- [104] Curlewis JD, Tam SP, Lau P, Kusters DH, Barclay JL, Anderson ST, 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* 2002; 143: 3984-3993.
- [105] Stocco C. In vivo and in vitro inhibition of cyp19 gene expression by prostaglandin F2alpha in murine luteal cells: implication of GATA-4. *Endocrinology* 2004; 145: 4957-4966.
- [106] Girsh E, Wang W, Mamluk R, Arditi F, Friedman A, Milvae RA, Meidan R. Regulation of endothelin-1 expression in the bovine corpus luteum: elevation by prostaglandin F 2 alpha. *Endocrinology* 1996; 137: 5191-5196.
- [107] Hinckley ST, Milvae RA. Endothelin-1 mediates prostaglandin F(2alpha)-induced luteal regression in the ewe. *Biol. Reprod.* 2001; 64: 1619-1623.
- [108] Foyouzi N, Cai Z, Sugimoto Y, Stocco C. Changes in the expression of steroidogenic and antioxidant genes in the mouse corpus luteum during luteolysis. *Biol. Reprod.* 2005; 72: 1134-1141.
- [109] Behrman HR, Kodaman PH, Preston SL, Gao S. Oxidative stress and the ovary. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 2001; 8: S40-S42.
- [110] Riley JC, Behrman HR. In vivo generation of hydrogen peroxide in the rat corpus luteum during luteolysis. *Endocrinology* 1991; 128: 1749-1753.
- [111] Chinnaiyan AM, Dixit VM. The cell-death machine. *Curr. Biol.* 1996; 6: 555-562.
- [112] Cryns V, Yuan J. Proteases to die for. *Genes Dev.* 1998; 12: 1551-1570.
- [113] Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316.
- [114] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 1972; 26: 239-257.

- [115] Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* 2002; 2: 647-656.
- [116] Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003; 22: 8590-8607.
- [117] Billig H, Furuta I, Hsueh AJ. Gonadotropin-releasing hormone directly induces apoptotic cell death in the rat ovary: biochemical and in situ detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in granulosa cells. *Endocrinology* 1994; 134: 245-252.
- [118] Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat. Rev. Cancer* 2002; 2: 420-430.
- [119] Adams JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.* 2003; 17: 2481-2495.
- [120] Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J. Clin. Invest* 2005; 115: 2665-2672.
- [121] Yacobi K, Wojtowicz A, Tsafirri A, Gross A. Gonadotropins enhance caspase-3 and -7 activity and apoptosis in the theca-interstitial cells of rat preovulatory follicles in culture. *Endocrinology* 2004; 145: 1943-1951.
- [122] Boone DL, Tsang BK. Caspase-3 in the rat ovary: localization and possible role in follicular atresia and luteal regression. *Biol. Reprod.* 1998; 58: 1533-1539.
- [123] Kayalar C, Ord T, Testa MP, Zhong LT, Bredesen DE. Cleavage of actin by interleukin 1 beta-converting enzyme to reverse DNase I inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1996; 93: 2234-2238.
- [124] Nelipovich PA, Nikonova LV, Umansky SR. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase as a possible reason for activation of Ca²⁺/Mg²⁺-dependent endonuclease in thymocytes of irradiated rats. *Int. J. Radiat. Biol. Relat Stud. Phys. Chem. Med.* 1988; 53: 749-765.
- [125] Ashkenazi A, Holland P, Eckhardt SG. Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: the potential of recombinant human apoptosis ligand 2/Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL). *J. Clin. Oncol.* 2008; 26: 3621-3630.
- [126] LeBlanc HN, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death. Differ.* 2003; 10: 66-75.
- [127] Sato K, Hida S, Takayanagi H, Yokochi T, Kayagaki N, Takeda K, Yagita H, Okumura K, Tanaka N, Taniguchi T, Ogasawara K. Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta. *Eur. J. Immunol.* 2001; 31: 3138-3146.
- [128] Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer* 2002; 2: 594-604.
- [129] Wu Y, Mehew JW, Heckman CA, Arcinas M, Boxer LM. Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. *Oncogene* 2001; 20: 240-251.

- [130] Henry-Mowatt J, Dive C, Martinou JC, James D. Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. *Oncogene* 2004; 23: 2850-2860.
- [131] Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, Ierino H, Lee EF, Fairlie WD, Bouillet P, Strasser A, Kluck RM, Adams JM, Huang DC. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 2007; 315: 856-859.
- [132] Mak TW, Yeh WC. Signaling for survival and apoptosis in the immune system. *Arthritis Res.* 2002; 4 Suppl 3: S243-S252.
- [133] Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 1995; 80: 285-291.
- [134] Otilie S, Diaz JL, Chang J, Wilson G, Tuffo KM, Weeks S, McConnell M, Wang Y, Oltersdorf T, Fritz LC. Structural and functional complementation of an inactive Bcl-2 mutant by Bax truncation. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 16955-16961.
- [135] Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 1999; 13: 2905-2927.
- [136] Peluffo MC, Young KA, Stouffer RL. Dynamic Expression of Caspase-2, -3, -8, and -9 Proteins and Enzyme Activity, But Not Messenger Ribonucleic Acid, in the Monkey Corpus Luteum during the Menstrual Cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 2005; 90: 2327-2335.
- [137] Slot KA, Voorendt M, Boer-Brouwer M, van Vugt HH, Teerds KJ. Estrous cycle dependent changes in expression and distribution of Fas, Fas ligand, Bcl-2, Bax, and pro- and active caspase-3 in the rat ovary. *J. Endocrinol.* 2006; 188: 179-192.
- [138] Carambula SF, Matikainen T, Lynch MP, Flavell RA, Goncalves PB, Rueda BR. Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of the ovarian corpus luteum. *Endocrinology* 2002; 143: 1495-1501.
- [139] Peluffo MC, Stouffer RL, Tesone M. Activity and expression of different members of the caspase family in the rat corpus luteum during pregnancy and postpartum. *Am. J Physiol Endocrinol. Metab* 2007; 293: E1215-E1223.
- [140] Yadav VK, Lakshmi G, Medhamurthy R. Prostaglandin F2alpha-mediated activation of apoptotic signaling cascades in the corpus luteum during apoptosis: involvement of caspase-activated DNase. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 10357-10367.
- [141] Penny LA, Armstrong D, Bramley TA, Webb R, Collins RA, Watson ED. Immune cells and cytokine production in the bovine corpus luteum throughout the oestrous cycle and after induced luteolysis. *J. Reprod. Fertil.* 1999; 115: 87-96.
- [142] Reibiger I, Spanel-Borowski K. Difference in localization of eosinophils and mast cells in the bovine ovary. *J. Reprod. Fertil.* 2000; 118: 243-249.

- [143] Rohm F, Spanel-Borowski K, Eichler W, Aust G. Correlation between expression of selectins and migration of eosinophils into the bovine ovary during the periovulatory period. *Cell Tissue Res.* 2002; 309: 313-322.
- [144] Bauer M, Reibiger I, Spanel-Borowski K. Leucocyte proliferation in the bovine corpus luteum. *Reproduction.* 2001; 121: 297-305.
- [145] Townson DH, O'Connor CL, 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.* 2002; 66: 361-366.
- [146] Murdoch WJ. Treatment of sheep with prostaglandin F2 alpha enhances production of a luteal chemoattractant for eosinophils. *Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.* 1987; 15: 52-56.
- [147] Standaert FE, Zamora CS, Chew BP. Quantitative and qualitative changes in blood leukocytes in the porcine ovary. *Am. J. Reprod. Immunol.* 1991; 25: 163-168.
- [148] Hehnke KE, Christenson LK, Ford SP, Taylor M. Macrophage infiltration into the porcine corpus luteum during prostaglandin F2 alpha-induced luteolysis. *Biol. Reprod.* 1994; 50: 10-15.
- [149] Davis TL, Pate JL. Bovine luteal cells stimulate proliferation of major histocompatibility nonrestricted gamma delta T cells. *Biol. Reprod.* 2007; 77: 914-922.
- [150] Brannstrom M, Giesecke L, Moore IC, van den Heuvel CJ, Robertson SA. Leukocyte subpopulations in the rat corpus luteum during pregnancy and pseudopregnancy. *Biol. Reprod.* 1994; 50: 1161-1167.
- [151] Bagavandoss P, Kunkel SL, Wiggins RC, Keyes PL. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production and localization of macrophages and T lymphocytes in the rabbit corpus luteum. *Endocrinology* 1988; 122: 1185-1187.
- [152] Itoh M, Yano A, Li X, Miyamoto K, Takeuchi Y. Limited uptake of foreign materials by resident macrophages in murine ovarian tissues. *J. Reprod. Immunol.* 1999; 43: 55-66.
- [153] Sakumoto R, Berisha B, Kawate N, Schams D, Okuda K. Tumor necrosis factor-alpha and its receptor in bovine corpus luteum throughout the estrous cycle. *Biol. Reprod.* 2000; 62: 192-199.
- [154] Skarzynski DJ, Bah MM, Deptula KM, Woclawek-Potocka I, Korzekwa A, Shibaya M, Pilawski W, Okuda K. Roles of tumor necrosis factor-alpha of the estrous cycle in cattle: an in vivo study. *Biol. Reprod.* 2003; 69: 1907-1913.
- [155] Korzekwa A, Murakami S, Woclawek-Potocka I, Bah MM, Okuda K, Skarzynski DJ. The influence of tumor necrosis factor alpha (TNF) on the secretory function of bovine corpus luteum: TNF and its receptors expression during the estrous cycle. *Reprod. Biol.* 2008; 8: 245-262.
- [156] Fairchild DL, Pate JL. Interferon-gamma induction of major histocompatibility complex antigens on cultured bovine luteal cells. *Biol. Reprod.* 1989; 40: 453-457.

- [157] Fairchild DL, Pate JL. Modulation of bovine luteal cell synthetic capacity by interferon-gamma. *Biol. Reprod.* 1991; 44: 357-363.
- [158] Taniguchi H, Yokomizo Y, Okuda K. Fas-Fas ligand system mediates luteal cell death in bovine corpus luteum. *Biol. Reprod.* 2002; 66: 754-759.
- [159] Benyo DF, Pate JL. Tumor necrosis factor-alpha alters bovine luteal cell synthetic capacity and viability. *Endocrinology* 1992; 130: 854-860.
- [160] Rueda BR, Hendry IR, Hendry III WJ, Stormshak F, Slayden OD, Davis JS. Decreased progesterone levels and progesterone receptor antagonists promote apoptotic cell death in bovine luteal cells. *Biol. Reprod.* 2000; 62: 269-276.
- [161] Komatsu K, Manabe N, Kiso M, Shimabe M, 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.* 2003; 296: 152-159.
- [162] Kuranaga E, Kanuka H, Bannai M, Suzuki M, Nishihara M, Takahashi M. Fas/Fas ligand system in prolactin-induced apoptosis in rat corpus luteum: possible role of luteal immune cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999; 260: 167-173.
- [163] Henkes LE, Sullivan BT, Lynch MP, Kolesnick R, Arsenault D, Puder M, Davis JS, Rueda BR. Acid sphingomyelinase involvement in tumor necrosis factor alpha-regulated vascular and steroid disruption during luteolysis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2008; 105: 7670-7675.
- [164] Friedman A, Weiss S, Levy N, 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.* 2000; 63: 1905-1912.
- [165] Lehmann I, Brylla E, Sittig D, Spanel-Borowski K, Aust G. Microvascular endothelial cells differ in their basal and tumour necrosis factor-alpha-regulated expression of adhesion molecules and cytokines. *J. Vasc. Res.* 2000; 37: 408-416.
- [166] Oskouian B, Saba JD. Cancer treatment strategies targeting sphingolipid metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010; 688: 185-205.
- [167] Futerman AH, Hannun YA. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep.* 2004; 5: 777-782.
- [168] Andrieu-Abadie N, Levade T. Sphingomyelin hydrolysis during apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 2002; 1585: 126-134.
- [169] Marchesini N, Hannun YA. Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. *Biochem. Cell Biol.* 2004; 82: 27-44.
- [170] De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolfe MS, Ray WJ, Goate A, Kopan R. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 1999; 398: 518-522.

- [171] Carracedo A, Lorente M, Egia A, Blazquez C, Garcia S, Giroux V, Malicet C, Villuendas R, Gironella M, Gonzalez-Feria L, Piris MA, Iovanna JL, Guzman M, Velasco G. The stress-regulated protein p8 mediates cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells. *Cancer Cell* 2006; 9: 301-312.
- [172] Chaffkin LM, Luciano AA, Peluso JJ. The role of progesterone in regulating human granulosa cell proliferation and differentiation in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1993; 76: 696-700.
- [173] Heinrich M, Wickel M, Winoto-Morbach S, Schneider-Brachert W, Weber T, Brunner J, Saftig P, Peters C, Kronke M, Schutze S. Ceramide as an activator lipid of cathepsin D. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2000; 477: 305-315.
- [174] Ruvolo PP. Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacol. Res.* 2003; 47: 383-392.
- [175] Huwiler A, Xin C, Brust AK, Briner VA, Pfeilschifter J. Differential binding of ceramide to MEKK1 in glomerular endothelial and mesangial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 2004; 1636: 159-168.
- [176] Kolesnick R. The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway. *J. Clin. Invest* 2002; 110: 3-8.
- [177] Schubert KM, Scheid MP, Duronio V. Ceramide inhibits protein kinase B/Akt by promoting dephosphorylation of serine 473. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 13330-13335.
- [178] Hsu YW, Chi KH, Huang WC, Lin WW. Ceramide inhibits lipopolysaccharide-mediated nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 induction in macrophages: effects on protein kinases and transcription factors. *J. Immunol.* 2001; 166: 5388-5397.
- [179] Kong JY, Klassen SS, Rabkin SW. Ceramide activates a mitochondrial p38 mitogen-activated protein kinase: a potential mechanism for loss of mitochondrial transmembrane potential and apoptosis. *Mol. Cell Biochem.* 2005; 278: 39-51.
- [180] Ogretmen B, Pettus BJ, Rossi MJ, Wood R, Usta J, Szulc Z, Bielawska A, Obeid LM, Hannun YA. Biochemical mechanisms of the generation of endogenous long chain ceramide in response to exogenous short chain ceramide in the A549 human lung adenocarcinoma cell line. Role for endogenous ceramide in mediating the action of exogenous ceramide. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 12960-12969.
- [181] Feldhaus MJ, Weyrich AS, Zimmerman GA, McIntyre TM. Ceramide generation in situ alters leukocyte cytoskeletal organization and beta 2-integrin function and causes complete degranulation. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 4285-4293.
- [182] Sugiura M, Kono K, Liu H, Shimizugawa T, Minekura H, Spiegel S, Kohama T. Ceramide kinase, a novel lipid kinase. Molecular cloning and functional characterization. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 23294-23300.
- [183] Wijesinghe DS, Massiello A, Subramanian P, Szulc Z, Bielawska A, Chalfant CE. Substrate specificity of human ceramide kinase. *J. Lipid Res.* 2005; 46: 2706-2716.

- [184] Gomez-Munoz A. Ceramide-1-phosphate: a novel regulator of cell activation. *FEBS Lett.* 2004; 562: 5-10.
- [185] Gomez-Munoz A, Kong JY, Salh B, Steinbrecher UP. Ceramide-1-phosphate blocks apoptosis through inhibition of acid sphingomyelinase in macrophages. *J. Lipid Res.* 2004; 45: 99-105.
- [186] Gomez-Munoz A, Frago LM, Alvarez L, Varela-Nieto I. Stimulation of DNA synthesis by natural ceramide 1-phosphate. *Biochem. J.* 1997; 325 (Pt 2): 435-440.
- [187] Gomez-Munoz A, Kong JY, Parhar K, Wang SW, Gangoiti P, Gonzalez M, Eivemark S, Salh B, Duronio V, Steinbrecher UP. Ceramide-1-phosphate promotes cell survival through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *FEBS Lett.* 2005; 579: 3744-3750.
- [188] French KJ, Upson JJ, Keller SN, Zhuang Y, Yun JK, Smith CD. Antitumor activity of sphingosine kinase inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006; 318: 596-603.
- [189] Maceyka M, Sankala H, Hait NC, Le Stunff H, Liu H, Toman R, Collier C, Zhang M, Satin LS, Merrill AH, Jr., Milstien S, Spiegel S. SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 37118-37129.
- [190] Sanchez T, Hla T. Structural and functional characteristics of S1P receptors. *J. Cell Biochem.* 2004; 92: 913-922.
- [191] Rosen H, Goetzl EJ. Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nat. Rev. Immunol.* 2005; 5: 560-570.
- [192] Spiegel S, Milstien S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003; 4: 397-407.
- [193] Coussin F, Scott RH, Nixon GF. Sphingosine 1-phosphate induces CREB activation in rat cerebral artery via a protein kinase C-mediated inhibition of voltage-gated K⁺ channels. *Biochem. Pharmacol.* 2003; 66: 1861-1870.
- [194] Zhou H, Murthy KS. Distinctive G protein-dependent signaling in smooth muscle by sphingosine 1-phosphate receptors S1P1 and S1P2. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 2004; 286: C1130-C1138.
- [195] Lepley D, Paik JH, Hla T, Ferrer F. The G protein-coupled receptor S1P2 regulates Rho/Rho kinase pathway to inhibit tumor cell migration. *Cancer Res.* 2005; 65: 3788-3795.
- [196] Sukocheva O, Wadham C, Holmes A, Albanese N, Verrier E, Feng F, Bernal A, Derian CK, Ullrich A, Vadas MA, Xia P. Estrogen transactivates EGFR via the sphingosine 1-phosphate receptor Edg-3: the role of sphingosine kinase-1. *J. Cell Biol.* 2006; 173: 301-310.
- [197] Santana P, Llanes L, Hernandez I, Gonzalez-Robayna I, Tabraue C, Gonzalez-Reyes J, Quintana J, Estevez F, Ruiz de Galarreta CM, 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* 1996; 137: 2480-2489.

- [198] Santana P, Llanes L, Hernandez I, Gallardo G, Quintana J, Gonzalez J, Estevez F, Ruiz dG, Fanjul LF. Ceramide mediates tumor necrosis factor effects on P450-aromatase activity in cultured granulosa cells. *Endocrinology* 1995; 136: 2345-2348.
- [199] Gillies RJ, Martinez R, Sneider JM, Hoyer PB. Sphingosine inhibits phorbol 12-myristate 13-acetate-, but not serum-induced, activation of Na⁺/H⁺ exchange in mammalian cells. *J. Cell Physiol* 1989; 139: 125-130.
- [200] Rajkumar K, Chedrese PJ, Ly H, Murphy BD. Protein kinase C, an endogenous regulator of hormone-induced cyclic AMP induction in porcine luteal cells. *J. Endocrinol.* 1991; 130: 273-280.
- [201] Naicker S, Bhoola KD. Endothelins: vasoactive modulators of renal function in health and disease. *Pharmacol. Ther.* 2001; 90: 61-88.
- [202] Pru JK, Lynch MP, Davis JS, Rueda BR. Signaling mechanisms in tumor necrosis factor alpha-induced death of microvascular endothelial cells of the corpus luteum. *Reprod. Biol Endocrinol.* 2003; 1: 17.
- [203] Kolesnick R, Hannun YA. Ceramide and apoptosis. *Trends Biochem. Sci.* 1999; 24: 224-225.
- [204] Marathe S, Schissel SL, Yellin MJ, Beatini N, Mintzer R, Williams KJ, Tabas I. Human vascular endothelial cells are a rich and regulatable source of secretory sphingomyelinase. Implications for early atherogenesis and ceramide-mediated cell signaling. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 4081-4088.
- [205] Morita Y, Perez GI, Paris F, Miranda SR, Ehleiter D, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Xie Z, Reed JC, Schuchman EH, Kolesnick RN, Tilly JL. Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nat. Med.* 2000; 6: 1109-1114.
- [206] Hancke K, Strauch O, Kissel C, Gobel H, Schafer W, Denschlag D. Sphingosine 1-phosphate protects ovaries from chemotherapy-induced damage in vivo. *Fertil. Steril.* 2007; 87: 172-177.
- [207] Jee BC, Lee JR, Youm H, Suh CS, Kim SH, Moon SY. Effect of sphingosine-1-phosphate supplementation on follicular integrity of vitrified-warmed mouse ovarian grafts. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2010; 152: 176-180.
- [208] Zelinski MB, Murphy MK, Lawson MS, Jurisicova A, Pau KY, Toscano NP, Jacob DS, Fanton JK, Casper RF, Dertinger SD, Tilly JL. In vivo delivery of FTY720 prevents radiation-induced ovarian failure and infertility in adult female nonhuman primates. *Fertil. Steril.* 2011; 95: 1440-1445.
- [209] Wharton KA, Johansen KM, Xu T, Artavanis-Tsakonas S. Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell* 1985; 43: 567-581.

- [210] Wu JY, Rao Y. Fringe: defining borders by regulating the notch pathway. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1999; 9: 537-543.
- [211] Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999; 284: 770-776.
- [212] Kidd S, Kelley MR, Young MW. Sequence of the notch locus of *Drosophila melanogaster*: relationship of the encoded protein to mammalian clotting and growth factors. *Mol. Cell Biol.* 1986; 6: 3094-3108.
- [213] Gray GE, Mann RS, Mitsiadis E, Henrique D, Carcangiu ML, Banks A, Leiman J, Ward D, Ish-Horowitz D, Artavanis-Tsakonas S. Human ligands of the Notch receptor. *Am. J. Pathol.* 1999; 154: 785-794.
- [214] Fleming RJ. Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Semin. Cell Dev. Biol.* 1998; 9: 599-607.
- [215] Moran JL, Johnston SH, Rauskolb C, Bhalerao J, Bowcock AM, Vogt TF. Genomic structure, mapping, and expression analysis of the mammalian Lunatic, Manic, and Radical fringe genes. *Mamm. Genome* 1999; 10: 535-541.
- [216] Qi H, Rand MD, Wu X, Sestan N, Wang W, Rakic P, Xu T, Artavanis-Tsakonas S. Processing of the notch ligand delta by the metalloprotease Kuzbanian. *Science* 1999; 283: 91-94.
- [217] Radtke F, Raj K. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat. Rev. Cancer* 2003; 3: 756-767.
- [218] Baron M. An overview of the Notch signalling pathway. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2003; 14: 113-119.
- [219] Baron M, Aslam H, Flaszka M, Fostier M, Higgs JE, Mazaleyrat SL, Wilkin MB. Multiple levels of Notch signal regulation (review). *Mol. Membr. Biol.* 2002; 19: 27-38.
- [220] Lai EC. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* 2004; 131: 965-973.
- [221] Schroeter EH, Ilagan MX, Brunkan AL, Hecimovic S, Li YM, Xu M, Lewis HD, Saxena MT, De Strooper B, Coonrod A, Tomita T, Iwatsubo T, Moore CL, Goate A, Wolfe MS, Shearman M, Kopan R. A presenilin dimer at the core of the gamma-secretase enzyme: insights from parallel analysis of Notch 1 and APP proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2003; 100: 13075-13080.
- [222] Schroeter EH, Kisslinger JA, Kopan R. Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* 1998; 393: 382-386.
- [223] Huppert SS, Le A, Schroeter EH, Mumm JS, Saxena MT, Milner LA, Kopan R. Embryonic lethality in mice homozygous for a processing-deficient allele of Notch1. *Nature* 2000; 405: 966-970.
- [224] Blaumueller CM, Qi H, Zagouras P, Artavanis-Tsakonas S. Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* 1997; 90: 281-291.

- [225] Kopan R, Nye JS, Weintraub H. The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD. *Development* 1994; 120: 2385-2396.
- [226] Gordon WR, Arnett KL, Blacklow SC. The molecular logic of Notch signaling--a structural and biochemical perspective. *J. Cell Sci.* 2008; 121: 3109-3119.
- [227] Zanotti S, Canalis E. Notch and the skeleton. *Mol. Cell Biol.* 2010; 30: 886-896.
- [228] Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 2009; 137: 216-233.
- [229] Nickoloff BJ, Osborne BA, Miele L. Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents. *Oncogene* 2003; 22: 6598-6608.
- [230] Gridley T. Notch signaling in vascular development and physiology. *Development* 2007; 134: 2709-2718.
- [231] Siekmann AF, Lawson ND. Notch signalling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries. *Nature* 2007; 445: 781-784.
- [232] Iso T, Hamamori Y, Kedes L. Notch signaling in vascular development. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003; 23: 543-553.
- [233] Efferson CL, Winkelmann CT, Ware C, Sullivan T, Giampaoli S, Tammam J, Patel S, Mesiti G, Reilly JF, Gibson RE, Buser C, Yeatman T, Coppola D, Winter C, Clark EA, Draetta GF, Strack PR, Majumder PK. Downregulation of Notch pathway by a gamma-secretase inhibitor attenuates AKT/mammalian target of rapamycin signaling and glucose uptake in an ERBB2 transgenic breast cancer model. *Cancer Res.* 2010; 70: 2476-2484.
- [234] Vo K, Amarasinghe B, Washington K, Gonzalez A, Berlin J, Dang TP. Targeting Notch pathway enhances rapamycin antitumor activity in pancreas cancers through PTEN phosphorylation. *Mol. Cancer* 2011; 10: 138.
- [235] Kalen M, Heikura T, Karvinen H, Nitzsche A, Weber H, Esser N, Yla-Herttuala S, Hellstrom M. Gamma-secretase inhibitor treatment promotes VEGF-A-driven blood vessel growth and vascular leakage but disrupts neovascular perfusion. *PLoS. One.* 2011; 6: e18709.
- [236] Dror V, Nguyen V, Walia P, Kalynyak TB, Hill JA, Johnson JD. Notch signalling suppresses apoptosis in adult human and mouse pancreatic islet cells. *Diabetologia* 2007; 50: 2504-2515.
- [237] Afshar Y, Jeong JW, Roqueiro D, Demayo F, Lydon J, Radtke F, Radnor R, Miele L, Fazleabas A. Notch1 mediates uterine stromal differentiation and is critical for complete decidualization in the mouse. *FASEB J.* 2011.
- [238] Johnson J, Espinoza T, McGaughey RW, Rawls A, Wilson-Rawls J. Notch pathway genes are expressed in mammalian ovarian follicles. *Mech. Dev.* 2001; 109: 355-361.

- [239] Trombly DJ, Woodruff TK, Mayo KE. Suppression of Notch signaling in the neonatal mouse ovary decreases primordial follicle formation. *Endocrinology* 2009; 150: 1014-1024.
- [240] Zhang CP, Yang JL, Zhang J, Li L, Huang L, Ji SY, Hu ZY, Gao F, Liu YX. Notch signaling is involved in ovarian follicle development by regulating granulosa cell proliferation. *Endocrinology* 2011; 152: 2437-2447.
- [241] Bussmann LE. Prostaglandin F-2 alpha receptors in corpora lutea of pregnant rats and relationship with induction of 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Reprod Fertil.* 1989; 85: 331-341.
- [242] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
- [243] Hernandez F, Peluffo MC, Stouffer RL, Irusta G, Tesone M. Role of the DLL4-NOTCH System in PGF2alpha-Induced Luteolysis in the Pregnant Rat. *Biol. Reprod.* 2011.
- [244] Irusta G, Parborell F, Tesone M. Inhibition of cytochrome P-450 C17 enzyme by a GnRH agonist in ovarian follicles from gonadotropin-stimulated rats. *Am. J Physiol Endocrinol. Metab* 2007; 292: E1456-E1464.
- [245] Tilly JL, Tilly KI. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology* 1995; 136: 242-252.
- [246] Flaws JA, Kugu K, Trbovich AM, DeSanti A, Tilly KI, Hirshfield AN, Tilly JL. Interleukin-1 beta-converting enzyme-related proteases (IRPs) and mammalian cell death: dissociation of IRP-induced oligonucleosomal endonuclease activity from morphological apoptosis in granulosa cells of the ovarian follicle. *Endocrinology* 1995; 136: 5042-5053.
- [247] Guo K, Wolf V, Dharmarajan AM, Feng Z, Bielke W, Saurer S, Friis R. Apoptosis-associated gene expression in the corpus luteum of the rat. *Biol. Reprod.* 1998; 58: 739-746.
- [248] Goyeneche AA, Martinez IL, Deis RP, Gibori G, Telleria CM. In vivo hormonal environment leads to differential susceptibility of the corpus luteum to apoptosis in vitro. *Biol Reprod.* 2003; 68: 2322-2330.
- [249] Kurusu S, Suzuki K, Taniguchi K, Yonezawa T, Kawaminami M. Structural regression of the rat corpus luteum of pregnancy: relationship with functional regression, apoptotic cell death, and the suckling stimulus. *Zoolog. Sci.* 2009; 26: 729-734.
- [250] Roughton SA, Lareu RR, Bittles AH, Dharmarajan AM. Fas and Fas ligand messenger ribonucleic acid and protein expression in the rat corpus luteum during apoptosis-mediated luteolysis. *Biol. Reprod.* 1999; 60: 797-804.
- [251] Abdo M, Hisheh S, Dharmarajan A. Role of tumor necrosis factor-alpha and the modulating effect of the caspases in rat corpus luteum apoptosis. *Biol. Reprod.* 2003; 68: 1241-1248.
- [252] Carambula SF, Pru JK, Lynch MP, Matikainen T, Goncalves PB, Flavell RA, Tilly JL, 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.* 2003; 1: 15.

- [253] Papadopoulos V, Dharmarajan AM, Li H, Culty M, Lemay M, Sridaran R. Mitochondrial peripheral-type benzodiazepine receptor expression. Correlation with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist-induced apoptosis in the corpus luteum. *Biochem. Pharmacol.* 1999; 58: 1389-1393.
- [254] Goyeneche AA, Harmon JM, Telleria CM. Cell death induced by serum deprivation in luteal cells involves the intrinsic pathway of apoptosis. *Reproduction.* 2006; 131: 103-111.
- [255] Guo Y, Srinivasula SM, Druilhe A, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J. Biol Chem.* 2002; 277: 13430-13437.
- [256] Spiegel S, Milstien S. Sphingosine-1-phosphate: signaling inside and out. *FEBS Lett.* 2000; 476: 55-57.
- [257] Payne SG, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate: dual messenger functions. *FEBS Lett.* 2002; 531: 54-57.
- [258] Alvarez SE, Milstien S, Spiegel S. Autocrine and paracrine roles of sphingosine-1-phosphate. *Trends Endocrinol. Metab* 2007; 18: 300-307.
- [259] Cuvillier O, Levade T. Sphingosine 1-phosphate antagonizes apoptosis of human leukemia cells by inhibiting release of cytochrome c and Smac/DIABLO from mitochondria. *Blood* 2001; 98: 2828-2836.
- [260] Choi J, Jo M, Lee E, Choi D. The role of autophagy in corpus luteum regression in the rat. *Biol. Reprod.* 2011; 85: 465-472.
- [261] Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 1996; 274: 782-784.
- [262] Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS, Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 1996; 274: 784-787.
- [263] Wu M, Lee H, Bellas RE, Schauer SL, Arsura M, Katz D, FitzGerald MJ, Rothstein TL, Sherr DH, Sonenshein GE. Inhibition of NF-kappaB/Rel induces apoptosis of murine B cells. *EMBO J.* 1996; 15: 4682-4690.
- [264] May MJ, Ghosh S. IkappaB kinases: kinsmen with different crafts. *Science* 1999; 284: 271-273.
- [265] Zhao Y, Burbach JA, Roby KF, Terranova PF, Brannian JD. Macrophages are the major source of tumor necrosis factor alpha in the porcine corpus luteum. *Biol. Reprod.* 1998; 59: 1385-1391.
- [266] Petroff MG, Petroff BK, Pate JL. Expression of cytokine messenger ribonucleic acids in the bovine corpus luteum. *Endocrinology* 1999; 140: 1018-1021.
- [267] Brannstrom M, Friden B. Immune regulation of corpus luteum function. *Semin. Reprod. Endocrinol.* 1997; 15: 363-370.

- [268] Terranova PF, Rice VM. Review: cytokine involvement in ovarian processes. *Am. J. Reprod. Immunol.* 1997; 37: 50-63.
- [269] Lai WQ, Melendez AJ, Leung BP. Role of sphingosine kinase and sphingosine-1-phosphate in inflammatory arthritis. *World J. Biol. Chem.* 2010; 1: 321-326.
- [270] Alvarez SE, Harikumar KB, Hait NC, Allegood J, Strub GM, Kim EY, Maceyka M, Jiang H, Luo C, Kordula T, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. *Nature* 2010; 465: 1084-1088.
- [271] Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJ, Frech M, Cron P, Cohen P, Lucocq JM, Hemmings BA. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem.* 1997; 272: 31515-31524.
- [272] Arvais E, Hou X, Wyatt TA, Shirasuna K, Bollwein H, Miyamoto A, Hansen TR, Rueda BR, Davis JS. Prostaglandin F₂α represses IGF-I-stimulated IRS1/phosphatidylinositol-3-kinase/AKT signaling in the corpus luteum: role of ERK and P70 ribosomal S6 kinase. *Mol. Endocrinol.* 2010; 24: 632-643.
- [273] Fan HY, Liu Z, Cahill N, Richards JS. Targeted disruption of Pten in ovarian granulosa cells enhances ovulation and extends the life span of luteal cells. *Mol. Endocrinol.* 2008; 22: 2128-2140.
- [274] Osawa Y, Banno Y, Nagaki M, Brenner DA, Naiki T, Nozawa Y, Nakashima S, Moriwaki H. TNF-α-induced sphingosine 1-phosphate inhibits apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in human hepatocytes. *J. Immunol.* 2001; 167: 173-180.
- [275] Yadav VK, Medhamurthy R. Dynamic changes in mitogen-activated protein kinase (MAPK) activities in the corpus luteum of the bonnet monkey (*Macaca radiata*) during development, induced luteolysis, and simulated early pregnancy: a role for p38 MAPK in the regulation of luteal function. *Endocrinology* 2006; 147: 2018-2027.
- [276] Tai CJ, Kang SK, Choi KC, Tzeng CR, Leung PC. Role of mitogen-activated protein kinase in prostaglandin f₂α action in human granulosa-luteal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 2001; 86: 375-380.
- [277] Hsieh HL, Sun CC, Wu CB, Wu CY, Tung WH, Wang HH, Yang CM. Sphingosine 1-phosphate induces EGFR expression via Akt/NF-κB and ERK/AP-1 pathways in rat vascular smooth muscle cells. *J. Cell Biochem.* 2008; 103: 1732-1746.
- [278] Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, Bazan NG, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Bredesen DE, Brenner C, Castedo M, Cidlowski JA, Ciechanover A, Cohen GM, De L, V, De Maria R, Deshmukh M, Dynlacht BD, El Deiry WS, Flavell RA, Fulda S, Garrido C, Golstein P, Gougeon ML, Green DR, Gronemeyer H, Hajnoczky G, Hardwick JM, Hengartner MO, Ichijo H, Jaattela M, Kepp O, Kimchi A, Klionsky DJ, Knight RA, Kornbluth S, Kumar S, Levine B, Lipton SA, Lugli E, Madeo F, Malomi W, Marine JC, Martin SJ, Medema JP, Mehlen P, Melino G, Moll UM, Morselli E, Nagata S, Nicholson DW, Nicotera P, Nunez G, Oren M, Penninger J, Pervaiz S, Peter ME, Piacentini M, Prehn JH, Puthalakath H, Rabinovich GA, Rizzuto R, Rodrigues CM, Rubinsztein DC, Rudel T, Scorrano L, Simon HU, Steller H, Tschopp J,

- Tsujimoto Y, Vandenabeele P, Vitale I, Vousden KH, Youle RJ, Yuan J, Zhivotovsky B, Kroemer G. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death. Differ.* 2009; 16: 1093-1107.
- [279] Fraser HM, Lunn SF, Harrison DJ, 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.* 1999; 61: 1468-1479.
- [280] Guraya SS. Histochemical observations on the lipid changes in the rat corpus luteum during various reproductive states. *J. Reprod. Fertil.* 1975; 42: 59-65.
- [281] Al Zi'abi MO, Fraser HM, Watson ED. Cell death during natural and induced luteal regression in mares. *Reproduction.* 2002; 123: 67-77.
- [282] Igarashi J, Erwin PA, Dantas AP, Chen H, Michel T. VEGF induces S1P1 receptors in endothelial cells: Implications for cross-talk between sphingolipid and growth factor receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2003; 100: 10664-10669.
- [283] Ferrara N, Damico L, Shams N, Lowman H, Kim R. Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration. *Retina* 2006; 26: 859-870.
- [284] Garris DR, Curry TE, Jr. Ovarian blood flow in the rat: association with body weight, the estrous cycle, and pseudopregnancy. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1983; 174: 198-204.
- [285] Acosta TJ, Miyamoto A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Anim Reprod. Sci.* 2004; 82-83: 127-140.
- [286] Berisha B, Meyer HH, Schams D. Effect of prostaglandin F2 alpha on local luteotropic and angiogenic factors during induced functional luteolysis in the bovine corpus luteum. *Biol. Reprod.* 2010; 82: 940-947.
- [287] Chae SS, Proia RL, Hla T. Constitutive expression of the S1P1 receptor in adult tissues. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2004; 73: 141-150.
- [288] Maines LW, French KJ, Wolpert EB, Antonetti DA, Smith CD. Pharmacologic manipulation of sphingosine kinase in retinal endothelial cells: implications for angiogenic ocular diseases. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 2006; 47: 5022-5031.
- [289] Sanchez T, Skoura A, Wu MT, Casserly B, Harrington EO, Hla T. Induction of vascular permeability by the sphingosine-1-phosphate receptor-2 (S1P2R) and its downstream effectors ROCK and PTEN. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007; 27: 1312-1318.
- [290] Liszewska E, Rekawiecki R, Kotwica J. Effect of progesterone on the expression of bax and bcl-2 and on caspase activity in bovine luteal cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2005; 78: 67-81.
- [291] Vorontchikhina MA, Zimmermann RC, Shawber CJ, Tang H, Kitajewski J. Unique patterns of Notch1, Notch4 and Jagged1 expression in ovarian vessels during folliculogenesis and corpus luteum formation. *Gene Expr. Patterns.* 2005; 5: 701-709.

- [292] Jang MS, Miao H, Carlesso N, Shelly L, Zlobin A, Darack N, Qin JZ, Nickoloff BJ, Miele L. Notch-1 regulates cell death independently of differentiation in murine erythroleukemia cells through multiple apoptosis and cell cycle pathways. *J. Cell Physiol* 2004; 199: 418-433.
- [293] Miele L, Osborne B. Arbiter of differentiation and death: Notch signaling meets apoptosis. *J. Cell Physiol* 1999; 181: 393-409.
- [294] Meurette O, Stylianou S, Rock R, Collu GM, Gilmore AP, Brennan K. Notch activation induces Akt signaling via an autocrine loop to prevent apoptosis in breast epithelial cells. *Cancer Res.* 2009; 69: 5015-5022.
- [295] Daniel PT, Sturm I, Ritschel S, Friedrich K, Dorken B, Bendzko P, Hillebrand T. Detection of genomic DNA fragmentation during apoptosis (DNA ladder) and the simultaneous isolation of RNA from low cell numbers. *Anal. Biochem.* 1999; 266: 110-115.
- [296] Rekawiecki R, Nowik M, Kotwica J. Stimulatory effect of LH, PGE2 and progesterone on StAR protein, cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage and 3beta hydroxysteroid dehydrogenase gene expression in bovine luteal cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2005; 78: 169-184.
- [297] Palomero T, Dominguez M, Ferrando AA. The role of the PTEN/AKT Pathway in NOTCH1-induced leukemia. *Cell Cycle* 2008; 7: 965-970.